

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Видовая идентификация паутиных клещей (Tetranychidae: Tetranychinae): обзор методов

А.В. Разуваева<sup>1</sup>, Е.Г. Ульянова<sup>2</sup>, Е.С. Сколотнева<sup>1</sup>✉, И.В. Андреева<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное исследовательское учреждение Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук, р. п. Краснообск, Новосибирская область, Россия

✉ skolotnevaES@bionet.nsc.ru

**Аннотация.** Паутиные клещи (Acari: Tetranychidae) являются опасными вредителями сельскохозяйственных и декоративных культур; наиболее экономически значимые из них относятся к родам *Tetranychus*, *Eutetranychus*, *Oligonychus* и *Panonychus*. Расширение ареалов распространения, усиление вредоносности и статуса по степени опасности отдельных видов тетранихид, инвазия опасных вредителей в новые регионы представляют серьезную угрозу для фитосанитарного состояния агро- и биоценозов. Различные подходы к видовой диагностике акарофауны определяют достаточно разнообразный спектр существующих в настоящее время методов, общая информация по которым приведена в данном обзоре. Идентификация паутиных клещей по морфологическим признакам, считающаяся основным методом, осложнена вследствие трудоемкости подготовки биоматериала для диагностики и ограниченного числа диагностических признаков. В связи с этим важное значение приобретают биохимические и молекулярно-генетические методы, такие как аллозимный анализ, ДНК-штрихкодирование, полиморфизм длины рестрикционного фрагмента (ПЦР-ПДРФ), подбор видоспецифичных праймеров, ПЦР в реальном времени и изотермическая амплификация. В обзоре пристальное внимание уделено успехам применения этих методов для видовой дискриминации клещей подсемейства Tetranychinae. Для некоторых видов, например обыкновенного паутинового клеща (*Tetranychus urticae*), разработан спектр методов идентификации – от аллозимного анализа до петлевой изотермической амплификации (LAMP), тогда как для многих других видов доступно гораздо меньшее разнообразие подходов. Наибольшей точности в определении паутиных клещей можно добиться, используя комбинацию нескольких методов, например осмотр морфологических признаков и один из молекулярных подходов (ДНК-штрихкодирование, ПЦР-ПДРФ и др.). Обзор может быть полезен специалистам, находящимся в поиске эффективной системы для видовой дискриминации паутиных клещей, а также при разработке новых тест-систем, актуальных для конкретных культур растений или определенного региона.

Ключевые слова: паутиные клещи; молекулярная идентификация; аллозимный анализ; MALDI-TOF MS; ДНК-штрихкодирование; ПЦР-ПДРФ; ITS; COI.

**Для цитирования:** Разуваева А.В., Ульянова Е.Г., Сколотнева Е.С., Андреева И.В. Видовая идентификация паутиных клещей (Tetranychidae: Tetranychinae): обзор методов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(3): 240-249. DOI 10.18699/VJGB-23-30

## Species identification of spider mites (Tetranychidae: Tetranychinae): a review of methods

A.V. Razuvaeva<sup>1</sup>, E.G. Ulyanova<sup>2</sup>, E.S. Skolotneva<sup>1</sup>✉, I.V. Andreeva<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk, Novosibirsk Region, Russia

✉ skolotnevaES@bionet.nsc.ru

**Abstract.** Spider mites (Acari: Tetranychidae) are dangerous pests of agricultural and ornamental crops, the most economically significant of them belonging to the genera *Tetranychus*, *Eutetranychus*, *Oligonychus* and *Panonychus*. The expansion of the distribution areas, the increased harmfulness and dangerous status of certain species in the family Tetranychidae and their invasion of new regions pose a serious threat to the phytosanitary status of agro- and biocenoses. Various approaches to acarofauna species diagnosis determine a rather diverse range of currently existing methods generally described in this review. Identification of spider mites by morphological traits, which is currently considered the main method, is complicated due to the complexity of preparing biomaterials for diagnosis and a limited number of diagnostic signs. In this regard, biochemical and molecular genetic methods such as allozyme analysis, DNA barcoding, restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), selection of species-specific primers and real-time PCR are becoming important. In the review, close attention is paid to the successful use of these methods for species discrimination in the mites of the subfamily Tetranychinae. For some species, e.g., the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*), a range of identification methods has been developed – from allozyme analysis to loop isothermal amplification (LAMP), while for many other species a much smaller variety of approaches is available.

The greatest accuracy in the identification of spider mites can be achieved using a combination of several methods, e.g., examination of morphological features and one of the molecular approaches (DNA barcoding, PCR-RFLP, etc.). This review may be useful to specialists who are in search of an effective system for spider mite species identification as well as when developing new test systems relevant to specific plant crops or a specific region.

Key words: spider mites; species identification; allozyme analysis; MALDI-TOF MS; DNA barcoding; PCR-RFLP; ITS; COI.

**For citation:** Разуваева А.В., Ульянова Е.Г., Сколотнева Е.С., Андреева И.В. Species identification of spider mites (Tetranychidae: Tetranychinae): a review of methods. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(3):240-249. DOI 10.18699/VJGB-23-30

## Введение

Растительноядные клещи наносят значительный ущерб сельскохозяйственным и декоративным культурам. Вредоносность клещей-фитофагов проявляется в снижении урожайности и ухудшении качества растениеводческой продукции, приводит к снижению засухоустойчивости и зимостойкости культур, а также к потере декоративных свойств выращиваемых растений (Devi et al., 2019; Chaires-Grijalva et al., 2021; Obasa et al., 2022; Ulyanova et al., 2022). Изменение погодно-климатических условий практически во всех регионах мира, в том числе в Российской Федерации, способствует более широкому распространению и массовому размножению вредителей, трансформации их географических ареалов, изменению динамики популяций фитофагов и трофических связей с растением-хозяином (Мусолин, Саулич, 2012; Зейналов, 2017; Кошкин и др., 2021), что в полной мере относится и к растительноядной акарофауне (Волкова, Матвейкина, 2016; Зейналов, Орел, 2021). Расширение ареалов обитания, усиление вредоносности, появление резистентных к акарицидам популяций наблюдаются в последнее время у паутиных клещей (Acari: Tetranychidae) (Балькина и др., 2017; Зейналов, Орел, 2021) – одной из основных групп клещей-фитофагов. Фитосанитарная ситуация осложняется из-за высокого риска интродукции карантинных видов с растительным материалом, ввезенным в рамках международной торговли для целей выращивания, размножения и реализации цветочной и другой продукции растительного происхождения (Рак, Литвинова, 2010; Петров и др., 2016; Камаев, 2018; Камаев, Миронова, 2018; Vásquez, Colmenárez, 2020).

Семейство Tetranychidae подразделяется на два подсемейства – *Vryobiinae* и *Tetranychinae* – и включает не менее 71 рода и более 1250 описанных видов, 100 из которых считаются опасными вредителями (Migeon et al., 2010). Наиболее распространенные виды семейства тетраниховых клещей (Tetranychidae) относятся к родам *Tetranychus*, *Eutetranychus*, *Oligonychus* и *Panonychus* (Ben-David et al., 2007). В частности, особо значимыми по вредоносности видами являются обыкновенный паутиный *Tetranychus urticae* Koch. и европейский красный плодовый *Panonychus ulmi* Koch. клещи (Ben-David et al., 2007). *Tetranychus urticae* распространен повсеместно и повреждает широкий круг сельскохозяйственных культур, а также декоративные древесные и травянистые растения из разных ботанических семейств. При этом ареалы обитания обыкновенного паутинового клеща и других представителей этого семейства в агро- и биоценозах открытого грунта постепенно расширяются и охватывают все большие

территории России (Камаев, Карпун, 2020; Ulyanova et al., 2022). Усиливается вредоносность паутиных клещей, повреждающих хвойные растения. Так, в условиях юга Западной Сибири приобрел практическое значение еловый паутиный клещ *Oligonychus ununguis* Jacobi, повреждающий обыкновенную и сибирскую ели, пихту сибирскую, используемые для озеленения урбанизированных территорий (Ulyanova et al., 2022). Возрастает риск завоза с импортным посадочным материалом имеющих статус карантинных вредителей. Например, в Краснодарском крае обнаружен инвазионный для данного региона вид *Oligonychus hondoensis* Ehara (Камаев, Карпун, 2020).

Правильная идентификация видов паутиных клещей имеет важное научное и практическое значение для исследования динамики популяций, своевременного контроля их численности в агро- и биоценозах, а также для устранения международных торговых барьеров в отношении карантина растений (Li et al., 2015). В настоящее время для диагностики представителей семейства Tetranychidae используется несколько методов, включая идентификацию по морфологическим характеристикам взрослых особей, биохимические (на основе белков) и молекулярные (на основе ДНК) методы. Цель статьи – обзор современных методов и подходов, применяемых для идентификации наиболее распространенных видов тетраниховых клещей (Tetranychidae: Tetranychinae).

## Морфологические методы

В настоящее время идентификация растительноядных клещей проводится преимущественно традиционными методами, основанными на визуальном осмотре морфологических признаков. Основы морфологического метода при определении акарофауны паутиных клещей были заложены в бывшем СССР видными учеными В.И. Митрофановым, И.З. Лившиц, З.И. Струнковой, внесшими огромный вклад в создание целого направления научных исследований по видовой диагностике тетранихид (Митрофанов и др., 1987). Дальнейшее развитие этого метода нашло свое продолжение в научно-исследовательских и прикладных работах С.Я. Попова с коллегами (Попов, 2013), А.К. Ахатова (2016) и др., не потерявших своей актуальности до сих пор.

Определение тетраниховых клещей до рода и вида обычно осуществляется по форме и размеру гениталий самцов (Morphological Identification..., 2014). Микроскопические размеры клещей, незначительные различия диагностических признаков у видов, относящихся к одному роду, трудоемкость в подготовке биоматериала для анализа значительно осложняют идентификацию клещей (Коноплев

и др., 2017). Недостатком метода является также невозможность определения вида по другим стадиям развития клещей (яйца, личинки, нимфы), так как диагностические отличия имеются только у взрослых особей. Кроме того, для некоторых близкородственных видов морфологическая идентификация практически невозможна; например, род *Amphitetranychus* включает три вида, и только один из них, *A. viennensis*, можно распознать по форме эдеагуса, тогда как *A. quercivorus* и *A. savenkoeae* трудно разделить по этому признаку (Arabuli et al., 2019).

Микропрепараты клещей готовят с использованием модифицированных сред Фора–Берлезе, из которых самая распространенная для фиксации растительных клещей – среда Хойера (Walter, Krantz, 2009). В ее состав входит 50 мл дистиллированной воды, 30 мл гуммиарабика, 200 мл хлоралгидрата, 20 мл глицерина. Клещей помещают в каплю среды на предметное стекло и накрывают покровным стеклом. Препарат прогревают при температурах 40–60 °С, при этом время экспозиции варьирует от 24 ч до 5–10 дней либо составляет 3 ч при 70–85 °С (Камаев, 2019), что способствует просветлению и распрямлению объекта, после чего можно приступить к его идентификации. При необходимости длительного хранения микропрепаратов рекомендуется дальнейшее их просушивание в термостате при температуре 40–45 °С в течение 5–7 суток. После этой процедуры края покровных стекол заливают лаком. Подготовленные таким образом микропрепараты могут храниться бесконечно долго. Идентификацию клещей проводят при проходящем свете с помощью фазово-контрастного микроскопа при увеличении 10–1000 раз.

В целом морфологический метод требует значительных временных затрат, высокой квалификации и опыта специалистов. В некоторых случаях идентификация клещей по морфологическим признакам дополняется экологическими и поведенческими реакциями вида, а также информацией по растению-хозяину, на котором был найден вид, что облегчает определение вида (Ахатов, 2016). Некоторые особенности жизненного цикла, такие как диапаузирующая фаза, места зимовки, выход из диапаузы, концентрация на определенных органах растений-хозяев, специфика симптомов повреждений, могут сыграть важную роль в диагностике вида.

### Скрещивание видов

Генетическая несовместимость при скрещивании близкородственных видов тетраниховых клещей считается одним из лучших критериев для их дискриминации. Репродуктивные барьеры могут быть обусловлены либо морфологическими особенностями (величиной бородки эдеагуса, превышающей размеры эпигины самки), либо гибелью зигот, что отражается на жизнеспособности яиц или проявляется в различном соотношении полов в потомстве. Так, эксперименты отечественных исследователей по скрещиванию между видами *Tetranychus atlanticus*, *T. urticae* и *T. sawzdargi* показали их полную генетическую изоляцию (Попов, 2013). Репродуктивная изоляция двух морфологически близких видов *Amphitetranychus* spp., проявившаяся в отсутствии женского потомства, была под-

тверждена при реципрокном скрещивании *A. savenkoeae* и *A. quercivorus* (Arabuli et al., 2019).

Сочетание морфологического метода диагностики паутинных клещей с результатами скрещиваний близких или отдаленных видов, по мнению ряда ученых (Попов, 2013; Arabuli et al., 2019), является надежным критерием для идентификации видов. Однако стоит отметить, что изучение генетической совместимости путем скрещивания видов применимо только в научных целях. Для практической деятельности этот метод неприемлем.

### Биохимические методы

Одним из биохимических методов идентификации видов паутинных клещей является **аллозимный анализ**. В основе метода лежит электрофорез белка, который позволяет эффективно выявлять полиморфизм энзимов (Navajas, Fenton, 2000). Для выполнения аллозимного анализа отдельную особь гомогенизируют, выделяют белковый экстракт и подвергают его электрофорезу. Под действием электрического поля белки разделяются в соответствии с размером и суммарным электрическим зарядом. После электрофореза гель гистохимически окрашивают для выявления определенных ферментов. По числу и расположению окрашенных фракций в геле можно судить об аллелях, кодирующих данный фермент у каждой отдельной особи (Кутлунина, Ермошин, 2017). Для корректной идентификации важно выбирать ту ферментную систему, в которой не будет изменчивости в полосовых паттернах внутри вида (полиморфные аллели) и общих полос у разных видов (Gotoh et al., 2007).

Аллозимный анализ широко использовался для идентификации насекомых (Turak, Hales, 1994) и иксодовых клещей (Lampo et al., 1997). Имеется опыт применения данного метода и для идентификации паутинных клещей, при этом часто используют такие ферменты, как эстеразу, фосфоглюкозомеразу и малатдегидрогеназу (Enohara, Amano, 1996; Goka, Takafuji, 1998; Gotoh et al., 2004, 2007; Arabuli et al., 2019). Впервые при помощи аллозимного анализа эстераз были идентифицированы паутинные клещи *Panonychus citri* и *P. mori* (Osakabe, 1987). Позже было показано, что этим же методом можно определять еще три вида клещей рода *Panonychus*, обитающих в Японии (Gotoh, 1992) (см. таблицу). Т. Gotoh с коллегами (Gotoh et al., 2007), используя зимограммы эстеразы, смогли различить самок четырех видов рода *Tetranychus*, а на основе анализа изоферментов фосфоглюкомутазы – все 13 японских видов рода *Tetranychus* (см. таблицу). Аллозимный анализ на основе эстераз использовали также для видовой диагностики представителей рода *Amphitetranychus* (Arabuli et al., 2019). Полученные зимограммы эстераз были видоспецифичными и позволяли с уверенностью различить все три вида (см. таблицу).

Таким образом, аллозимный анализ является эффективным инструментом для идентификации видов паутинных клещей и обладает значительно большей разрешающей способностью, чем разнообразие по морфологическим признакам. Однако он не оценивает все возможные варианты аллелей, присутствующие в популяциях (Алтухов, 2003).

Другой биохимический метод, предложенный для идентификации паутиных клещей, – **времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией** (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) (Kajiwara et al., 2016). MALDI-TOF MS хорошо зарекомендовал себя для идентификации видов микроорганизмов (Singhal et al., 2015). В последние годы этот метод был использован также по отношению к вредителям растений и насекомым, например нематодам, плодовым мухам *Drosophila*, комарам и др. (Ahmad et al., 2012).

Идентификация видов при помощи MALDI-TOF MS-типирования достигается путем сопоставления спектров исследуемых образцов с образцами спектральной базы данных, созданной на основе ранее идентифицированных организмов. Предоставляемые производителями приборной базы данных на данный момент не содержат референсных спектров для вредителей и паразитов растений, однако программное обеспечение приборов, как правило, позволяет интегрировать свои собственные референсные спектры в существующие базы данных и впоследствии осуществлять автоматизированное сравнение (Murugaiyan, Roesler, 2017). Для создания референсных спектров надо использовать образцы, видовая принадлежность которых установлена, например, при помощи морфологических методов.

Одним из важных преимуществ MALDI-TOF MS по сравнению с другими методами идентификации является быстрое время пробоподготовки и проведения испытания (Murugaiyan, Roesler, 2017). Для идентификации достаточно одной особи, из которой предварительно должен быть выделен белковый экстракт при помощи 70 % муравьиной кислоты и ацетонитрила, или клещ может быть напрямую расположен на металлической мишени прибора, куда добавляется муравьиная кислота и ацетонитрил, а затем и матричный раствор (Kajiwara et al., 2016). Главный недостаток метода – высокая стоимость прибора, но при этом цена одного анализа весьма низкая и складывается из стоимости матричного раствора и калибровочного стандарта (при условии многоразовой стальной плашки для образцов).

Н. Kajiwara с коллегами (Kajiwara et al., 2016) показали, что близкородственные виды паутиных клещей рода *Tetranychus* (см. таблицу) демонстрируют различные масс-спектры, позволяющие их идентифицировать. Видовая идентификация выполнялась путем сравнения трех основных спектральных пиков в диапазоне  $m/z$  от 2000 до 10000, соответствующих рибосомальным белкам. У взрослых особей обоих полов все три пика дифференцировались, что позволило отнести их к одному виду. В случае клещей на стадии нимфы можно было идентифицировать только два пика из трех основных. Минорные пики были специфичными к полу или к стадии развития и для идентификации не применялись (Kajiwara et al., 2016).

В целом MALDI-TOF MS является перспективным методом идентификации паутиных клещей, но его применение пока ограничено и требует дальнейших исследований. В частности, возможно наличие спектральных различий между географически разными популяциями, что было показано для некоторых насекомых (Murugaiyan, Roesler,

2017) и ссылки в статье). Предполагается также, что на спектры одного вида может оказывать влияние растение, на котором питался клещ (Kajiwara et al., 2016).

### Молекулярные методы

Наряду с биохимическими применяют молекулярные методы на основе последовательности ДНК. Участки ДНК, амплифицированные методом ПЦР, могут служить биологическими штрихкодами для определения вида, к которому принадлежит образец (Hajibabaei et al., 2007). В качестве таких штрихкодов выступают последовательности ядерного и митохондриального генома. В пределах кластера рибосомной ДНК чередуются более и менее консервативные участки (гены 18S, 5.8S, 28S рРНК и внутренние транскрибируемые спейсеры 1, 2 (ITS1, ITS2) соответственно), что дает возможность подбирать различные маркерные последовательности для разделения таксонов разного ранга. Последовательности генов 18S и 28S рДНК используются для сравнения филогенетически удаленных таксонов (Matsuda et al., 2014), а области ITS эффективны для различения видов и даже популяций (Hillis, Dixon, 1991; Hurtado et al., 2008). Среди митохондриальных генов для идентификации видов и анализа филогенетических взаимоотношений применяется последовательность гена субъединицы I цитохром-с оксидазы (*COI*). Помимо фрагмента Фолмера (Barcode of life, BOLD, Folmer et al., 1994), который является 5'-концевой последовательностью гена *COI*, в целях штрихкодирования паутиных клещей используют и другие последовательности гена (Hinamoto et al., 2007; Ros, Breeuwer, 2007; Matsuda et al., 2013; Inak et al., 2022).

В статье (Ben-David et al., 2007) авторы применяли последовательность ITS2 в качестве штрихкода, с помощью которого различили 16 видов паутиных клещей семейства Tetranychidae, обитающих в Израиле (см. таблицу). Последовательность штрихкода каждого вида была однозначно отличима от всех других (Ben-David et al., 2007). Эффективность штрихкодов для видовой идентификации была также подтверждена в ходе определения видов паутиных клещей, собранных на сельскохозяйственных полях во Вьетнаме, с использованием фрагмента гена *COI* (Hinamoto et al., 2007) (см. таблицу).

Результаты показали и ограничения: некоторые образцы не могли быть классифицированы из-за отсутствия информации о последовательности в базах данных, другие виды невозможно было однозначно идентифицировать по последовательности ДНК, например *T. urticae* и *T. turkestanii*, *T. neocaledonicus* и *T. gloveryi*. Данные о невозможности разделения на основе последовательности гена *COI* *T. urticae* и *T. turkestanii* подтверждены также на клещах, собранных в разных регионах России и Турции (Коноплев и др., 2017; Inak et al., 2022). Эти ограничения могут быть преодолены путем дальнейшего накопления данных о последовательностях различных участков ДНК из морфологически идентифицированных образцов. Т. Matsuda с коллегами (Matsuda et al., 2013) идентифицировали виды клещей рода *Tetranychus*, определяя последовательности ITS и гена *COI*. Авторы пришли к выводу, что 10 из 13 видов японских клещей рода *Tetranychus* могут быть дифференцированы с помощью последовательности ITS,



а последовательность гена *COI* позволяет определить все 13 видов (см. таблицу).

В отличие от рода *Tetranychus*, где некоторые виды невозможно различить на основе последовательностей ДНК, для рода *Oligonychus* данный метод показал свою эффективность (Matsuda et al., 2012). Авторы сообщили, что при помощи любой из последовательностей – гена *COI*, ITS и 28S рДНК – можно разделить все 17 японских видов, включая те, которые сложно дифференцировать по морфологическим признакам, такие как *O. castaneae* и *O. coffeae* (см. таблицу). Молекулярный анализ последовательности гена *COI* клещей рода *Amphitetranynchus* показал, что она эффективна для идентификации всех трех видов (Arabuli et al., 2019) (см. таблицу).

Таким образом, метод штрихкодирования является эффективным инструментом для видовой идентификации отдельных родов паутиных клещей, таких как *Oligonychus*, *Amphitetranynchus*. Некоторые близкородственные виды (например, из рода *Tetranychus*) могут быть неотличимы друг от друга по последовательностям штрихкодов, как это показано для видов *T. kanzawai*, *T. parakanzawai* и *T. ezoensis*, которые неотличимы по последовательности ITS (Matsuda et al., 2013), и видов *T. urticae* и *T. turkestanii*, не различающихся по последовательности гена *COI* (Hinomoto et al., 2007; Коноплев и др., 2017). Для таких видов нужно подбирать другие маркерные гены.

Стремление к уменьшению времени на анализ привело к развитию более быстрых методов идентификации паутиных клещей. Одним из таких является **полиморфизм длины рестрикционного фрагмента после ПЦР** (ПЦР-ПДРФ, PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP). Суть его заключается в том, что участки геномной ДНК (ядерной или митохондриальной), амплифицированные методом ПЦР, подвергаются гидролизу эндонуклеазами рестрикции. Продукты рестрикции в дальнейшем анализируются при помощи гель-электрофореза, и на основе этого делается вывод о наличии или отсутствии сайта рестрикции у данного образца и, как следствие, о видовой принадлежности.

ПЦР-ПДРФ широко применяется для идентификации видов различных организмов (Ratcliffe et al., 2003; Han et al., 2004; Alam et al., 2007). К паутиным клещам метод ПДРФ был впервые применен для различения трех видов рода *Panonychus* и *T. urticae* (Osakabe, Sakagami, 1994) (см. таблицу). Позже удалось дифференцировать *T. urticae* и *T. pueraricola* с помощью ПЦР-ПДРФ, используя область ITS2 (Gotoh et al., 1998). В исследовании (Hurtado et al., 2008) авторы разработали систему ПЦР-ПДРФ фрагмента ITS (ITS1, 5.8S рДНК, ITS2) для идентификации пяти видов паутиных клещей, которые обитают в цитрусовых садах Испании (см. таблицу). При этом самым вредоносным из них является обыкновенный паутиный клещ (*T. urticae*), что делает необходимым быстрое выявление его среди других видов. Паттерн фрагментов рестрикции ферментом *RsaI* отделял *T. urticae* от остальных изучаемых видов, а гидролиз двумя другими ферментами позволял определить остальные четыре вида (Hurtado et al., 2008). Метод ПЦР-ПДРФ на основе ITS областей используется в японском отделе карантина импортных растений (Arimoto et al., 2013; Li et al., 2015) и позволяет определять все

14 видов паутиных клещей, встречающихся в Японии, в том числе пять экзотических видов (Osakabe et al., 2002, 2008; Arimoto et al., 2013) (см. таблицу). ПЦР-ПДРФ в области *COI* успешно использован для идентификации четырех видов паутиных клещей, обитающих на маниоке в Колумбии (Ovalle et al., 2020) (см. таблицу).

ПЦР-ПДРФ – относительно недорогой и эффективный метод диагностики паутиных клещей, применяемый во многих странах по всему миру (Hurtado et al., 2008; Arimoto et al., 2013; Ovalle et al., 2020). Однако он может быть применен только для тех видов, для которых данная методика была отработана, например, для идентификации клещей на территории, видовой состав которой хорошо установлен. При добавлении в систему новых видов надо анализировать их ПДРФ-паттерн, и в случае совпадения паттерна с уже имеющимися систему следует модифицировать, подбирая другие диагностические рестриктазы. Также возможна варибельность паттерна ПДРФ среди разных популяций одного и того же вида, которая связана с нуклеотидными заменами в сайте рестрикции (Arimoto et al., 2013).

Другой подход для быстрой идентификации клещей – подбор **видоспецифичных праймеров**. Области ДНК, в которых определены праймеры, должны быть общими для определяемых видов, но сами последовательности должны различаться между видами одного рода (Shim et al., 2016). При этом могут быть использованы как целые пары видоспецифичных праймеров, так и пары, в которых один праймер универсальный, а второй – уникальный для конкретного вида. Такие праймеры повышают точность и скорость определения видов паутиных клещей на основе ПЦР, но их разработка является нетривиальной задачей. Т.М. Khaing с коллегами (Khaing et al., 2014) удалось подобрать пары видоспецифичных праймеров к области ITS2 для четырех видов паутиных клещей, относящихся к роду *Panonychus* (см. таблицу). Позже были разработаны видоспецифичные праймеры для паутиных клещей рода *Tetranychus* (см. таблицу), распространенных в Корее и морфологически очень схожих (Shim et al., 2016).

Объединение нескольких видоспецифичных праймеров в одной пробирке позволяет применить **мультиплексный подход** для определения сразу нескольких видов. При этом температура плавления праймеров должна быть высокой, а образующиеся ампликоны короткими, но разными по длине. Для проведения мультиплексной ПЦР необходим подбор условий амплификации, таких как соотношение пар праймеров и время элонгации (Zélé et al., 2018). F. Zélé с соавторами (Zélé et al., 2018) разработали и успешно мультиплексировали в одной реакции праймеры, комплементарные рибосомному локусу, для идентификации наиболее распространенных паутиных клещей, встречающихся в Юго-Западной Европе (см. таблицу). Мультиплексная ПЦР также была использована для дискриминации двух основных видов паутиных клещей, встречающихся в тепличных хозяйствах Ирана, – *T. urticae* и *T. turkestanii* (Sinaie et al., 2018).

Применение для видовой идентификации **ПЦР в реальном времени** позволяет сократить время на анализ за счет отсутствия необходимости в проведении гель-электрофореза, поскольку накопление ПЦР-продукта

отслеживается непосредственно во время реакции при помощи оптических датчиков, вмонтированных в амплификатор. Для детекции ПЦР-продукта используют два типа меток: интеркалирующие агенты (например, SYBR Green) или модифицированные олигонуклеотиды, содержащие флуорофоры (ДНК-зонды) (Бикбулатова и др., 2012). Кроме того, ПЦР-анализ в реальном времени сочетает этапы отжига праймеров и элонгации, что приводит к более короткому времени реакции, чем в случае обычной ПЦР (Li et al., 2015).

D. Li с коллегами (Li et al., 2015) разработали систему детекции *T. urticae* среди других близкородственных видов при помощи TaqMan ПЦР, которая оказалась высоко-специфичной и надежной. TaqMan – один из вариантов гибридных ДНК-зондов, олигонуклеотид, комплементарный внутреннему участку амплифицируемого фрагмента ДНК, меченный по концам флуорофорами – репортером и гасителем. Когда они находятся на одном зонде, гаситель поглощает сигнал от репортера. Во время амплификации движущаяся по ДНК полимераз разрушает зонд, репортер и гаситель отдаляются друг от друга, и флуоресценция репортера становится заметной (Бикбулатова и др., 2012). Видоспецифичные праймеры и зонд были подобраны к последовательности ITS1 *T. urticae*, поскольку у *T. urticae* она содержала больше внутривидовых полиморфизмов, чем широко применяемая для филогении и идентификации видов *Tetranychus* последовательность ITS2 (Li et al., 2015).

Другой коллектив авторов (Chen et al., 2020) предложил видоспецифичные зонды TaqMan для идентификации паутинных клещей, обитающих на хлопковых полях Австралии (см. таблицу), и подобрал условия их использования в одной пробирке (мультиплексный подход). Важной особенностью такого подхода является возможность его распространения при незначительной модификации на другие виды паутинных клещей. Поскольку для амплификации применяется универсальная для паутинных клещей пара праймеров, при добавлении в тест-систему еще одного вида нужно разработать и добавить для него видоспецифичный зонд и подобрать условия реакции (Chen et al., 2020). Авторы использовали в одной реакции ДНК-зонды для трех видов клещей и считают, что можно увеличить их количество до пяти (добавить или заменить на ДНК-зонды для необходимых видов), что позволит диагностировать до пяти различных видов клещей в рамках одной ПЦР.

Еще один метод, который может быть применен для целей идентификации видов, это **петлевая изотермическая амплификация** (loop mediated isothermal amplification, LAMP) (Tomita et al., 2008). В отличие от классической ПЦР, в петлевой изотермической амплификации используется другая термостабильная полимераз с высокой вытесняющей способностью, которая может сама вытеснять вторую цепь без термической денатурации. Поэтому реакция LAMP проходит при одной и той же температуре (60–65 °C) и не требует наличия амплификатора. Другой особенностью LAMP является то, что в ходе реакции используются не два, а четыре или шесть праймеров, что определяет ее большую специфичность (Notomi et al., 2000). Однако подбор праймеров для LAMP представляет

собой довольно трудоемкую задачу. Детекцию продукта реакции изотермической амплификации возможно проводить несколькими способами, в том числе невооруженным глазом при помощи добавления флуоресцентного красителя, который будет флуоресцировать в случае прохождения реакции (Tomita et al., 2008). Таким образом, метод не только не требует специального оборудования или специально обученных специалистов, но и подходит для крупномасштабных полевых исследований (Hsieh et al., 2012; Sinaie et al., 2019).

Как хорошо зарекомендовавший себя метод, LAMP имеет широкий спектр применений, в том числе для идентификации возбудителей болезней растений, видов насекомых (Ahuja, Somvanshi, 2021; Dermauw et al., 2022). Применительно к диагностике обыкновенного паутинного клеща был разработан высокочувствительный метод, объединяющий ПЦР и LAMP (ПЦР-LAMP) (Sinaie et al., 2019). Перед выполнением изотермической амплификации выполнялась стандартная ПЦР, что позволяло уменьшить долю ложноотрицательных результатов и увеличить чувствительность анализа LAMP. Авторы показали, что ПЦР-LAMP является быстрым и надежным методом обнаружения биоматериала *T. urticae*.

## Заключение

Обзор существующих в настоящее время методов диагностики особо значимых по вредоносности видов растительных клещей (Tetranychidae: Tetranychinae) показал, что накоплено большое разнообразие подходов, которые можно применять по выбору в зависимости от целей видовой диагностики. Морфологические методы, несмотря на трудоемкость выполнения предварительных операций по подготовке клещей для анализа, до сих пор остаются основными в определении этой группы фитофагов. Однако разрабатываемые в последние десятилетия новые подходы в области видовой диагностики живых организмов, основанные на биохимических и молекулярных маркерах, открывают еще большие возможности для быстрой и точной идентификации видов. Так, видовая принадлежность некоторых видов паутинных клещей, например *T. urticae*, с уверенностью может быть установлена при помощи одного из молекулярных подходов (штрихкодирование, ПЦР-ПДРФ, TaqMan ПЦР и др.). В то же время некоторые другие виды на данный момент не удалось диагностировать на основе последовательностей ДНК. В таких случаях оправдано применение сразу нескольких методов идентификации. Комплексный подход использовался для диагностики видов рода *Amphitetranychus* (Arabuli et al., 2019), где морфологическая характеристика была дополнена биохимическими, молекулярными методами и экспериментами по скрещиванию. Важно отметить, что несколько подходов могут быть реализованы на одной и той же особи при условии использования методов выделения ДНК без разрушения образца (Khaing et al., 2013; Shim et al., 2016) либо использования целого клеща в качестве матрицы для ПЦР (direct PCR) (Sakamoto, Gotoh, 2017) и последующей проверки морфологических признаков. После данных манипуляций образцы сохраняют неповрежденные морфологические признаки, включая спинные щетинки и эдеагус (Sakamoto, Gotoh, 2017).

## Список литературы / References

- Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. М.: Академкнига, 2003.  
[Altukhov Yu.P. Genetic Processes in Populations. Moscow: Akademkniga Publ., 2003. (in Russian)]
- Ахатов А.К. Практическое пособие по идентификации клещей и насекомых в овощных теплицах. М.: Т-во науч. изд. КМК, 2016.  
[Akhatov A.K. Guide to the Identification of Acarids and Insects in Vegetable Greenhouses. Moscow: KMK Publ., 2016. (in Russian)]
- Балыкина Е.Б., Ягодина Л.П., Рыбарева Т.С., Балицкий Н.В. Влияние акарицидов на изменение структуры акарокомплекса клещей-фитофагов. *Бюл. Гос. Никитского ботан. сада*. 2017; 123:58-64.  
[Balykina E.B., Yagodinskaya L.P., Rybareva T.S., Balitsky N.V. Influence of acarocides on the structure of a phytovorous acarid complex. *Byulleten Gosudarstvennogo Nikitskogo Botanicheskogo Sada = Bulletin of the Nikita Botanical Garden*. 2017;123:58-64. (in Russian)]
- Бикбулатова С.М., Чемерис Д.А., Никоноров Ю.М., Машков О.И., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис А.В., Вахитов В.А. Способы детекции результатов полимеразной реакции в режиме реального времени. *Вестн. Башк. ун-та*. 2012;17(1):59-67.  
[Bikbulatova S.M., Chemeris D.A., Nikonorov Yu.M., Mashkov O.I., Garafutdinov R.R., Chemeris A.V., Vakhitov V.A. Methods for detecting polymerase chain reaction in real-time mode. *Vestnik Bashkirskogo Universiteta = Herald of the Bashkir State University*. 2012;17(1):59-67. (in Russian)]
- Волкова М.В., Матвейкина Е.А. Структурные изменения в комплексе растительноядных клещей на промышленных виноградниках Крыма. *Плодоводство и виноградарство Юга России*. 2016;38(2):130-139.  
[Volkova M.V., Matveikina E.A. Structural changes in the phytophagous mite complex in the commercial vineyards of the Crimea. *Plodovodstvo i Vinogradarstvo Yuga Rossii = Fruit Growing and Viticulture of South Russia*. 2016;38(2):130-139. (in Russian)]
- Зейналов А.С. Экологические и фитосанитарные последствия изменения климата в насаждениях плодовых культур. *Venexi sovrem. nauki*. 2017;2(9):94-100.  
[Zeynalov A.S. Ecological and phytosanitary consequences of climate change in the plantings of fruit cultures. *Uspekhi Sovremennoy Nauki = Modern Science Success*. 2017;2(9):94-100. (in Russian)]
- Зейналов А.С., Орел Д.С. Изменение видового состава, биоэкологии и вредоносности основных фитофагов яблони в Центральном районе Нечерноземной зоны России под влиянием климатических факторов. *Вестн. КазГАСУ*. 2021;16(1):15-21. DOI 10.12737/2073-0462-2021-15-21.  
[Zeynalov A.S., Orel D.S. Change in species composition, bioecology and harmfulness of main applian phytophages in the Central Region of the Non-Black Earth Zone of Russia under the influence of climate factors. *Vestnik Kazanskogo GAU = Vestnik of the Kazan State Agrarian University*. 2021;16(1):15-21. DOI 10.12737/2073-0462-2021-15-21. (in Russian)]
- Камаев И.О. Паутиные клещи рода *Oligonychus* (Acari: Tetranychidae), встречающиеся на посадочном материале хвойных растений. В: X Чтения памяти О.А. Катаева. Дендробионтные беспозвоночные животные и грибы и их роль в лесных экосистемах. Т. 1. Насекомые и прочие беспозвоночные животные: Материалы междунар. конф. С.-Петербург, 22–25 окт. 2018 г. СПб., 2018;44.  
[Kamayev I.O. *Oligonychus* (Acari: Tetranychidae) mites occurring in conifer planting material. In: Lectures in memoriam O.A. Kataev. Dendrobiont Invertebrates and Fungi and Their Role in Forest Ecosystems. Vol. 1. Insects and other invertebrates. Proceed. of the int. conf. St. Petersburg, Oct. 22–25, 2018. St. Petersburg, 2018;44. (in Russian)]
- Камаев И.О. Подходы к диагностике паутиных клещей (Acari: Tetranychidae) в фитосанитарной практике. В: Мониторинг и биологические методы контроля вредителей и патогенов древесных растений: от теории к практике. Материалы Второй Всерос. конф. с междунар. участием. Москва, 22–26 апр. 2019 г. М.; Красноярск, 2019;82.  
[Kamayev I.O. Approach to diagnostics of spider mites (Acari: Tetranychidae) in phytosanitary practice. In: Monitoring and Biological Control Methods of Woody Plant Pests and Pathogens: From theory to practice. Proceed. of Second int. conf. Moscow, April 22–26, 2019. Moscow; Krasnoyarsk, 2019;82. (in Russian)]
- Камаев И.О., Карпун Н.Н. Новые сведения о паутиных клещах (Acari: Trombidiformes: Tetranychidae), населяющих декоративные растения Черноморского побережья Краснодарского края, Россия. *Кавк. энтомол. бюл.* 2020;16(2):295-298. DOI 10.23885/181433262020162-295298.  
[Kamayev I.O., Karpun N.N. A new data on spider mites (Acari: Trombidiformes: Tetranychidae) inhabiting ornamental plants on the Black Sea coast of Krasnodar Region, Russia. *Kavkazskiy Entomologicheskii Bulletin = Caucasian Entomological Bulletin*. 2020;16(2):295-298. DOI 10.23885/181433262020162-295298. (in Russian)]
- Камаев И.О., Миронова М.К. Фитосанитарный риск растительноядных клещей (Arachnida: Acariformes). *Карантин растений. Наука и практика*. 2018;3(25):13-20.  
[Kamayev I.O., Mironova M.K. The phytosanitary risk of herbivorous mites (Arachnida: Acariformes). *Karantin Rasteniy. Nauka i Praktika = Plant Quarantine: Science and Policy*. 2018;3(25):13-20. (in Russian)]
- Коноплев Н.Д., Игнатов А.Н., Попов С.Я. К вопросу о возможности видовой диагностики *Tetranychus urticae* и *T. atlanticus* (Acari: Tetranychidae) с использованием мт-гена COI. *Вестн. защиты растений*. 2017;4(94):43-47.  
[Konoplev N.D., Ignatov A.N., Popov S.Ya. To question of opportunity of *Tetranychus urticae* and *T. atlanticus* (Acari: Tetranychidae) identification using mtDNA COI gene. *Vestnik Zashchity Rasteniy = Plant Protection News*. 2017;4(94):43-47. (in Russian)]
- Кошкин Е.И., Андреева И.В., Гусейнов Г.Г., Гусенов К.Г., Джалилов Ф.С.-У., Митюшев И.М. Особенности взаимодействия растений и фитофагов в агроценозах при изменении климата. *Агрехимия*. 2021;1:79-96. DOI 10.31857/S0002188121010063.  
[Koshkin E.I., Andreeva I.V., Guseinov G.G., Guseinov K.G., Dzhaliyev F.S.-U., Mityushev I.M. Specific aspects of the plant and phytophage interactions in agroecosystems under climate change. *Agrokhimiya = Agrochemistry*. 2021;1:79-96. DOI 10.31857/S0002188121010063. (in Russian)]
- Кутлунина Н.А., Ермошин А.А. Молекулярно-генетические методы в исследовании растений. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2017.  
[Kutlunina N.A., Ermoshin A.A. Molecular Methods in Plant Studies. Yekaterinburg: Urals State Univ. Publ., 2017. (in Russian)]
- Митрофанов В.И., Стрункова З.И., Лившиц И.З. Определитель тетраниховых клещей фауны СССР и сопредельных стран. Душанбе: Дониш, 1987.  
[Mitrofanov V.I., Strunkova Z.I., Livshits I.Z. Guide to Spider Mites in the Fauna of the USSR and Neighboring Countries. Dushanbe: Donish Publ., 1987. (in Russian)]
- Мусолин Д.Л., Саулич А.Х. Реакции насекомых на современное изменение климата: от физиологии и поведения до смещения ареалов. *Энтомол. обозрение*. 2012;91(1):3-35.  
[Musolin D.L., Saulich A.K. Responses of insects to the current climate changes: from physiology and behavior to range shifts. *Entomological Review*. 2012;92(7):715-740. DOI 10.1134/S0013873812070019.]
- Петров Д.Л., Жоров Д.Г., Сауткин Ф.В. Галловый клещ *Aceria erinea* (Nalepa, 1891) (Acariformes: Eriophyidae) – новый инвазивный вид фитофагов грецкого ореха (*Juglans regia* L.) в Беларуси. *Вестн. БГУ*. 2016;2:75-77.

- [Petrov D.L., Zhorov D.G., Sautkin F.V. Leaf gall mite *Aceria erinea* (Nalepa, 1891) (Acari: Eriophyiidae) – a new invasive species of pests of walnut (*Juglans regia* L.) in Belarus. *Vestnik Belorusskogo Gosudarstvennogo Universiteta = Vestnik BGU*. 2016;2:75-77. (in Russian)]
- Попов С.Я. Экологические аспекты ограничения вредоносности популяций насекомых и клещей. М.: Изд-во РГАУ-МСХА, 2013. [Popov S.Ya. The Ecological Aspect of Controlling the Harm of Insect and Mite Populations: A collection of articles. Moscow: RGAU-MSKha Publ., 2013. (in Russian)]
- Рак Н.С., Литвинова С.В. Миграция и акклиматизация вредных организмов при интродукции растений в оранжереях Крайнего Севера России. *Hortus Botanicus*. 2010;5:2. [Rak N.S., Litvinova S.V. Hazardous organisms migration and acclimatization during the plant introduction in the Far North Russia greenhouses. *Hortus Botanicus*. 2010;5:2. (in Russian)]
- Ahmad F., Babalola O.O., Tak H.I. Potential of MALDI-TOF mass spectrometry as a rapid detection technique in plant pathology: identification of plant-associated microorganisms. *Anal. Bioanal. Chem*. 2012;40(4):1247-1255. DOI 10.1007/s00216-012-6091-7.
- Ahuja A., Somvanshi V.S. Diagnosis of plant-parasitic nematodes using loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a review. *Crop Prot*. 2021;147:105459. DOI 10.1016/j.cropro.2020.105459.
- Alam M.T., Das M.K., Dev V., Ansari M.A., Sharma Y.D. PCR-RFLP method for the identification of four members of the *Anopheles annularis* group of mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 2007;101(3):239-244. DOI 10.1016/j.trstmh.2006.03.007.
- Arabuli T., Negm M.W., Matsuda T., Kitashima Y., Abramishvili T., Akimov I.A., Zhovnerchuk O.V., Popov S.Ya., Gotoh T. Morphological identification of *Amphitetranychus* species (Acari: Tetranychidae) with crossbreeding, esterase zymograms and DNA barcode data. *PLoS One*. 2019;14(9):e0221951. DOI 10.1371/journal.pone.0221951.
- Arimoto M., Satoh M., Uesugi R., Osakabe M. PCR-RFLP analysis for identification of *Tetranychus* spider mite species (Acari: Tetranychidae). *J. Econ. Entomol*. 2013;106(2):661-668. DOI 10.1603/EC12440.
- Ben-David T., Melamed S., Gerson U., Morin S. ITS2 sequences as barcodes for identifying and analyzing spider mites (Acari: Tetranychidae). *Exp. Appl. Acarol*. 2007;41(3):169-181. DOI 10.1007/s10493-007-9058-1.
- Chaires-Grijalva M.P., Serrano-Domínguez A.K., Coronado-Blanco J.M. Mites associated with maize in Mexico. *Rev. Mex. Cienc. Agríc*. 2021;12(8):1497-1510. DOI 10.29312/remexca.v12i8.2718.
- Chen Y., Woolley L., Nguyen D., Gupta R., Chandler G.T., Nehl D., Herron G.A. Development and use of a single real-time PCR assay to identify the three spider mite species *Tetranychus urticae*, *Tetranychus lambi* and *Tetranychus ludeni* (Acari: Tetranychidae). *Austral. Entomol*. 2020;59(3):630-638. DOI 10.1111/aen.12457.
- Dermauw W., Moerkercke Y.V., Ebrahimi N., Casteels H., Bonte J., Witters J. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid identification of *Ceratitis capitata* and related species. *Curr. Res. Insect Sci*. 2022;2:100029. DOI 10.1016/j.cris.2022.100029.
- Devi M., Challa N., Mahesh G. Important mite pests of temperate and sub-tropical crops: a review. *J. Entomol. Zool. Stud*. 2019;7(4): 1378-1384.
- Enohara K., Amano H. Simple method for discriminating six common species of red *Tetranychus* spider mites (Acari: Tetranychidae) in Japan. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool*. 1996;40(4):311-315. DOI 10.1303/jjaez.40.311. (in Japanese)
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol*. 1994;3(5):294-299.
- Goka K., Takafuji A. Electrophoretic detection of enzyme variation among Japanese red-coloured spider mites of the genus *Tetranychus* (Acari: Tetranychidae). *Exp. Appl. Acarol*. 1998;22:167-176. DOI 10.1023/A:1006006129339.
- Gotoh T. Separation of *Panonychus ulmi*, *P. thelytokus* and *P. bambusicola* (Acari: Tetranychidae) by esterase zymograms. *Appl. Entomol. Zool*. 1992;27(4):598-601. DOI 10.1303/aez.27.598.
- Gotoh T., Gutierrez J., Navajas M. Molecular comparison of the sibling species *Tetranychus pueraricola* Ehara et Gotoh and *T. urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Entomol. Sci*. 1998;1(1):55-57.
- Gotoh T., Kitashima Y., Adachi I. Geographic variation of esterase and malate dehydrogenases in two spider mite species, *Panonychus osmanthi* and *P. citri* (Acari: Tetranychidae) in Japan. *Int. J. Acarol*. 2004;30(1):45-54. DOI 10.1080/01647950408684368.
- Gotoh T., Kitashima Y., Goka K. *Tetranychus* mite species identification using esterase and phosphoglucomutase zymograms. *Appl. Entomol. Zool*. 2007;42(4):579-585. DOI 10.1303/aez.2007.579.
- Hajibabaei M., Singer G.A.C., Hebert P.D.N., Hickey D.A. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends Genet*. 2007;23(4):167-172. DOI 10.1016/j.tig.2007.02.001.
- Han H., Cho M.R., Jeon H.Y., Lim C.K., Jang H.I. PCR-RFLP identification of three major *Meloidogyne* species in Korea. *J. Asia Pac. Entomol*. 2004;7(2):171-175. DOI 10.1016/S1226-8615(08)60212-5.
- Hillis D.M., Dixon M.T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol*. 1991;66(4):411-453. DOI 10.1086/417338.
- Hinomoto N., Tran D.P., Pham A.T., Le T.B.N., Tajima R., Ohashi K., Osakabe M., Takafuji A. Identification of spider mites (Acari: Tetranychidae) by DNA sequences: a case study in Northern Vietnam. *Int. J. Acarol*. 2007;33(1):53-60. DOI 10.1080/01647950708684501.
- Hsieh C.-H., Wang H.-Y., Chen Y.-F., Ko C.-C. Loop-mediated isothermal amplification for rapid identification of biotypes B and Q of the globally invasive pest *Bemisia tabaci*, and studying population dynamics. *Pest Manag. Sci*. 2012;68(8):1206-1213. DOI 10.1002/ps.3298.
- Hurtado M.A., Ansaloni T., Cros-Arteil S., Jacas J.A., Navajas M. Sequence analysis of the ribosomal internal transcribed spacers region in spider mites (Prostigmata: Tetranychidae) occurring in citrus orchards in Eastern Spain: use for species discrimination. *Ann. Appl. Biol*. 2008;153(2):167-174. DOI 10.1111/j.1744-7348.2008.00250.x.
- İnak E., Çobanoğlu S., Auger P., Migeon A. Molecular identification and phylogenetic analysis of spider mites (Prostigmata: Tetranychidae) of Turkey. *Exp. Appl. Acarol*. 2022;87:195-205. DOI 10.1007/s10493-022-00728-5.
- Kajiwara H., Hinomoto N., Gotoh T. Mass fingerprint analysis of spider mites (Acari) by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for rapid discrimination. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 2016;30(8):1037-1042. DOI 10.1002/rcm.7534.
- Khaing T.M., Lee J.-H., Lee W.-G., Lee K.-Y. A new record of *Amphitetranychus quercivorus* (Acari: Tetranychidae) in Korea and molecular comparison with *A. viennensis*. *J. Asia Pac. Entomol*. 2013; 16(2):155-160. DOI 10.1016/j.aspen.2012.12.003.
- Khaing T.M., Shim J.-K., Lee K.-Y. Molecular identification and phylogenetic analysis of economically important acaroid mites (Acari: Astigmata: Acaroidea) in Korea. *Entomol. Res*. 2014;44(6):331-337. DOI 10.1111/1748-5967.12085.
- Khaing T.M., Shim J.-K., Lee K.-Y. Molecular identification of four *Panonychus* species (Acari: Tetranychidae) in Korea, including new records of *P. caglei* and *P. mori*. *Entomol. Res*. 2015;45:345-353. DOI 10.1111/1748-5967.12135.
- Lampo M., Rangel Y., Mata A. Genetic markers for the identification of two tick species, *Amblyomma dissimile* and *Amblyomma rotundatum*. *J. Parasitol*. 1997;83(3):382-386. DOI 10.2307/3284398.
- Li D., Fan Q.-H., Waite D.W., Gunawardana D., George S., Kumarsinghe L. Development and validation of a real-time PCR assay for rapid detection of two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *PLoS One*. 2015;10(7):e0131887. DOI 10.1371/journal.pone.0131887.

- Matsuda T., Fukumoto C., Hinomoto N., Gotoh T. DNA-based identification of spider mites: molecular evidence for cryptic species of the genus *Tetranychus* (Acari: Tetranychidae). *J. Econ. Entomol.* 2013;106(1):463-472. DOI 10.1603/EC12328.
- Matsuda T., Hinomoto N., Singh R.N., Gotoh T. Molecular-based identification and phylogeny of *Oligonychus* species (Acari: Tetranychidae). *J. Econ. Entomol.* 2012;105(3):1043-1050. DOI 10.1603/EC11404.
- Matsuda T., Morishita M., Hinomoto N., Gotoh T. Phylogenetic analysis of the spider mite sub-family Tetranychinae (Acari: Tetranychidae) based on the mitochondrial COI gene and the 18S and the 5' end of the 28S rRNA genes indicates that several genera are polyphyletic. *PLoS One.* 2014;9(10):e108672. DOI 10.1371/journal.pone.0108672.
- Migeon A., Nouguié E., Dorkeld F. Spider Mites Web: a comprehensive database for the Tetranychidae. In: Sabelis M., Bruin J. (Eds.) *Trends in Acarology*. Dordrecht: Springer, 2010;557-560. DOI 10.1007/978-90-481-9837-5\_96.
- Morphological Identification of Spider Mites (Tetranychidae) Affecting Imported Fruits. The Secretariat of the North American Plant Protection Organization, Canada, 2014.
- Murugaiyan J., Roesler U. MALDI-TOF MS profiling-advances in species identification of pests, parasites, and vectors. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2017;7:184. DOI 10.3389/fcimb.2017.00184.
- Navajas M., Fenton B. The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review. *Exp. Appl. Acarol.* 2000;24(10-11):751-774. DOI 10.1023/a:1006497906793.
- Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(12):e63. DOI 10.1093/nar/28.12.e63.
- Obasa K., Alabi O.J., Sétamou M. Wheat curl mite: a new source of the Eriophyoid mite in wheat fields identified. *PhytoFrontiers.* 2022;2(4):342-346. DOI 10.1094/PHYTOFR-04-22-0038-SC.
- Osakabe Mh. Difference of esterase isozymes between non-diapausing and diapausing strains of the citrus red mite, *Panonychus citri* (McGregor) (Acarina: Tetranychidae). *Appl. Entomol. Zool.* 1987;22(4):577-584. DOI 10.1303/aez.22.577.
- Osakabe Mh., Hirose T., Satô M. Discrimination of four Japanese *Tetranychus* species (Acari: Tetranychidae) using PCR-RFLP of the inter-transcribed spacer region of nuclear ribosomal DNA. *Appl. Entomol. Zool.* 2002;37(3):399-407. DOI 10.1303/aez.2002.399.
- Osakabe Mh., Kotsubo Yu., Tajima R., Hinomoto N. Restriction fragment length polymorphism catalog for molecular identification of Japanese *Tetranychus* spider mites (Acari: Tetranychidae). *J. Econ. Entomol.* 2008;101(4):1167-1175. DOI 10.1093/jee/101.4.1167.
- Osakabe Mh., Sakagami Y. RFLP analysis of ribosomal DNA in sibling species of spider mite, genus *Panonychus* (Acari: Tetranychidae). *Insect Mol. Biol.* 1994;3(1):63-66. DOI 10.1111/j.1365-2583.1994.tb00152.x.
- Ovalle T.M., Vásquez-Ordóñez A.A., Jimenez J., Parsa S., Cuellar W.J., Lopez-Lavalle L.A.B. A simple PCR-based method for the rapid and accurate identification of spider mites (Tetranychidae) on cassava. *Sci. Rep.* 2020;10(1):19496. DOI 10.1038/s41598-020-75743-w.
- Ratcliffe S.T., Webb D.W., Weinzivier R.A., Robertson H.M. PCR-RFLP identification of Diptera (Calliphoridae, Muscidae and Sarcophagidae) – a generally applicable method. *J. Forensic Sci.* 2003;48(4):783-785. DOI 10.1520/JFS2002136.
- Ros V.I.D., Breeuwer J.A.J. Spider mite (Acari: Tetranychidae) mitochondrial COI phylogeny reviewed: host plant relationships, phylogeography, reproductive parasites and barcoding. *Exp. Appl. Acarol.* 2007;42(4):239-262. DOI 10.1007/s10493-007-9092-z.
- Sakamoto H., Gotoh T. Non-destructive direct polymerase chain reaction (direct PCR) greatly facilitates molecular identification of spider mites (Acari: Tetranychidae). *Appl. Entomol. Zool.* 2017;52:661-665. DOI 10.1007/s13355-017-0512-1.
- Shim J.-K., Khaing T.M., Seo H.-E., Ahn J.-Y., Jung D.-O., Lee J.-H., Lee K.-Y. Development of species-specific primers for rapid diagnosis of *Tetranychus urticae*, *T. kanzawai*, *T. phaseolus* and *T. truncatus* (Acari: Tetranychidae). *Entomol. Res.* 2016;46(2):162-169. DOI 10.1111/1748-5967.12154.
- Sinaie S., Sadeghi Namaghi H., Fekrat L. A multiplex PCR assay for simultaneous discrimination of two predominant spider mites of the genus *Tetranychus* (Acari: Tetranychidae) in greenhouses of Iran. *J. Agr. Sci. Tech.* 2018;20(4):733-744.
- Sinaie S., Sadeghi-Namaghi H., Fekrat L. Loop-mediated isothermal amplification combined with PCR for specific identification of injurious mite, *Tetranychus urticae* (Trombidiformes: Tetranychidae). *Biologia.* 2019;74(5):477-485. DOI 10.2478/s11756-018-00187-7.
- Singhal N., Kumar M., Kanaujia P.K., Virdi J.S. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.* 2015;6:791. DOI 10.3389/fmicb.2015.00791.
- Tomita N., Mori Y., Kanda H., Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat. Protoc.* 2008;3(5):877-882. DOI 10.1038/nprot.2008.57.
- Turak E., Hales D.F. An allozyme method for identifying individual aphids of morphologically similar taxa (Hemiptera: Aphididae). *J. Aust. Ent. Soc.* 1994;33(1):57-59. DOI 10.1111/j.1440-6055.1994.tb00920.x.
- Ulyanova E., Andreeva I., Shatalova E. The species composition of herbivorous acarofauna in the south of Western Siberia. *Persian J. Acarol.* 2022;11(2):365-370. DOI 10.22073/pja.v11i2.72456.
- Vásquez C., Colmenárez Y. Invasive mite species in the Americas: bioecology and impact. In: Haouas D., Hufnagel L. (Eds.) *Pests Control and Acarology*. London: IntechOpen, 2020. DOI 10.5772/intechopen.86127.
- Walter D.E., Krantz G.W. Collecting, rearing and preparing specimens. In: Krantz G.W., Walter D.E. (Eds.) *A Manual of Acarology*. Texas Tech Univ. Press, 2009;91-92.
- Zélé F., Weill M., Magalhães S. Identification of spider-mite species and their endosymbionts using multiplex PCR. *Exp. Appl. Acarol.* 2018;74(2):123-138. DOI 10.1007/s10493-018-0224-4.

#### ORCID ID

A.V. Разуваева orcid.org/0000-0002-0746-3660  
E.G. Ульянова orcid.org/0000-0002-9154-5238  
E.S. Сколотнева orcid.org/0000-0001-8047-5695  
I.V. Андреева orcid.org/0000-0001-5627-8667

**Благодарности.** Исследование профинансировано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, номер гранта FWNR-2022-0007.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 14.07.2022. После доработки 25.12.2022. Принята к публикации 07.01.2023.