
ЗЕМЛЕДЕЛИЕ, РАСТЕНИЕВОДСТВО, ЗАЩИТА РАСТЕНИЙ

**Разработка ПЦР-тестов для идентификации калифорнийской щитовки
Diaspidiotus perniciosus (Hemiptera: Diaspididae)**

Андрей Владимирович Шипулин✉

Всероссийский центр карантина растений

✉ Автор, ответственный за переписку: schipulin.andrey2016@yandex.ru

Аннотация

Калифорнийская щитовка *Diaspidiotus (Quadraspidotus) perniciosus* (Comstock, 1881) относится к числу экономически значимых вредителей плодовых культур, регулируется Единым перечнем карантинных объектов Евразийского экономического союза. В карантинных фитосанитарных лабораториях диагностика этого вида проводится морфологическими методами, тогда как ПЦР-тесты в отношении калифорнийской щитовки не применяются. Статья посвящена разработке ПЦР-тестов для идентификации *D. perniciosus* на основе видоспецифичных праймеров Dp1-F/Dp1-R, которые позволяют получить ампликон размером 216 п.н., и зонда Dp1-probe для участка митохондриального гена COI. Тестирование пары праймеров и зонда *in silico* показало их видоспецифичность в отношении *D. perniciosus*. Были предложены три ПЦР-теста: 1) с электрофоретической детекцией ПЦР-продуктов; 2) в «реальном времени» с интеркалирующим красителем Sybr Green I; 3) в «реальном времени» с использованием «TaqMan» зонда. Апробация была проведена на образцах ДНК *D. perniciosus* и 15 видов Diaspididae, в том числе 8 видов рода *Diaspidiotus*. Во всех трех тестах положительный результат был зафиксирован только в случае целевого объекта, то есть показана специфичность предложенных методов идентификации. Аналитическая чувствительность каждого из трех ПЦР-тестов при испытании образцов *D. perniciosus* с концентрацией ДНК в диапазоне от 0,1 до 40,4 нг/мкл была равной 100%. Таким образом, ПЦР-тесты позволяют детектировать ДНК целевого объекта при ее минимальной концентрации. Разработанные ПЦР-тесты могут быть рекомендованы к применению для обеспечения карантинных фитосанитарных мер в лабораторной практике при идентификации калифорнийской щитовки, в том числе на преимагинальных стадиях. Выбор того или иного теста определяется оснащенностью лаборатории.

Ключевые слова

Защита растений, карантин растений, вредители плодовых культур, энтомология, диагностика, ПЦР

Благодарности

Автор выражает благодарность Н.А. Гура и Д.Г. Касаткину (ФГБУ «ВНИИКР») за предоставленный материал по отдельным видам щитовок. Работа выполнена в рамках НИОКТР 125032104330–0.


Для цитирования

Шипулин А.В. Разработка ПЦР-тестов для идентификации калифорнийской щитовки *Diaspidiotus perniciosus* (Hemiptera: Diaspididae) // *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. 2025. № 5. С. 83–96.

**Development of PCR tests for the identification
of *Diaspidiotus perniciosus* (Hemiptera: Diaspididae)**

Andrey V. Shipulin 

All-Russian Plant Quarantine Center

 **Corresponding author:** schipulin.andrey2016@yandex.ru

Abstract

The San Jose scale, *Diaspidiotus (Quadraspidotus) perniciosus* (Comstock, 1881), is a significant economic pest of fruit crops regulated under the Common List of Quarantine Pests of the Eurasian Economic Union. In quarantine phytosanitary laboratories, diagnosis of this species is typically performed using morphological methods; PCR tests for *D. perniciosus* are not routinely employed. This article describes the development of PCR tests for the identification of *D. perniciosus* based on species-specific primers Dp1-F/Dp1-R, which amplify a 216 bp amplicon, and a Dp1-probe targeting a region of the mitochondrial COI gene. *In silico* testing of the primer pair and probe demonstrated their species specificity for *D. perniciosus*. Three PCR tests were developed: 1) with electrophoretic detection of PCR products; 2) a real-time PCR with the intercalating dye Sybr Green I; and 3) a real-time PCR using a TaqMan probe. They were tested on DNA samples of *D. perniciosus* and 15 other Diaspididae species, including eight species of the genus *Diaspidiotus*. In all three tests, a positive result was only obtained for the target species, demonstrating the specificity of the proposed identification methods. The analytical sensitivity of each of the three PCR tests, when tested on *D. perniciosus* DNA samples with concentrations ranging from 0.1 to 40.4 ng/ μ L, was 100%, indicating that the PCR tests can detect the target DNA at its minimum concentration. The developed PCR tests can be recommended for use in quarantine phytosanitary measures in laboratory practice for the identification of *D. perniciosus*, including at pre-imaginal stages; the choice of a test depends on the available laboratory equipment.

Keywords

Plant protection, plant quarantine, fruit crop pests, entomology, diagnostics, PCR

Acknowledgements

The author gratefully acknowledges N.A. Gura and D.G. Kasatkin (All-Russian Plant Quarantine Centre) for providing material on specific scale insect species. The work was conducted within the framework of research project No. 125032104330–0.

For citation

Shipulin A.V. Development of PCR tests for the identification of *Diaspidiotus perniciosus* (Hemiptera: Diaspididae). *Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy*. 2025. No. 5. P. 83–96.

Введение

Introduction

Калифорнийская щитовка *Diaspidiotus (Quadraspidotus) perniciosus* (Comstock, 1881)¹ – карантинный объект Единого перечня Евразийского экономического

¹ В Едином перечне карантинных объектов ЕАЭС вид отнесен к роду *Quadraspidotus* MacGillivray, 1921. В данной работе принята точка зрения Е.М. Данциг (1993: 179), согласно которой вышеназванный таксон рассматривается в качестве младшего синонима рода *Diaspidiotus* Berlese et Leopardi, 1896 (примеч. авт.).

союза, вредитель плодовых культур [2, 3]. Идентификация данного организма проводится только морфологическими методами по взрослым самкам [1]. В подкарантинной продукции встречаются преимагинальные стадии щитовок, для которых установить видовую принадлежность классическими подходами не представляется возможным.

Молекулярно-генетические исследования щитовок *Diaspididae* в основном касаются вопросов филогенетического анализа на основе ядерных (28S, 16S, Efl α , CAD) и митохондриальных участков геномов (COI, COI–COII) [5, 8–11]. «Фолмеровский» участок COI применяется при видовой идентификации *Diaspididae* методом ДНК-баркодинга [4, 6, 13], так как в отличие от большинства изученных у щитовок генетических маркеров он менее консервативен и позволяет дифференцировать виды [4]. В отношении *D. perniciosus* известен только метод ПАПД ПЦР (RAPD PCR) [7], который, однако, не нашел широкого применения в фитосанитарной диагностике. В настоящее время ПЦР-тесты для идентификации калифорнийской щитовки на всех стадиях онтогенеза при проведении рутинной диагностики в испытательных лабораториях отсутствуют. К числу достоинств ПЦР-тестов можно отнести то, что они не требуют специальной подготовки персонала фитосанитарных лабораторий, так как выполняются по принципам молекулярно-генетических исследований, применяемых в других областях карантина и защиты растений.

Исходя из вышеизложенного целью исследований является разработка тест-систем для идентификации калифорнийской щитовки *Diaspidiotus (Quadraspidotus) perniciosus* на основе метода ПЦР. Основные задачи – подбор последовательностей видоспецифичных праймеров и зонда для калифорнийской щитовки по участку COI и их тестирование *in silico*; апробация трех ПЦР-тестов: 1) с детекцией ПЦР-продуктов с помощью электрофореза; ПЦР в режиме «реального времени» 2) с применением интеркалирующего красителя (SYBR Green I); 3) зонда по типу «TaqMan», а также оценка специфичности и аналитической чувствительности разработанных ПЦР-тестов.

Цель исследований: разработка тест-систем для идентификации калифорнийской щитовки *Diaspidiotus (Quadraspidotus) perniciosus* на основе метода ПЦР.

Методика исследований

Research method

Разработку ПЦР тест-систем для идентификации *D. perniciosus* проводили на основе половины «фолмеровского» фрагмента гена COI размером 330 пар оснований (п.о.). Для целевого вида были проанализированы 70 нуклеотидных последовательностей (из них 16 – оригинальных), депонированных в Генбанк [12]: OR726615.1-OR726619.1, OR759855.1-OR759861.1, OR758587.1, OR946333, OR946346.1, OR947623.1. Для поиска видоспецифичных участков сравнение проводили с 7 видами рода *Diaspidiotus* (табл. 1) и другими представителями сем. *Diaspididae*, трофически сходными с калифорнийской щитовкой (* – ориг. нуклеотидные последовательности):

Aonidiella Berlese & Leonardi, 1896: *Ao. aurantii* (Maskell, 1879) – HM474070.1, KY085174.1; *Ao. citrina* (Coquillett, 1891) – JQ267365.1, KX091185.1; *Ao. orientalis* (Newstead, 1894) – PQ837772.1.

Aspidiotus Bouche, 1833: *As. destructor* Signoret, 1869 – HM474075.1, MF775728.1; *As. excisus* Green, 1896 – HM474077.1, HM474079.1; *As. nerii* Bouche, 1833 – KY085080.1, KY085081.1, KY084962.1, KY084989.1.

Aulacaspis Cockerell, 1893: *Au. tubercularis* Newstead, 1906 – HM474091.1, HM474092.1; *Au. rosarum* Borchsenius, 1958 – KP981086.1, HM474087.1.

Chionaspis Signoret, 1868: *Ch. salicis* (Linnaeus, 1758) – OR915574.1*.
Chrysomphalus Ashmead, 1880: *C. aonidum* (Linnaeus, 1758) – GU936944.1, HM474095.1, OQ943789.1; *C. bifasciculatus* Ferris, 1938 – HM474098.1, HM474099.1; *C. dictyospermi* (Morgan, 1889) – JQ267366.1, KY085039.1.
Fiorinia Targioni Tozzetti, 1868: *F. phantasma* Cockerell & Robinson, 1915 – MW883926.1; *F. theae* Green, 1900 – MW883940.1.
Hemiberlesia Cockerell, 1897: *H. cyanophylli* (Signoret, 1869) – OR523700.1; *H. lataniae* (Signoret, 1869) – KY085315.1, KY085015.1, HQ179913.1; *H. rapax* (Comstock, 1881) – KY084977.1, KY085373.1.
Lepidosaphes Shimer, 1868: *Le. beckii* (Newman, 1869) – KY085083.1, KY085383.1, KY085001.1, OR527254.1; *Le. ulmi* (Linnaeus, 1758) – KY085073.1, KY085087.1, KY085094.1, OR916466.1*.
Lopholeucaspis Balachowsky, 1953: *L. japonica* (Cockerell, 1897) – HM474226.1, HM474228.1.
Melanaspis Cockerell, 1897: *Me. corticosa* (Brain, 1919) – OP442086.1.
Morganella Cockerell, 1897: *M. conspicua* (Brain, 1919) – KF461265.1.
Oceanaspidiotus Takagi, 1984: *O. spinosus* (Comstock, 1883) – HM474235.1, HM474236.1.
Parlatoria Targioni Tozzetti, 1868: *Pa. oleae* (Colvee, 1880) – MN102720.1, MN102721.1; *Pa. pergandii* Comstock, 1881 – JQ267369.1; *Pa. proteus* (Curtis, 1843) – HM474246.1, HM474245.1; *Pa. theae* Cockerell, 1896 – HM474247.1, HM474248.1.
Pseudaonidia Cockerell, 1897: *Ps. duplex* (Cockerell, 1896) – HM474322.1.
Pseudaulacaspis MacGillivray, 1921: *P. cockerelli* (Cooley, 1897) – HM474325.1, KX091223.1; *P. pentagona* (Targioni Tozzetti, 1886) – HM474342.1, HM474345.1, KX091220.1, OR915676.1*.
Unaspis MacGillivray, 1921: *U. yanonensis* (Kuwana, 1923) – KX091227.1.

Таблица 1

Перечень исследуемых видов рода *Diaspidiotus* с указанием кода нуклеотидных последовательностей, депонированных в Генбанке

Table 1

List of *Diaspidiotus* species examined, indicating the code of the nucleotide sequences deposited in the GenBank

Название вида	Код Генбанк
<i>D. ancyclus</i> (Putnam, 1878)	KY085092.1, KY085079.1
<i>D. caucasicus</i> (Borchsenius, 1935)	OR800373.1*, OR939592.1*
<i>D. danzigae</i> Kuznetsov, 1976	OR791044.1*, OR822024.1*
<i>D. gigas</i> (Thiem & Gerneck, 1934)	OR758881.1*, OR758902.1*
<i>D. ostreaeformis</i> (Curtis, 1843)	OR759862.1*
<i>D. slavonicus</i> (Green, 1934)	OR943577.1*, OR943576.1*, OR943575.1*
<i>D. zonatus</i> (Frauenfeld, 1868)	OR793307.1*

*Оригинальный материал.

Выравнивание нуклеотидных последовательностей, дизайн праймеров и зондов для трех вариантов ПЦР тест-систем (с электрофоретической детекцией ПЦР-продуктов, с интеркалирующим красителем Sybr Green I и разработанным «Taq-Man» зонда) проводили в программе Unipro Ugene [14]. Далее проводили оценку видоспецифичности разработанных праймеров и зондов для целевого вида *in silico* в программе Primer Blast ГенБанка [12]. Синтез видоспецифичных олигонуклеотидов выполнен компанией АО «ГенТерра» (Россия).

Для оценки видоспецифичности были использованы образцы экстрагированной тотальной ДНК *D. perniciosus* (n = 19) и следующих видов щитовок (n = 15): *Diaspidiotus danzigae*, *D. gigas*, *D. marani*, *D. ostreaeformis*, *D. prunorum*, *D. pyri*, *D. slavonicus*, *D. zonatus*, *Ao. aurantii*, *Ao. orientalis*, *As. nerii*, *Ch. salicis*, *Le. ulmi*, *P. pentagona*, *Pa. pergandii*.

Состав реакционной смеси и температурно-временные условия для трех вариантов ПЦР тест-систем приведены в таблицах 2, 3.

Таблица 2

Состав реакционной смеси для проведения ПЦР

Table 2

PCR reaction mixture composition

Компоненты реакционной смеси	ПЦР с электрофоретической детекцией ПЦР-продуктов	ПЦР в режиме «реального времени» с применением	
		интеркалирующего красителя Sybr Green I	«Taq man» зонда
Кол-во компонентов на 1 образец, мкл			
Микс 10x [*]	–	–	7,5
Микс 5x ^{**}	5,0	5,0	–
Прямой праймер (12,5 pm)	0,3	0,3	0,5
Обратный праймер (12,5 pm)	0,3	0,3	0,5
Зонд (5,0 pm)	–	–	1,0
Вода дистиллированная	18,4	18,4	14,0
Taq ДНК-полимераза (5 е.а./мкл, 1000 е.а.)	–	–	0,5
ДНК	1,0	1,0	1,0

*Состав микса 10x (0,2M Tris-Cl – 1,25 мкл; 0,5M NaCl – 1,25 мкл; 2,5mM смесь dNTP – 2,0 мкл; 50mM MgSO₄ – 3,0 мкл).

**Краситель Sybr Green I должен входить в состав микса 5x и использоваться только в ПЦР в режиме «реального времени».

Температурно-временные условия ПЦР

Table 3

PCR cycling conditions

Температура реакции ПЦР, °С	Время, мин, и кол-во циклов (ц.)					
	ПЦР с электрофоретической детекцией ПЦР-продуктов		ПЦР в режиме «реального времени»			
			интеркалирующий краситель Sybr Green I		зонд	
95	3,0 мин		3,0 мин		3,0 мин	
95	0,3 мин	40 ц.	0,3 мин	30 ц.	0,3 мин	40 ц.
59	1,0 мин		1,0 мин		1,0 мин	
56–95	–		0,05 мин		–	

*Температуры устанавливаются с шагом 0,5°C и используются для определения температуры плавления продуктов ПЦР.

Постановку ПЦР проводили с помощью термоциклеров T-100 (BioRad) и CFX-96 (BioRad). Для ПЦР с электрофоретической детекцией ПЦР-продуктов проводили электрофорез в 1,5%-ном агарозном геле с последующей фотофиксацией результатов в геледокументирующей системе Fusion (Vilber Lourmat). В качестве флуоресцентного красителя использовали dsSafe раствор (Lumiprobe). Для определения размера продукта амплификации применяли маркер длин от 50 до 1500 п.н. (DiaGene, Россия). Фиксацию и интерпретацию результатов ПЦР в режиме «реального времени» осуществляли в программе «Bio-Rad CFX Manager».

Оценку аналитической чувствительности проводили с образцами ДНК *D. perniciosus* разной концентрации (0,1–40,4 нг/мкл). Количественную и качественную оценку выделенной ДНК проводили с помощью измерения концентрации и отношения оптической плотности (A) при длинах волн 260 и 280 нм на приборе NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Коэффициент поглощения при 260 и 280 нм выделенной ДНК в среднем составлял 1,8.

Результаты и их обсуждение

Result and discussion

Первоначально было выполнено множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей фрагмента гена COI исследуемых видов щитовок из базы данных Генбанка с привлечением оригинальных данных для поиска специфичных участков, различающихся по нуклеотидному составу между *D. perniciosus* и нецелевыми видами щитовок. На основе полученных данных была сконструирована видоспецифичная в отношении *D. perniciosus* пара праймеров Dp1-F/ Dp1-R, которая позволяет получить ПЦР-продукт длиной 216 п.н., и зонд Dp1-probe по типу «TaqMan» (табл. 4).

**Нуклеотидные последовательности разработанных праймеров и зонда
для идентификации *D. perniciosus***

Table 4

**Nucleotide sequences of the developed primers and probe
for *D. perniciosus* identification**

Название праймеров и зонда	Нуклеотидная последовательность (5'-3')
Прямой праймер: Dp1-F	AATGATAATATTAATACAGGATGAACATT
Обратный праймер: Dp1-R	TATTGATGTGATTATGATAGATCAGC
Зонд: Dp1-probe	FAM-ACCCTCCATTAATTAATCAAATAATTCATCA-BHQ1

Тестирование пары праймеров Dp1-F/ Dp1-R (*in silico*) на специфичность с помощью программы Primer Blast, реализованной в Генбанке, показало, что различие нуклеотидного состава для прямого праймера Dp1-F в сравнении с аналогичным участком у анализируемых видов в среднем составило 83,3%, для обратного праймера Dp1-R – 76,2%, для зонда Dp1-probe – 84,4%. В целом это свидетельствует о специфичности праймерной системы и зонда в отношении *D. perniciosus*. В случае, когда один праймер демонстрировал относительно низкую степень различия по нуклеотидному составу с последовательностью нецелевого вида, например, *Aonidiella orientalis*, второй праймер и зонд, напротив, характеризовались высокой степенью различия, чем была достигнута специфичность ПЦР-тест-систем.

Апробация праймерной системы Dp1-F/ Dp1-R с применением электрофоретической детекции ПЦР-продуктов продемонстрировала, что ПЦР-продукты размером, соответствующим заявленному в ~216 п.н., были получены только с образцами целевого вида – *D. perniciosus* (рис. 1). Аналитическая чувствительность: положительный результат ПЦР был зафиксирован для всех исследуемых концентраций ДНК *D. perniciosus* в диапазоне от 0,1 до 40,4 нг/мкл (рис. 2). Полученные данные в целом подтверждают результаты тестирования праймерной системы *in silico*.

В дальнейшем апробировали данную пару праймеров для метода ПЦР в режиме «реального времени» с применением интеркалирующего красителя Sybr Green I. В результате наблюдалось накопление ПЦР-продуктов только в случае с образцами ДНК *D. perniciosus* (рис. 3а), температура плавления которых была равна 73,5°C, что является характеристикой специфичности данного метода в отношении целевого объекта (рис. 3б). Проверка аналитической чувствительности метода показала, что положительный сигнал был зафиксирован со всеми исследуемыми вариантами концентрации ДНК *D. perniciosus* (100%-ные концентрации ДНК перечислены на рисунке 2). При этом кривые температуры плавления ПЦР-продуктов достигали пика в диапазоне от 73,0 до 73,5°C (рис. 3с, 3д).

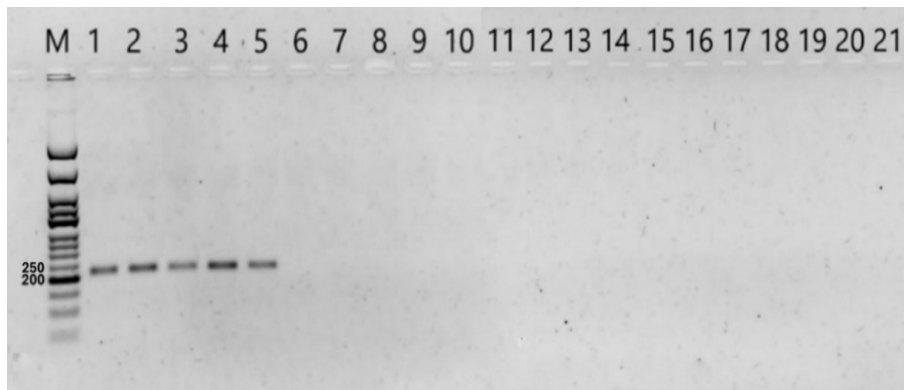


Рис. 1. Электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных с помощью праймеров Dp1-F/ Dp1-R, образцов *D. perniciosus* и исследуемых видов щитовок: 1–5 – *D. perniciosus*; 6 – *D. ostreaeformis*; 7 – *D. prunorum*; 8 – *D. pyri*; 9 – *D. marani*; 10 – *D. gigas*; 11 – *D. slavonicus*; 12 – *D. danzigae*; 13 – *D. zonatus*; 14 – *P. pentagona*; 15 – *Ao. Aurantia*; 16 – *Ao. Orientalis*; 17 – *Le. Ulmi*; 18 – *Ch. Salicis*; 19 – *Pa. Pergandii*; 20 – *As. Nerii*; 21 – отрицательный контроль; М – маркер молекулярного веса

Figure 1. Electrophoregram of PCR products obtained using Dp1-F/Dp1-R primers, *D. perniciosus* samples and other studied Diaspididae species: 1–5 – *D. perniciosus*, 6 – *D. ostreaeformis*, 7 – *D. prunorum*, 8 – *D. pyri*, 9 – *D. marani*, 10 – *D. gigas*, 11 – *D. slavonicus*, 12 – *D. danzigae*, 13 – *D. zonatus*, 14 – *P. pentagona*, 15 – *Ao. aurantii*, 16 – *Ao. orientalis*, 17 – *Le. ulmi*, 18 – *Ch. salicis*, 19 – *Pa. pergandii*, 20 – *As. nerii*, 21 – negative control, М – molecular weight marker

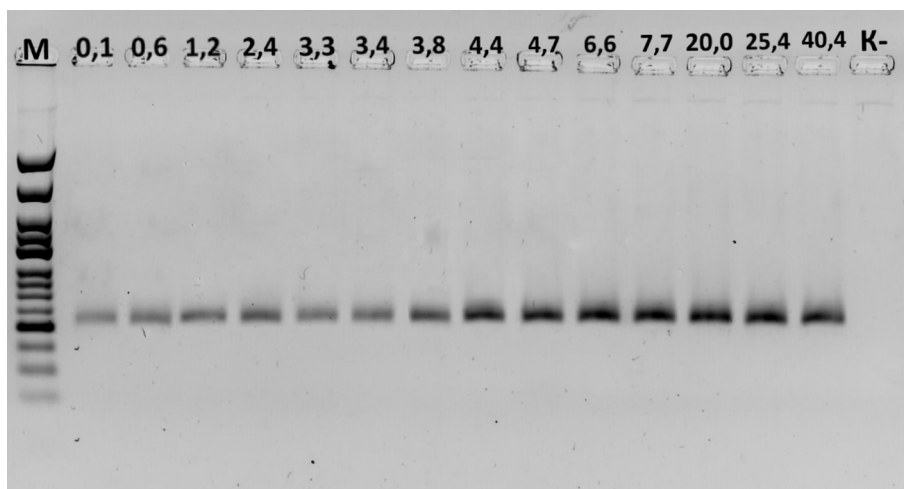


Рис. 2. Электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных с помощью праймеров Dp1-F/ Dp1-R, для образцов *D. perniciosus* с разной концентрацией ДНК (значения указаны над соответствующими образцами, нг/мкл): К – отрицательный контроль; М – маркер молекулярного веса

Figure 2. Electrophoregram of PCR products obtained using Dp1-F/Dp1-R primers for *D. perniciosus* samples with different DNA concentrations (values indicated above the corresponding samples, ng/μl): К – negative control, М – molecular weight marker

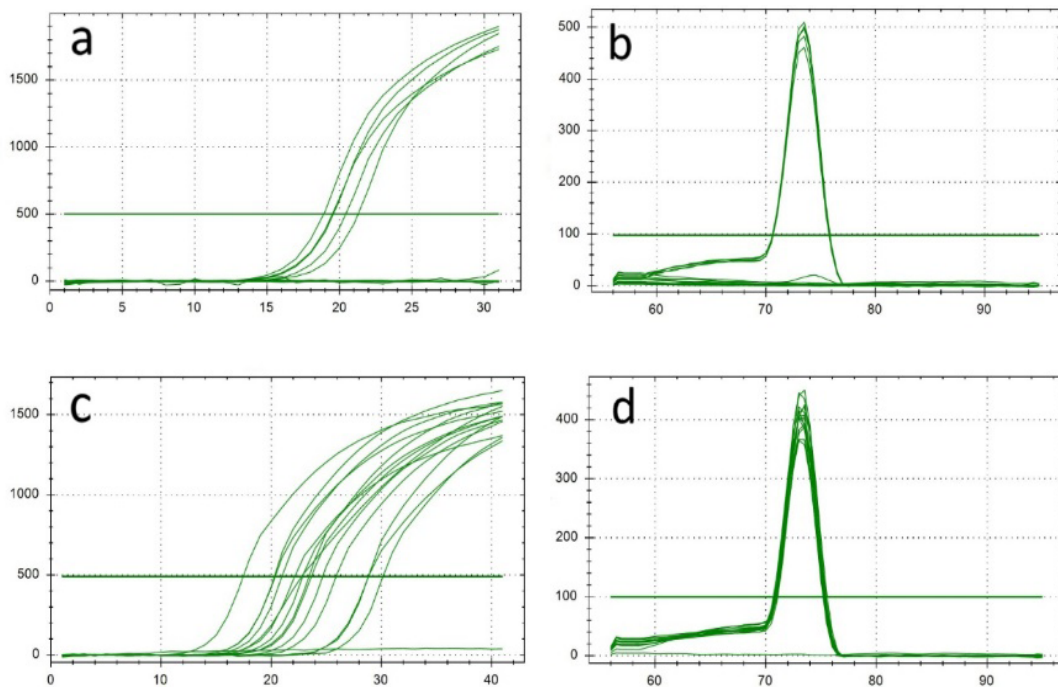


Рис. 3. ПЦР в режиме «реального времени» с использованием интеркалирующего красителя Sybr Green I с праймерами Dp1-F/ Dp1-R для образцов *D. perniciosus* и исследуемых видов щитовок: определение специфичности (а и b) и аналитической чувствительности (с и d); а, с – кривые амплификации: по оси ординат – относительные единицы флуоресценции, по оси абсцисс – количество циклов; b, d – кривые плавления: по оси ординат значения – относительные единицы флуоресценции, по оси абсцисс – температура плавления, °C

Figure 3. Real-time PCR using Sybr Green I intercalating dye with Dp1-F/Dp1-R primers for *D. perniciosus* samples and other studied Diaspididae species: specificity determination (a and b) and analytical sensitivity determination (c and d); a, c – amplification curves: y-axis – relative fluorescence units, x-axis – cycles number; b, d – the melting curves: y-axis – relative fluorescence units, and x-axis – melting temperature, °C

Метод ПЦР в режиме «реального времени» с праймерами Dp1-F/ Dp1-R и зондом Dp1-probe позволил получить положительный результат в виде экспоненциальной кривой флуоресценции только с образцами калифорнийской щитовки (рис. 4). Относительно аналитической чувствительности метода следует указать, что положительная детекция наблюдалась в 100% случаев, в том числе при концентрации ДНК калифорнийской щитовки, равной 0,1 нг/мкл (рис. 5, табл. 5). Разброс в значениях циклов (Cq) от 22,2 до 34,9 при заданном пороге в 400 относительных единиц флуоресценции может быть обусловлен взаимодействием ряда факторов – характеристик исследуемых образцов *D. perniciosus* (табл. 5): различия в концентрациях ДНК; исходное состояние материала щитовок до этапа выделения ДНК; компоненты растения-хозяина из кишечника щитовки, которые могут оказывать влияние на протекание ПЦР; так как прямой связи только с одним из вышеперечисленных факторов выявлено не было.

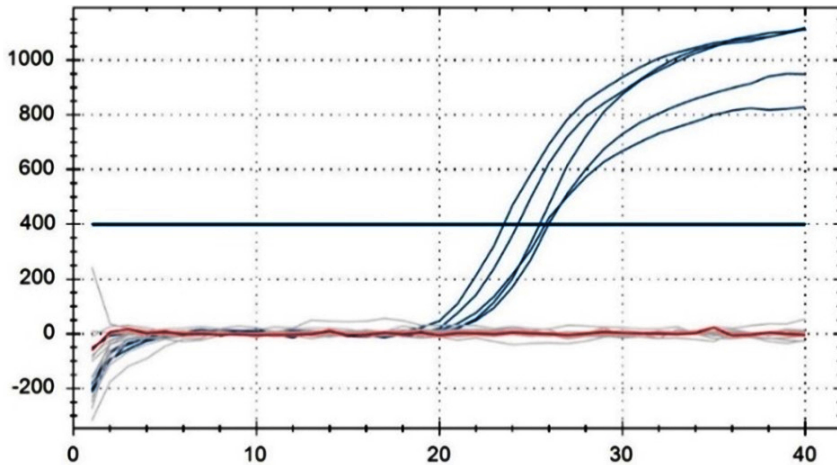


Рис. 4. ПЦР в режиме «реального времени» с разработанными праймерами Dp1-F/ Dp1-R и зондом Dp1-probe (по оси ординат – значения уровня флуоресценции, измеряемые в относительных единицах; по оси абсцисс – количество циклов): синие линии – образцы *D. perniciosus* (1–5, рис. 1), серые линии – образцы других видов Diaspididae (образцы 6–20, рис. 1), красная линия – отрицательный контроль

Figure 4. Real-time PCR with the developed Dp1-F/Dp1-R primers and the Dp1-probe (y-axis – relative fluorescence units; x-axis – cycle number): blue lines – *D. perniciosus* samples (samples 1–5 from Fig. 1), gray lines – samples of other Diaspididae species (samples 6–20 from Fig. 1), the red line – negative control

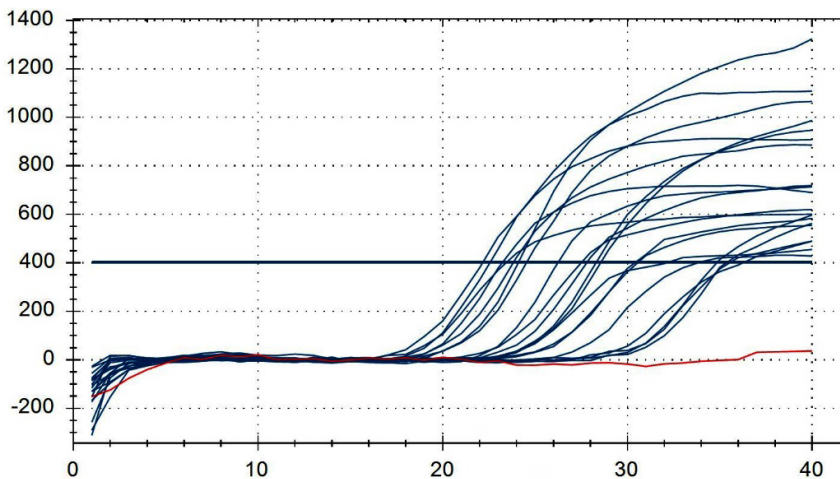


Рис. 5. Результаты ПЦР в режиме «реального времени» с праймерами Dp1-F/ Dp1-R и зондом Dp1-probe для различных концентраций ДНК *D. perniciosus* (по оси ординат – значение уровня флуоресценции, измеряемое в относительных единицах; по оси абсцисс – количество циклов): синие линии – образцы *D. perniciosus*, красная линия – отрицательный контроль

Figure 5. Real-time PCR results with Dp1-F/Dp1-R primers and Dp1-probe for various concentrations of *D. perniciosus* DNA (y-axis – relative fluorescence units; x-axis – cycle number): blue lines – *D. perniciosus* samples, the red line – negative control

**Сопоставление характеристик исследуемых образцов *D. perniciosus*
с результатами ПЦР в режиме «реального времени»**

Table 5

**Comparison of characteristics of the *D. perniciosus* samples
with real-time PCR results**

№ образца	Растение-хозяин	Состояние образцов	Концентрация ДНК, нг/мкл	Значение C_q^{**}
1	<i>Malus domestica</i>	сух.	0,1	34,9
2	<i>Malus domestica</i>	сух.	0,1	35,6
3	<i>Prunus cerasifera</i>	сух.	0,4	32,2
4	<i>Pyrus</i> sp.	сух.	0,5	28,6
5	<i>Prunus</i> sp.	жив.	0,6	28,3
6	<i>Prunus cerasifera</i>	сух.	1,2	24,1
7	<i>Prunus</i> sp.	жив.	2,4	24,5
8	<i>Ribes nigrum</i>	сух.	3,3	26,3
9	<i>Ribes nigrum</i>	сух.	3,4	27,8
10	<i>Malus domestica</i>	сух.	3,4	30,6
11	<i>Malus domestica</i>	сух.	3,8	33,9
12	<i>Malus domestica</i>	сух.	4,4	30,4
13	<i>Ribes nigrum</i>	сух.	4,7	35,4
14	<i>Ribes nigrum</i>	сух.	6,6	36,3
15	<i>Ribes nigrum</i>	сух.	7,7	27,5
16	<i>Malus domestica</i>	сух.	17,4	23,5
17	<i>Prunus</i> sp.	жив.	20,5	22,6
18	<i>Malus domestica</i>	сух.	25,4	23,2
19	<i>Prunus</i> sp.	жив.	40,4	22,2

*жив. – живой; сух. – сухой. Образцы собраны в 2014–2016 гг.

**При пороге 400 относительных единиц флуоресценции (RFU).

Выводы Conclusions

В целях обеспечения карантинных фитосанитарных мер в отношении карантинного объекта ЕАЭС (калифорнийская щитовка) и совершенствования диагностики данного вида вредителя на основе оригинальных исследований были разработаны праймеры Dp1-F/Dp1-R и зонд Dp1-probe для фрагмента митохондриального гена COI.

В результате тестов *in silico* и *in vitro* показано, что данные праймеры и зонд являются видоспецифичными в отношении *D. perniciosus*. На основе разработанных пар праймеров предложены два метода диагностики: с электрофоретической детекцией ПЦР-продуктов и с интеркалирующим красителем Sybr Green I. Кроме того, разработан видоспецифичный зонд по типу «TaqMan» для метода ПЦР в режиме «реального времени». Все используемые методы ПЦР показали хорошую аналитическую чувствительность при тестировании образцов целевого вида с разной концентрацией ДНК в диапазоне от 0,1 до 40,4 нг/мкл. Выбор метода диагностики калифорнийской щитовки на основе разработанных ПЦР-тестов может определяться технической оснащённостью испытательных лабораторий в области карантина растений.

Список источников

1. Данциг Е.М. *Подотряд кокциды (Coccinea). Семейства Phoenicossidae и Diaspididae. Фауна России и сопредельных стран*: Монография. Санкт-Петербург: Наука, 1993. 449 с.
2. *Об утверждении единого перечня карантинных объектов Евразийского экономического союза: решение Совета ЕЭК от 30 ноября 2016 г. № 158* URL: <https://www.alta.ru/tamdoc/16sr0158/?ysclid=mb5jivfniy68790770> (дата обращения: 20.05.2025)
3. *Национальный доклад о карантинном фитосанитарном состоянии территории Российской Федерации в 2024 году*. URL: <https://fsvps.gov.ru/files/nacionalnyj-doklad-o-karantinnom-fitosanitarnom-sostojanii-territorii-rossijsk-oj-federacii-v-2024-godu/> (дата обращения: 16.04.2025)
4. Amouroux P., Crochard D., Germain J., Correa M., et al. Genetic diversity of armored scales (Hemiptera: Diaspididae) and soft scales (Hemiptera: Coccidae) in Chile. *Scientific Reports*. 2017;7(1):1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01997-6>
5. Andersen J., Wu J., Gruwell M., Gwiazdowski R., Santana S. et al. A phylogenetic analysis of armored scale insects (Hemiptera: Diaspididae), based upon nuclear, mitochondrial, and endosymbiont gene sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*. 2010; 57(3): 992-1003. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.05.002>
6. Fita T., Getu E., Wakgari M., Woldetsadike K., Jones P. Molecular identification of white mango scale, *Aulacaspis tubercularis* Newstead (Homoptera: Diaspididae), and its associated natural enemies in western Ethiopia. *International Journal of Tropical Insect Science*. 2021;41(4):2997-3009. <https://doi.org/10.1007/s42690-021-00489-5>
7. Frey J., Frey B. Molecular identification of six species of scale insects (*Quadraspidiotus* sp.) by RAPD-PCR: assessing the field-specificity of pheromone traps. *Molecular ecology*. 1995;4(6):777-780. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1995.tb00279.x>
8. Gruwell M., Morse G., Normark B. Phylogenetic congruence of armored scale insects (Hemiptera: Diaspididae) and their primary endosymbionts from

the phylum *Bacteroidetes*. *Molecular phylogenetics and evolution*. 2007;44(1):267-80. <https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2007.01.014>

9. Morse G., Normark B. A molecular phylogenetic study of armoured scale insects (Hemiptera: Diaspididae). *Systematic Entomology*. 2005;31(2):338-349. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2005.00316.x>

10. Normark B., Okusu A., Morse G., Peterson D. et al. Phylogeny and classification of armored scale insects (Hemiptera: Coccomorpha: Diaspididae). *Zootaxa*. 2019;4616(1):1-98. <https://doi.org/10.11646/ZOOTAXA.4616.1.1>

11. Schneider S., Okusu A., Normark B. Molecular phylogenetics of Aspidiotini armored scale insects (Hemiptera: Diaspididae) reveals rampant paraphyly, curious species radiations, and multiple origins of association with *Melissotarsus* ants (Hymenoptera: Formicidae). *Molecular phylogenetics and evolution*. 2018;129:291-303. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.09.003>

12. NCBI. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (дата обращения: 15.02.2025)

13. PM 7/129 (2) DNA barcoding as an identification tool for a number of regulated pests. *EPPO Bulletin*. 2021;51(1):100-143. <https://doi.org/10.1111/epp.12724>

14. Unipro Ugene. URL: <https://ugene.net/ru/> (дата обращения: 01.02.2025)

References

1. Dantsig E.M. *Coccinea suborder. Phoenicoccidae and Diaspididae families. Fauna of Russia and neighboring countries: a monograph*. St. Petersburg, Russia: Nauka, 1993:449. (In Rus.)

2. *Decision of the EEC Council, No. 158 of November 30, 2016 "On approval of a single list of quarantine objects of the Eurasian Economic Union"*. (In Russ.) URL: <https://www.alt.ru/tamdoc/16sr0158/?ysclid=mb5jivfniy68790770> (accessed: May 20, 2025).

3. *National report on the quarantine phytosanitary state of the territory of the Russian Federation in 2024*. (In Russ.) URL: <https://fsvps.gov.ru/files/nacionalnyj-doklad-okarantinom-fitosanitarnom-sostojanii-territorii-rossijskoj-federacii-v-2024-godu/> (accessed: April 16, 2025).

4. Amouroux P., Crochard D., Germain J., Correa M. et al. Genetic diversity of armored scales (Hemiptera: Diaspididae) and soft scales (Hemiptera: Coccidae) in Chile. *Scientific Reports*. 2017;7(1):1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01997-6>

5. Andersen J., Wu J., Gruwell M., Gwiazdowski R. et al. A phylogenetic analysis of armored scale insects (Hemiptera: Diaspididae), based upon nuclear, mitochondrial, and endosymbiont gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2010;57(3):992-1003. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.05.002>

6. Fita T., Getu E., Wakgari M., Woldetsadike K. et al. Molecular identification of white mango scale, *Aulacaspis tubercularis* Newstead (Homoptera: Diaspididae), and its associated natural enemies in western Ethiopia. *International Journal of Tropical Insect Science*. 2021;41(4):2997-3009. <https://doi.org/10.1007/s42690-021-00489-5>

7. Frey J., Frey B. Molecular identification of six species of scale insects (*Quadraspidotus* sp.) by RAPD-PCR: assessing the field-specificity of pheromone traps. *Molecular ecology*. 1995;4(6):777-780. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1995.tb00279.x>

8. Gruwell M., Morse G., Normark B. Phylogenetic congruence of armored scale insects (Hemiptera: Diaspididae) and their primary endosymbionts from the phylum *Bacteroidetes*. *Molecular phylogenetics and evolution*. 2007;44(1):267-80. <https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2007.01.014>

9. Morse G., Normark B. A molecular phylogenetic study of armoured scale insects (Hemiptera: Diaspididae). *Systematic Entomology*. 2005;31(2):338-349. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2005.00316.x>
10. Normark B., Okusu A., Morse G., Peterson D. et al. Phylogeny and classification of armored scale insects (Hemiptera: Coccomorpha: Diaspididae). *Zootaxa*. 2019;4616(1):1-98. <https://doi.org/10.11646/ZOOTAXA.4616.1.1>
11. Schneider S., Okusu A., Normark B. Molecular phylogenetics of Aspidiotini armored scale insects (Hemiptera: Diaspididae) reveals rampant paraphyly, curious species radiations, and multiple origins of association with *Melissotarsus* ants (Hymenoptera: Formicidae). *Molecular phylogenetics and evolution*. 2018;129:291-303. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.09.003>
12. *NCBI*. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed: February 15, 2025).
13. PM 7/129 (2) DNA barcoding as an identification tool for a number of regulated pests. *EPPO Bulletin*. 2021;51(1):100-143. <https://doi.org/10.1111/epp.12724>
14. *Unipro Ugene*. URL: <https://ugene.net/ru> (accessed: February 01, 2025).

Сведения об авторе

Андрей Владимирович Шипулин, научный сотрудник лаборатории экологии и генетики насекомых и клещей, ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»); 140150, Российская Федерация, Московская область, г.о. Раменское, р.п. Быково, ул. Пограничная, 32; тел.: 8-925-404-40-93; e-mail: schipulin.andrey2016@yandex.ru

Information about the author

Andrey V. Shipulin, Research Associate at the Laboratory of the Ecology and Genetics of Insects and Mites, All-Russian Plant Quarantine Centre; 32 Pogranchnaya St., Bykovo, Ramenskoe, Moscow Region, 140150, Russian Federation; e-mail: schipulin.andrey2016@yandex.ru