

Latvijas Lauksaimniecības universitāte
Lauksaimniecības fakultāte

Latvia University of Agriculture
Faculty of Agriculture

ARTURS STALAŽS

**JĀŅOGU ĢINTS AUGIEM KAITĪGO *CECIDOPHYOPSIS*
ĢINTS PUMPURĒRČU SUGU SASTĀVS, IZPLATĪBA UN
SAISTĪBA AR SAIMNIEKAUGIEM LATVIJĀ**

***CECIDOPHYOPSIS* MITES HARMFUL TO RIBES PLANTS,
SPECIES COMPOSITION, DISTRIBUTION AND
ASSOCIATION WITH HOST PLANTS IN LATVIA**

Promocijas darba **KOPSAVILKUMS**
Dr. agr. zinātniskā grāda iegūšanai

SUMMARY
of the Doctoral thesis for the scientific degree Dr. agr.

Jelgava, 2015

Darba zinātniskais vadītājs / *Scientific supervisor:*

Dr. habil. agr. **Ināra Turka**

Darba zinātniskais konsultants / *Scientific consultant:*

Ph. D. **Inga Moročko-Bičevska**

Darba recenzenti / *Reviewers:*

Dr. biol. **Biruta Bankina**

Dr. habil. biol. **Īzaks Rašals**

Dr. biol. **Ineta Salmane**

Promocijas darba aizstāvēšana paredzēta Latvijas Lauksaimniecības universitātes Lauksaimniecības nozares Laukkopības apakšnozares promocijas padomes atklātajā sēdē 2015. gada 30. oktobrī plkst. 10:00, Latvijas Lauksaimniecības universitātē, 123. auditorijā, Lielā iela 2, Jelgava

***The defence of thesis will be held** in an open session of the Promotion Board of the Agriculture on October 30, 2015 at 10:00 in room 123, Latvia University of Agriculture, Lielā iela 2, Jelgava*

Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties Latvijas Lauksaimniecības universitātes Fundamentālajā bibliotēkā, Lielā iela 2, Jelgava

***The thesis and resume are available** at the Fundamental Library of Latvia University of Agriculture, Lielā iela 2, Jelgava*

Atsaukmes lūdzu sūtīt Lauksaimniecības nozares Laukkopības apakšnozares promocijas padomes sekretārei Dr. agr. Maijai Ausmanei, Lielā iela 2, Jelgava, LV-3001; fakss +371 63027238, tālr. +371 63005632.

***References are welcome to be sent** to Dr. agr. Maija Ausmane, the Secretary of the Promotion Board, Latvia University of Agriculture, Lielā iela 2, Jelgava, LV-3001; fax +371 63027238, tel. +371 63005632.*

ISBN 978-9934-8502-2-6 (*print*)

ISBN 978-9934-8502-3-3 (*online*)

SATURS

CONTENT

Ievads	4
1. Materiāls un metodika	7
2. Rezultāti	14
Secinājumi	25
Rekomendācijas	26
Zinātniskā darba aprobācija	27
<i>Approbation of the scientific work</i>	27
<i>Introduction</i>	30
<i>1. Materials and methods</i>	33
<i>2. Results</i>	38
<i>Conclusions</i>	43
<i>Recommendations</i>	44

IEVADS

Pateicoties piemērotajiem klimatiskajiem apstākļiem, jāņogu ģints augi Latvijā ir saimnieciski nozīmīgi. Platību ziņā upenes ir vienas no plašāk audzētajiem ogaugiem. Ņemot vērā šo augu nozīmi, Latvija ir viena no nedaudzajām Eiropas valstīm, kur ilgus gadus ir arī norītējusi jāņogu ģints ogaugu mērķtiecīga selekcija, tajā skaitā pret pumpurērcēm izturīgu genotipu atlase. Daļa no jāņogu ģints augiem nozīmīgiem kaitīgajiem organismiem Latvijā nav pietiekami pētīti. Tas attiecināms arī uz *Cecidophyopsis* ģints pumpurērcēm, kuru izplatība un saimnieciskā nozīme nav pietiekami skaidrota, kā arī nebija zināms Latvijā esošo *Cecidophyopsis* ģints pumpurērcu sugu sastāvs. *Cecidophyopsis* ģints pumpurērces ir ekonomiski nozīmīgi kaitēkļi lielākajā daļā upeņu audzēšanas reģionu. Ņemot vērā pumpurērcu izplatību augu kolekcijās, šobrīd tās ir atzītas kā vieni no nozīmīgākajiem upeņu kaitēkļiem arī Latvijā, bet līdz šim nav apzināta šo ērcu izplatība Latvijā kopumā, tajā skaitā komercdārzos un uz augiem savvaļā. Gan Latvijā, gan citās valstīs ir novērotas pretrunas attiecībā uz vairāku genotipu izturību pret pumpurērcēm, kad augi jaunās vietās introducēti kā ērcu izturīgi. Šīs pretrunas skaidrotas kā kaitēkļa (sugas *Cecidophyopsis ribis*) pielāgošanās un augu rezistences pārvarēšana. Latvijā un citās valstīs rezistentu šķirņu izveide un rezistences mehānismu izpēte ir vērsta uz vienu pumpurērcu sugu — *Cecidophyopsis ribis*. Šobrīd vairākās citās Eiropas valstīs ir iegūta jauna informācija par *Cecidophyopsis* ģints sugām, nozīmi un sastāvu, atkarībā no reģiona, tajā skaitā ērcu iespējamo atšķirīgo lomu upeņu reversijas vīrusa (*Blackcurrant reversion virus*) izplatīšanā.

Šobrīd uzskata, ka uz jāņogu ģints augiem dzīvo septiņas *Cecidophyopsis* ģints pumpurērcu sugas. Lai arī upenēm un jāņogām bijušas norādītas tikai konkrētas pumpurērcu sugas, tomēr Somijā *C. spicata* ir ievāktas no vairāku saimniekaugu — jāņogu, upeņu un vēreņu pumpuriem. Dažādās valstīs veiktajos pētījumos ir iegūti atšķirīgi rezultāti par upeņu izturību pret *C. ribis*, kas norāda uz iespēju, ka uz upenēm varētu baroties vairāk pumpurērcu sugu, nekā līdz šim uzskatīja. To apstiprina arī Somijas pētījumi, upenēm nosakot *C. spicata*, kas agrāk noteikta tikai no pūkainās jāņogas (*Ribes spicatum*) pumpuriem. Līdz ar to bija nepieciešams skaidrot dažādu saimniekaugu un uz tiem dzīvojošo pumpurērcu sugu iespējamo saistību, kas varētu izskaidrot novērotās atšķirības augu izturībā pret pumpurērcēm.

Darba hipotēze. Atšķirīgo augu rezistenci pret pumpurērcēm izraisa dažāda *Cecidophyopsis* ģints sugu sastāvs dažādos ģeogrāfiskajos reģionos.

Darba mērķis. Noskaidrot *Cecidophyopsis* ģints pumpurērcu sugu sastāvu un izplatību, kā arī saistību ar dažādiem jāņogu ģints augiem Latvijā.

Darba uzdevumi:

1) aptverot visu Latvijas teritoriju, iegūt materiālu *Cecidophyopsis* ģints pumpurērcu pētījumiem;

2) pārbaudīt literatūrā ieteikto molekulāro metožu izmantošanas iespējas pumpurērcu sugu identificēšanā;

3) noteikt pumpurērcu sugu izplatību pa jāņogu ģints saimniekaugiem dažādos biotopos, aptverot pēc iespējas vairāk saimniekaugu genotipu;

4) ņemot vērā iegūtos rezultātus, skaidrot iespējamās izplatības sakarības starp pumpurērcu sugām, to saimniekaugiem, kā arī sugu saimniecisko nozīmi.

Promocijas darbam ir četras nodaļas — Literatūras apskats, Materiāls un metodes, Rezultāti, un Diskusija. Darba apjoms 76 lapas (neskaitot bibliogrāfijas sarakstu un pielikumus); darbā ir 27 tabulas, 18 attēli; 293 bibliogrāfiskie avoti, kā arī 3 pielikumi. Darbam formulēti deviņi secinājumi.

Darba zinātniskā novitāte. Latvijā pirmo reizi sugu līmenī noteiktas jāņogu ģints augiem kaitējošās *Cecidophyopsis* ģints pumpurērces, kā arī skaidrota to izplatība dažādos biotopos un uz dažādiem saimniekaugiem. Veiktais pētījums ir līdz šim apjomīgākais par *Cecidophyopsis* ģints pumpurērcēm izmantotā paraugu skaita un saimniekaugu sugu un genotipu daudzveidības ziņā, kas deva iespēju iegūt jaunas atziņas par ērcu sugu sastāvu un sastopamību Eiropā, to saimniekaugu loku, kā arī par to ģenētisko daudzveidību. Pētījuma gaitā pilnveidota molekulārās diagnostikas metode uz jāņogu ģints augiem dzīvojošo pumpurērcu sugu noteikšanai. Sugām *Cecidophyopsis alpina*, *C. aurea* un *C. selachodon* noskaidroti jauni saimniekaugi.

Darba praktiskā nozīme. Pētījumā iegūtie rezultāti un atziņas par ērcu sugu sastāvu un to saimniekaugu loku ir izmantojami, plānojot upeņu, jāņogu un zelta jāņogas selekcijas programmu Latvijā, kā arī augu rezistences mehānismu pret pumpurērcēm izpētē un rezistentu šķirņu selekcijā ne tikai Latvijā, bet arī citās Eiropas valstīs.

Pētījums veikts Latvijas Valsts auglīkopības institūtā no 2007. līdz 2014. gadam, ievācot materiālu pētījumiem visā Latvijas teritorijā, no 65 vietām un 1235 jāņogu ģints augiem, tajā skaitā komercstādījumos, augu kolekcijās, kokaudzētavu mātesdārzos, piemājas dārzos, apstādījumos un savvaļā.

Pētījumi veikti projektu ietvaros:

1) Valsts pētījumu programmas nr. 9 projekts nr. 2 „Augstvērtīgas Latvijas ogas: no šķirnes līdz kvalitatīvam, drošam un veselīgam produktam” (2007.–2009.) — jāņogu ģints augu augšanas vietu apsekojumi dabā, paraugu materiāla ievākšana un DNS kolekcijas izveide;

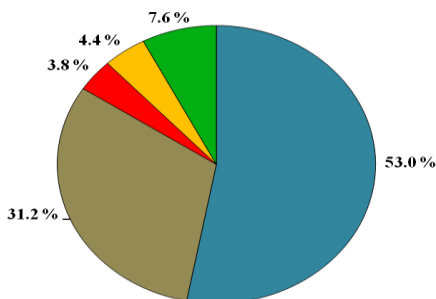
2) Leonardo Da Vinci apmācību programmas projekta nr. 2010-1-LV1-LEO02-00675 (2010.) ietvaros Varšavas Dzīvības zinātņu universitātē, Mariusz Lewandowski and Jan Boczek vadībā, iegūtas darbam nepieciešamās iemaņas maurērcu morfoloģijas pētījumiem;

3) ERAF projekts nr. 2010/0317/2DP/2.1.1.1.0/10/APIA/VIAA/155 „Efektīvu augļaugu atveseļošanas paņēmieni un jaunu patogēnu diagnostikas komponentu izstrāde vīrusbrīva stādāmā materiāla iegūšanai” (2011.–2013.) — ērcu sugu noteikšana un ģenētiskās daudzveidības analīze, noteikšanas metodes pilnveidošana.

4) ESF projekts nr. 2013/0048/1DP/1.1.1.2.0/13/APIA/VIAA/008 „Zinātnieku grupas izveide kaulēnkoku pavairošanas, ģeneratīvo procesu kvalitātes paaugstināšanas un augļu izmantošanas iespēju pētījumiem” (2013.–2015.) — promocijas darba sagatavošana, pētījumu rezultātu prezentēšana starptautiskā zinātniskā konferencē 2015. gadā.

1. MATERIĀLS UN METODIKA

Jāņogu ģints augu apsekojumi un paraugu vākšana. Kopējās situācijas apzināšanai valstī, 2008. un 2009. gada martā un aprīlī apsekotas jāņogu ģints (*Ribes*) augu augšanas vietas, pēc iespējas aptverot visu Latvijas teritoriju un dažāda veida biotopus (1.1. att.).



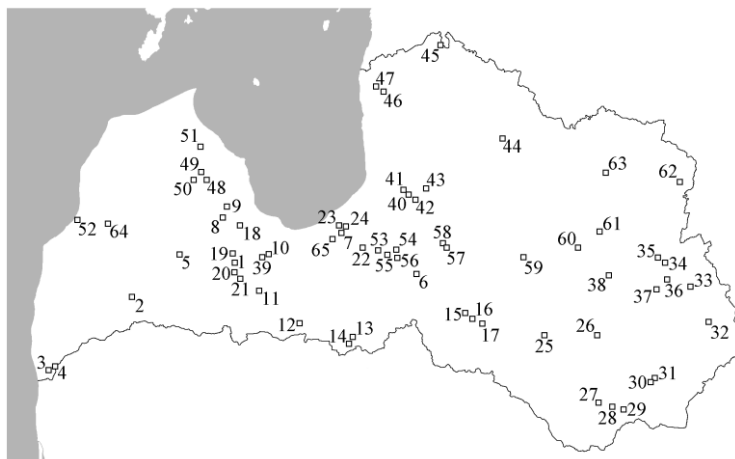
1.1. att. Apsekoto augu sadalījums pa biotopiem
Surveyed plants and their distribution within habitats

- Komercdārzi / Commercial orchards
- Augu kolekcijas / Plant collections
- Kokaudzētavu mātesdārzi / Mother plant plantations
- Piemājas dārzi un apstādījumi / Home gardens and ornamental plantings
- Savvaļas biotopi / Wild habitats

Kommercdārzos audzētie augi apsekoti, ņemot vērā Latvijas Augļkopju asociācijas rīcībā esošo informāciju par upeņu un jāņogu audzēšanas vietām. Savvaļā augošie jāņogu ģints augi apsekoti pēc nejaušības principa — vietās, kur šos augus izdevās atrast. Galvenā uzmanība pievērsta komercdārziem un augu kolekcijām, cenšoties arī aptvert pēc iespējas lielāku saimniekaugu genotipu skaitu.

Paraugus ievācot, no katra krūma ņemti trīs līdz pieci zari, kas nogriezti pēc iespējas tuvāk zemei. Kā viens paraugs ir no viena krūma ievāktais pumpuru materiāls. Ja augu bija pietiekami, no vienas šķirnes vai kolekcijās audzētiem viena genotipa augiem izvēlēti pieci krūmi, kas atbilst pieciem paraugiem. Ja šķirnes nebija zināmas, paraugiem zari ņemti no pieciem, savstarpēji līdzīgiem augiem. Nezināmu upeņu šķirņu gadījumā, tiem augiem, kuriem atšķīrās pumpuru krāsa (zaļi vai sarkanīgi pumpuri), paraugi ņemti atsevišķi — no katra veida krūmiem. Savvaļā augošiem augiem paraugi ņemti no tāda augu skaita, kāds savvaļā bija atrodamas. Atsevišķos gadījumos paraugi ievākti arī no lielāka krūmu skaita.

Kopumā apsekotas 65 vietas (1.2. att.), no kurām liela daļa bija komercdārzi, bet pumpuru paraugi kopumā ir ievākti no 1235 krūmiem.



1.2. att. **Apsektās vietas, kur ievākti pumpuru paraugi**
Surveyed localities where bud samples were collected

Laboratorijas apstākļos, no nogrieztajiem zariem izlases veidā nolaisti norma izskata pumpuri, kā arī visi pumpuri, kuru forma atšķīrās vai kas bija kā pumpuru pangas. Pumpuri saglabāti 96 % spirtā.

Pumpurērcu klātbūtnes noteikšana. Ar skalpeli pārgriezti paraugos esošie pumpuri apskatīti ar stereomikroskopa palīdzību, pārbaudot ērcu iespējamo esamību pumpuros. Ja pumpuros ērces nav konstatētas, tad novērojumu rezultāti reģistrēti, uzskaitot pārgrieztos pumpurus bez ērcēm (kopā 12120 pumpuri). Pārgrieztie pumpuri tālāk izmantoti pumpurērcu iegūšanai un tālākai pumpurērcu DNS izdalīšanai.

Pumpurērcu DNS izdalīšana. Abas pārgrieztā pumpura puses ievietotas sterilā 1.5 mL *Eppendorf* mēģenē, tālāk paraugam uzliets 1 mL sterila ūdens. Mēģenes, ar tajās esošajiem pumpuriem, ievietotas centrifūgā *Eppendorf Centrifuge 5415 R* un paraugi centrifugēti piecas minūtes ar 13200 apgriezieniem minūtē. Pēc centrifugēšanas, uzmanīgi atsūktis ūdens un izņemtas pumpuru atliekas.

Pumpurērcu DNS izdalīšana, izmantojot genomiskās DNS izdalīšanas komplektu (*#K0512, Thermo Scientific™*), veikta vadoties pēc ražotāja noteiktā protokola. Kopumā iegūti 665 ērcu DNS paraugi (1.1. tabula).

Sugu noteikšana morfoloģiski. Pumpurērcu sugu morfoloģiskajai noteikšanai izvēlēti pumpuri no 16 paraugiem, no kuriem tālāk analizētas 324 ērces. Pagatavojot mikroskopijas preparātus, ērces ievietotas pienskābes pilienā attīrīšanai, kur tās karsētas 12 stundas aptuveni 70 °C temperatūrā.

Pēc ērcu sākotnējās attīrīšanas pienskābē, tās ievietotas, uz priekšmetstikla esošā, *Berlese* šķīduma pilienā. Pēc segstikla uzlikšanas, pagatavotais mikroskopijas preparāts karsēts 12 stundas 70 °C grādu temperatūrā, pabeidzot ērcu attīrīšanu un sakaltējot preparātu fiksējošo šķīdumu.

Kopsavilkums par iegūtajiem pumpurērču DNS paraugiem
Summary of obtained DNA samples of gall mites

Saimniekaugi <i>Host plants</i>	Augi / <i>Plants</i>		DNS paraugu skaits <i>Number of DNA samples</i>
	bez ērcēm <i>without mites</i>	ar ērcēm <i>with mites</i>	
Upenes / <i>Blackcurrants</i>	593	314	485
Jāņogas / <i>Redcurrants</i>	178	44	126
Vērenes / <i>Alpine currants</i>	18	17	54
Kopā / <i>In total:</i>	789	375	665

Ērču sugu noteikšanai izmantots mikroskops *Leica DMLS* (okulāri *HC PLAN s 10×/22*, objektīvi *C PLAN 4×/0.10*; *10×/0.22 PH 1* un *100×/1.25 oil PH 3*), digitālā kamera *Leica EC3* un attēlu apstrādes programma *Leica LAS EZ* (2010. gada versija 2.0.0).

Sagatavotie mikroskopijas preparāti sākotnēji izskatīti, izmantojot mikroskopa 4× un 10× objektīvu palielinājumus, kas nepieciešams ērču atrašanai mikroskopijas preparātā; kā arī 10× — ērču garuma un platuma mērījumiem, 100× objektīvu ar imersijas eļļu — specifisko morfoloģijas pazīmju apskatei, atsevišķos gadījumos ērču platuma mērījumiem. Visi attēli datu saglabāšanai iegūti, izmantojot objektīvu 100×.

Ērču atšķiršanai izmantotas prodorsālā vairoga līniju vizuālās atšķirības atbilstoši sugu aprakstam¹, uzmanību pievēršot burtu "M", "N" un "Λ" figūrām, kuras veido prodorsālā vairoga pirmā līdz ceturttā submediānā līnija. Mērītās pazīmes: ērču garums un platums, kā arī garuma un platuma attiecība.

Polimerāzes ķēdes reakcijas (PCR) amplifikācija, klonēšana un sekvenčēšana. Ribosomālās DNS *ITS/5.8S* reģions un daļēji gēni *18S* un *28S* amplificēti, izmantojot praimerus *E* un *C*². PCR amplifikācija veikta 20 µL reakcijas apjomā, kas ietver 1.5 µL genomiskās DNS, 1 µL katra 10 µM praimera, 0.4 µL *Phire Hot Start II DNA polymerase* (#F-122L, *Thermo Scientific*TM), 10 µL *2X Phire Animal Tissue PCR buffer* (#F-140, *Thermo Scientific*TM) un 6.4 µL PCR kvalitātes ūdens (*PCR grade water*). PCR kvalitātes ūdens izmantots arī kontrolei. PCR nodrošināšanai izmantota termociklera iekārta *EP Gradient, Eppendorf*, kas ieprogrammēta šādiem reakcijas cikliem: 1 cikls 98 °C temperatūrā ar ilgumu 5 minūtes, un 37 cikli ar šādiem apstākļiem — 10 sekundes 98 °C, 10 sekundes 65 °C un 25 sekundes 72 °C, nobeidzot ar 1 minūtes nobeiguma soli 72 °C temperatūrā. Iegūtie

¹ AMRINE, J. W., DUNCAN, G. H., TEIFION JONES, A., GORDON, S. C. & I. M. ROBERTS, 1994. *Cecidophyopsis* mites (Acari: Eriophyidae) on *Ribes* spp. (Grossulariaceae). *International Journal of Acarology*, **20**, 139-168.

² FENTON, B., BIRCH, A. N. E., MALLOCH, G., WOODFORD, J. A. T. & C. GONZALEZ, 1994. Molecular analysis of ribosomal DNA from the aphid *Amphorophora idaei* and an associated fungal organism. *Insect Molecular Biology*, **3**, 183-189.

PCR amplifikācijas produkti atdalīti ar elektroforēzi 1.5 % agarozes gelā, kam pievienots etīdija bromīds gelā esošo DNS fragmentu vizualizēšanai ar ultravioleto starojumu. Aptuvenie DNS fragmentu garumi noteikti ar garumu marķieri *GeneRuler Low Range DNA Ladder* (#SM1193, *Thermo Scientific*TM).

Amplificētie fragmenti liģēti *pJET1.2/blunt* klonēšanas vektorā, izmantojot *CloneJET*TM *PCR Cloning Kit* (#K1232, *Thermo Scientific*TM), vadoties pēc DNS pavedienu trulo galu (*blunt end*) un neattīrītas PCR reakcijas protokola atbilstoši ražotāja instrukcijai. Transformēšana veikta, izmantojot *Escherichia coli* celmu TOP10 (*Invitrogen*TM) un *TransformAid*TM *Bacterial Transformation Kit* (#K2710, *Thermo Scientific*TM) reaģentu komplektu.

Pozitīvo klonu kolonijas analizētas tiešā veidā ar PCR, izmantojot to pašu praimeru komplektu kā sākotnējā amplifikācijā un *Dream Taq Green PCR Master Mix* (#K1081, *Thermo Scientific*TM) reaģentu komplektu. Plazmīdu sagatavošana sekvenčēšanai veikta ar *QIAprep Spin Miniprep* kolonnām (#27104, *Qiagen*). Klonēto fragmentu sekvenčēšanai izmantoti praimeru *pJET1.2 F* un *R* (nodrošināti kopā ar vektoru) un praimeru *MiteB* un *MiteG*, kas specifiski ěrcēm³. Informācija par sekvenčēšanai izmantotajiem DNS paraugiem apkopota 1.2. tabulā.

Tālāka DNS sekvenčēšana veikta kā ārpakalpojums Latvijas Valsts mežzinātnes institūtā "Silava".

Filogenēzes analīzes. Iegūto sekvenču manuāla rediģēšana veikta, izmantojot *SeqMan* programmu no datorprogrammu paketes *Lasergene 9.1* (*DNASTAR Inc.*, ASV). Multiplo sekvenču izlīdzināšana (*alignment*) veikta ar *Clustal W* metodi un sekvenču pāru procentuālā līdzība noteikta ar *Lasergene 9.1* programmu *MegAlign*. Visa amplificētā reģiona nukleotīdu sekvences, kopumā no 56 kloniem, kas iegūti no 27 pumpurērcu DNS paraugiem, salīdzinātas ar astoņu *Cecidophopsis* taksonu sekvenčēm, kas no agrākiem pētījumiem⁴ ir pieejamas datubāzē *GenBank*⁵. Papildus sagatavotas atsevišķas sekvenču datu matricas ribosomālās DNS reģioniem *ITS1*, *5.8S* un *ITS2*, lai salīdzinātu ar citām pieejamajām⁶ sekvenčēm. Sekvenču sākotnējai salīdzināšanai ar *GenBank* datu bāzē pieejamām sekvenčēm un to piederības sākotnējai atbilstībai veikta *BLAST* analīze⁷.

³ FENTON, B., MALLOCH, G. & E. MOXEY, 1997. Analysis of eriophyid mite rDNA internal transcribed spacer sequences reveals variable simple sequence repeats. *Insect Molecular Biology*, **6**, 23-32.

⁴ FENTON, B., BIRCH, A. N. E., MALLOCH, G., LANHAM, P. G. & R. M. BRENNAN, 2000. Gall mite molecular phylogeny and its relationship to the evolution of plant host specificity. *Experimental and Applied Acarology*, **24**, 831-861.

⁵ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

⁶ LAVA KUMAR, P., FENTON, B. & A. T. JONES, 1999. Identification of *Cecidophopsis* mites (Acari: Eriophyidae) based on variable simple sequence repeats of ribosomal DNA internal transcribed spacer-1 sequences via multiplex PCR. *Insect Molecular Biology*, **8**, 347-357.

⁷ ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. & D. J. LIPMAN, 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, **215**, 403-410.

Kopsavilkums par sekvenčēšanai izmantotajiem ērcu DNS paraugiem
Summary of mite DNA samples used for sequencing

Auga genotips <i>Plant genotype</i>	DNS klonu skaits <i>Number of DNA clones</i>
Upenes <i>Blackcurrants</i>	
<i>Ribes nigrum</i> var. <i>altaica</i>	2
<i>Ribes nigrum</i> f. <i>rubrofusca</i>	3
<i>Ribes</i> 'Belorusskaā Sladkaā'	1
<i>Ribes</i> 'Ben Lomond'	1
<i>Ribes</i> 'Čerešneva'	1
<i>Ribes</i> 'Katūša'	4
<i>Ribes</i> 'Mara Eglite'	2
<i>Ribes</i> 'Pamāt' Vavilova'	5
<i>Ribes</i> 'Selečenskaā 2'	1
<i>Ribes</i> 'Stor Klas'	3
<i>Ribes</i> 'Titania'	2
<i>Ribes</i> 'Vologda'	6
<i>Ribes</i> Nr. 24	4
Nezināms genotips / <i>Unknown genotype</i>	6
Jāņogas <i>Redcurrants</i>	
<i>Ribes spicatum</i>	4
<i>Ribes</i> 'Kodu Valge'	2
<i>Ribes</i> 'Račnovskaā'	2
<i>Ribes</i> 'Belaā Kuz'mina'	3
Vērenes <i>Alpine currants</i>	
<i>Ribes alpinum</i>	5
DNS kloni kopā / <i>DNA clones in total:</i>	56

Datorprogrammā *PAUP* (versija 4.0b10⁸) veiktas filoģenēzes analīzes (*Maximum Parsimony*) daļējiem 18S, 28S gēniem un visam *ITS1* / 5.8S / *ITS2* reģionam, izmantojot 1000 randomu sekvenču pievienošanu, neizmantojot *Mul-Trees* opciju, bet izmantojot opciju *Steepest descent*, *Tree bisection reconnection branch swapping* un atstarpes uztverot kā piekto nukleotīdu. Tie paši parametri izmantoti statistikas atbalsta aprēķināšanai (*Bootstrap support*), kas veikta 1000 atkārtojumos ar piecu randomu sekvenču pievienošanu katrā no 1000 atkārtojumiem. Salīdzināšanai (*outgroup*), analīzēs iekļautas divas attāli radniecīgas maur-

⁸ SWOFFORD, D. L., 2002. *PAUP**: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*And Other Methods). Version 4.0b10. Sinauer Associates: Sunderland, Massachusetts.

ērču dzimtas sugu — *Aceria tulipae* (GenBank nr. JF920112) un *Aceria eximia* (JF920113) DNS sekvences no agrākiem pētījumiem⁹.

Pilnīgākai *Cecidophyopsis* ģints sugu savstarpējo līdzību skaidrošanai, filoģenēzes analīzes veiktas izmantojot arī citu metodi — *Bayesian analyses* datorprogrammā *MrBayes* (version 3.0b4¹⁰). Pirms sekvenču analīzes, datu matricai noteikts piemērotākais analīzes modelis ar datorprogrammu *MrModeltest v2*¹¹. Kā piemērotākais modelis noteikts — GTR+G. Lai noteiktu filoģenēzes koku iespējamās varbūtības (*Posterior probabilities*) izmantota metode *Markov chain Monte Carlo*^{12, 13}.

***Cecidophyopsis* sugu noteikšana ar multiplekso PCR un fragmentu garumu analīze.** Visiem iegūtajiem ērcu DNS paraugiem veikta multipleksā PCR reakcija, lai ērcu sugas noteiktu, izmantojot agrāk publicēto metodiku un četrus agrāk izstrādātus praimerus¹⁴, iegūstot ribosomālās DNS reģiona fragmentus *S1*, *S2* un *S3*, kas ietver *ITS1* reģionu un atsevišķas nukleotīdu sekvences no gēna *18S* un *5.8S*. Šajā pētījumā veikta modifikācija, izmantojot praimerus *MITS1* un *MITS3*, kas 5' galā marķēti ar fluorescentu krāsu *6-FAM* un *HEX*. Pētījumā izmantoti fluorescenti iekrāsoti praimeru, lai iegūtos DNS fragmentus būtu iespējams noteikt ar automātisko ģenētisko analizatoru.

PCR amplifikācija veikta 20 μL reakcijas apjomā, kas ietver 1 μL genomiskās DNS, 1 μL katra 10 μM praimera, 10 μL *2X Phire Animal Tissue PCR* buferis (#F-140, *Thermo Scientific*TM), 0.4 μL *Phire Hot Start II DNA* polimerāze (#F-122L, *Thermo Scientific*TM) un 4.6 μL PCR kvalitātes ūdens (*PCR grade water*). PCR kvalitātes ūdens izmantots arī kontrolei. PCR nodrošināšanai izmatota termociklera iekārta *EP Gradient, Eppendorf*, kas ieprogrammēta šādiem reakcijas cikliem: 1 cikls 98 °C temperatūrā ar ilgumu 5 minūtes, un 35 cikli ar šādiem apstākļiem — 5 sekundes 98 °C, 7 sekundes 59 °C un 20 sekundes 72 °C, nobeidzot ar 1 minūtes nobeiguma soli 72 °C temperatūrā.

Tālāka automātiska iegūto DNS fragmentu garumu noteikšana, kā ārpakalpojums veikta Latvijas Valsts mežzinātnes institūtā "Silava".

⁹ SKORACKA, A., KUCZYNSKI, L., DE MENDONCA, R. S., DABERT, M., SZYDLO, W., KNIHINICK, D., TRUOL, G. & D. NAVIA, 2012. Cryptic species within the wheat curl mite *Aceria tosichella* (Keifer) (Acari: Eriophyoidea), revealed by mitochondrial, nuclear and morphometric data. *Invertebrate Systematics*, **26**, 417-433.

¹⁰ HUELSENBECK, J. P. & F. RONQUIST, 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, **17**, 754-755.

¹¹ NYLANDER J. A. A. 2004. MrModeltest v2. Computer program distributed by the author. Uppsala: Evolutionary Biology Centre.

¹² LARGET, B. & D. L. SIMON, 1999. Markov chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 750-759.

¹³ MAU, B., NEWTON, M. A. & B LARGET, 1999. Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. *Biometrics*, **55**, 1-12

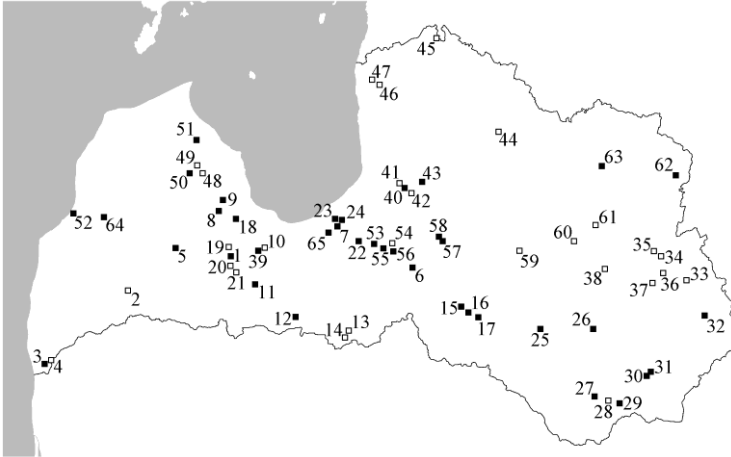
¹⁴ FENTON, B., MALLOCH, G. & E. MOXEY, 1997. Analysis of eriophyid mite rDNA internal transcribed spacer sequences reveals variable simple sequence repeats. *Insect Molecular Biology*, **6**, 23-32.

Pēc iegūto trīs DNS fragmentu garumu kombinācijas, izdarīta pumpurēču sugu noteikšana. Lai pārbaudītu precizitāti, iegūto fragmentu profilu garumu informācija salīdzināta ar fragmentiem, kas ar to pašu metodi iegūti no sekvenčēšanai izmantotās un attīrītās klonu plazmīdu DNS. Ērču suga uzskatīta par noteiktu, ja iegūti vismaz divi DNS fragmentu garumi, kas atbilda kādai no sugām, saskaņā ar literatūrā aprakstīto¹⁵.

¹⁵ LAVA KUMAR, P., FENTON, B. & A. T. JONES, 1999. Identification of *Cecidophyopsis* mites (Acari: Eriophyidae) based on variable simple sequence repeats of ribosomal DNA internal transcribed spacer-1 sequences via multiplex PCR. *Insect Molecular Biology*, **8**, 347-357.

2. REZULTĀTI

***Cecidophyopsis* ģints pumpurērču izplatība Latvijā.** Pētījuma laikā pumpurērces konstatētas tikai 375 krūmiem (31.2 %) 38 no 65 apsekotajām vietām (2.1. att.). Kopumā ērces atrastas jāņogu (sekcija *Ribes*), upeņu (sekcija *Botrycarpum*) un vēreņu (sekcija *Berisia*) pumpuros (2.1. tabula), bet pārējo augu pumpuros ērces nav atrastas.



2.1. att. *Cecidophyopsis* ģints ērcu izplatība Latvijā (no Stalažs 2012)

Distribution of Cecidophyopsis mites in Latvia

- — Apsēkotās vietas, kur pumpurērces atrastas vismaz viena auga pumpuros / *Surveyed sites where gall mites detected at least in buds of one plant*
- — Apsēkotās vietas, kur ērces nav atrastas / *Surveyed sites where gall mites not detected*

Visos gadījumos pumpurērces ir atrastas pumpuru pangās, bet nevienā gadījumā ērces nav atrastas normāla izskata pumpuros. Tikai dažām jāņogām pumpuri bija mazāk izteikti uzbrieduši nekā citiem augiem. Taču jāņogām pumpuru pangas jau kopumā ir mazāk uzbriedušas, tomēr tās ir pietiekami labi atšķiramas no normāliem pumpuriem.

Pēc invadēto augu skaita attiecīgajos biotopu veidos, proporcionāli visvairāk pumpurērču bojājumu bija augu kolekcijās (kopā 49.1 % augu), piemājas dārzos un dažās komercsaimniecībās. Komercstādījumos ar pumpurērcēm bija invadēti tikai 20 % augu (2.2. tabula 16. lappusē).

Pumpurērcu sastopamība dažādām jāņogu ģints augu grupām
Occurrence of gall mites in different Ribes groups

Saimniekaugi <i>Hosts</i>		Augi <i>Plants</i>		
apakšģints <i>subgenus</i>	sekcija <i>section</i>	bez ērcēm <i>without mites</i>	ar ērcēm <i>with mites</i>	kopā <i>in total</i>
<i>Berisia</i>	<i>Berisia</i>	28	17	45
<i>Berisia</i>	<i>Hemibotrya</i>	2	—	2
<i>Grossularia</i>	<i>Grossularia</i>	23	—	23
<i>Ribes</i>	<i>Botrycarpum</i>	596	314	910
<i>Ribes</i>	<i>Calobotrya</i>	3	—	3
<i>Ribes</i>	<i>Heritiera</i>	1	—	1
<i>Ribes</i>	<i>Ribes</i>	179	44	223
<i>Ribes</i>	<i>Symphocalyx</i>	18	—	18
<i>Grossularia</i> × <i>Botrycarpum</i>		10	—	10
Visi paraugi / <i>All samples:</i>		860	375	1235

Savvaļā pumpurērcu bojāti pumpuri lielākā daudzumā, dažiem krūmiem pat masveidā, atrasti dažām pūkainajām jāņogām (*R. spicatum*) Gaujas ielejā Siguldā.

Bojāto pumpuru izskats atšķiras starp visu triju grupu augiem — vislielākās pumpuru pangas novērotas upenēm — īpaši šķirnēm ar gaiši zaļiem pumpuriem, nedaudz mazākas pangas — vērenēm, bet vismazākās — jāņogām. Upeņu šķirnei ‘Titania’ pumpuru pangas atgādina kēdas vairāk raksturīgas jāņogām. Vērenēm pumpuru pangas vairāk ir iegarenas nekā apaļas, kas atbilst normālu pumpuru slaidajai formai. Jāņogām pangas ir izteikti ciešākas, bieži vien mazas. Vizuāli visvairāk ērcu novērotas lielajās upeņu pumpuru pangās, īpaši šķirnēm, kurām raksturīgi zaļi pumpuri.

Šķirnes ‘Titania’ gadījumā pumpurērcu visvairāk invadētu augu atrasts vecākajās augu kolekcijās un dažos vecākos komercstādījumos. Novērojumi liek domāt, ka upeņu šķirnes ‘Titania’ gadījumā ir nepieciešams ilgāks laiks, lai pumpurērces varētu augus invadēt masveidā. Par to netieši liecina tas, ka vienā laikā stādītos jaunākajos dārzos masveidā pumpuru pangas novērotas šķirnēm, kas ir ar gaiši zaļiem pumpuriem, sevišķi daudz pumpuru pangu novērotas šķirnēm ‘Katūša’ un ‘Mara Eglite’, bet tajā pašā laikā šāds bojājumu apjoms netika novērots blakus augošajai šķirnei ‘Titania’.

Novērojumi parāda, ka no komerciāli nozīmīgākajām šķirnēm pumpurērces vairāk invadē šķirnes ‘Katyūša’, ‘Mara Eglite’ un ‘Stor Klas’. Jāņogu gadījumā pumpurērces masveidā atrastas balto ogu šķirnēm ‘Kodu Valge’ un ‘Suur Kodu Valge’.

Kopsavilkums par invadēto augu īpatsvaru dažādos biotopos
Summary of infested plant proportion in different habitats

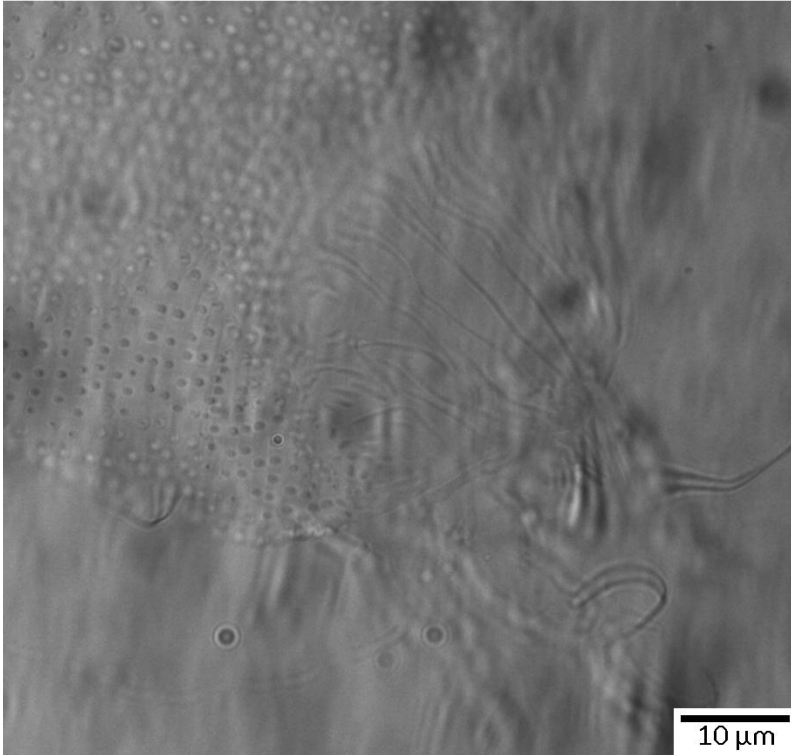
Biotops <i>Habitat</i>	Augi <i>Plants</i>					
	Visi <i>all</i>		ar ērcēm <i>with mites</i>		bez ērcēm <i>without mites</i>	
	kopā <i>in total</i>	%	kopā <i>in total</i>	%	kopā <i>in total</i>	%
Komercdārzi <i>Commercial orchards</i>	655	53.0	131	20.0	524	80.0
Augu kolekcijas <i>Plant collections</i>	385	31.2	189	49.1	196	50.9
Kokaudzētavu mātesdārzi <i>Mother plant plantations</i>	47	3.8	3	6.4	44	93.6
Piemājas dārzi un apstādījumi <i>Home gardens, greeneries</i>	54	4.4	27	50.0	27	50.0
Savvaļas biotopi / <i>Wild habitats</i>	94	7.6	35	37.2	59	62.8
Kopā / In total:	1235	100.0	385	31.2	850	68.8

Sugu noteikšana morfoloģiski. Vismaz vienu parametru — ķermeņa garumu vai platumu varēja izmērīt 300 ērcēm. Diferencējošo parametru pārklāšanās un mikroskopijas ierobežojošās iespējas atļāva ērces identificēt kā divus sugu kompleksus. Vairums apskatīto pumpurērcu indivīdu noteikti kā *Cecidophyopsis alpina / aurea* komplekss un tikai neliela daļa ērcu kā *C. ribis / selachodon* komplekss. Vienā upeņu šķirnes ‘Sozvezdie’ (atradne: Tukuma novads, augu kolekcija) pumpurā atrasta arī *Eriophyes* ģints ērce, kas līdz sugai nav noteikta.

Cecidophyopsis alpina / aurea kompleksa ērces ir ievāktas no jāņogu, upeņu un vēreņu pumpuru pangām. Ērces, kas atbilst *C. ribis / selachodon* kompleksam atrastas mazā skaitā, un tikai uz jāņogām un upenēm. *Cecidophyopsis ribis / selachodon* kompleksa ērces noteiktas pēc izteikti slaidākām ērcēm, ar mazāko ķermeņa platumu.

Analizējot morfoloģijas līdzību — ērcu ķermeņa garuma un platumu attiecības un prodorsālā vairoga līniju veidoto burtu figūras, nevarēja atrast pietiekamas atšķirības starp 1994. gadā aprakstītajām¹⁶ *C. ribis* un *C. selachodon*, kā arī starp *C. alpina* un *C. aurea*. Vairumam Latvijas paraugu ērcu prodorsālā vairoga joslu veidotais burts "M" zīmējums atbilda tam, kas ir *C. alpina* oriģinālajā aprakstā, bet daļai ērcu kā sugai *C. aurea* (2.2. att.), kas oriģinālajos sugu aprakstos ir ļoti līdzīgi.

¹⁶ AMRINE, J. W., DUNCAN, G. H., TEIFION JONES, A., GORDON, S. C. & I. M. ROBERTS, 1994. *Cecidophyopsis* mites (Acari: Eriophyidae) on *Ribes* spp. (Grossulariaceae). *International Journal of Acarology*, **20**, 139-168.



2.2. att. *Cecidophyopsis alpina / aurea* prodorsālā vairoga attēls

Figure of prodorsal shield of Cecidophyopsis alpina / aurea

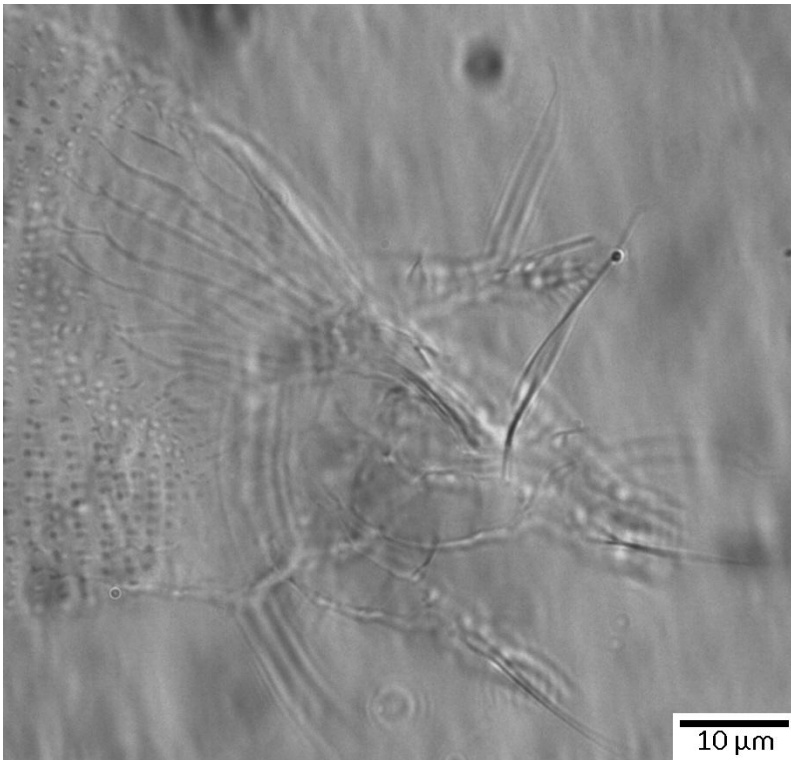
Saimniekaugs / Host: alpīnā vērene (*Ribes alpinum*)

Novērojumi parāda, ka *C. alpina / aurea* prodorsālā vairoga morfoloģija ir variabla. Sugu kompleksus var atšķirt, izmantojot ērcu garuma un platuma vidējos mērījumus. *C. alpina / aurea* ķermeņa garums vidēji var būt īsāks, nekā šīm sugām vidējais garums norādīts sugu oriģinālajā aprakstā. Atsevišķām aplūkotajām ērcēm izmērītais minimālais ķermeņa garums bija pat mazāks nekā minimālais garums sugas *C. alpina* ērcēm (153.7 μm), kas pēc sugu oriģinālā apraksta vairāk atbilstu sugai *C. grossulariae*, bet šīs sugas labi atšķiramas arī pēc ķermeņa platuma vidējiem rādītājiem, jo *C. grossulariae* ir vistievākā no visām sugām. Taču pēc tipiski platākām ērcēm *C. alpina / aurea* ir iespējams nošķirt vienīgi no *C. grossulariae*, bet tās ir grūtāk atšķirt no *C. ribis / selachodon* (2.3. att.).

Sugu noteikšana izmantojot ribosomālās DNS sekvencēšanu un filoģenētiskās analīzes. Filoģenētiskajām analīzēm kopumā iegūtas 56 ribosomālās DNS sekvences, kas, pēc *GenBank* datubāzē pieejamajām sekvencēm, atbilda

četrām *Cecidophyopsis* sugām — *C. alpina* (23 sekvences), *C. aurea* (30), *C. selachodon* (1) un *C. spicata* (2).

Latvijā *C. alpina* sastopama uz jāņogām un upenēm, kas ir jauni saimniekaugi šai sugai. Ērcēm, kas ņemtas no alpīnās vērenes (*Ribes alpinum*) neviena iegūtā sekvence neatbilda sugai *C. alpina*. Savukārt *C. aurea* ir sastopama uz upenēm, jāņogām un vērenēm, kas visi ir jauni saimniekaugi šai sugai. *C. spicata* ir sastopama vienīgi uz upenēm, bet *C. selachodon* ievāktas tikai no Gaujas ielejā savvaļā augošās pūkainās jāņogas (*Ribes spicatum*) pumpuriem. Abas šīs sugas noteiktas reizē ar kādu no citām pumpurērcu sugām — *C. alpina* un *C. aurea*. Visas sugas Latvijai ir apstiprinātas pirmo reizi.



2.3. att. *Cecidophyopsis ribis* / *selachodon* prodorsālā vairoga attēls

Figure of prodorsal shield of Cecidophyopsis ribis / *selachodon*

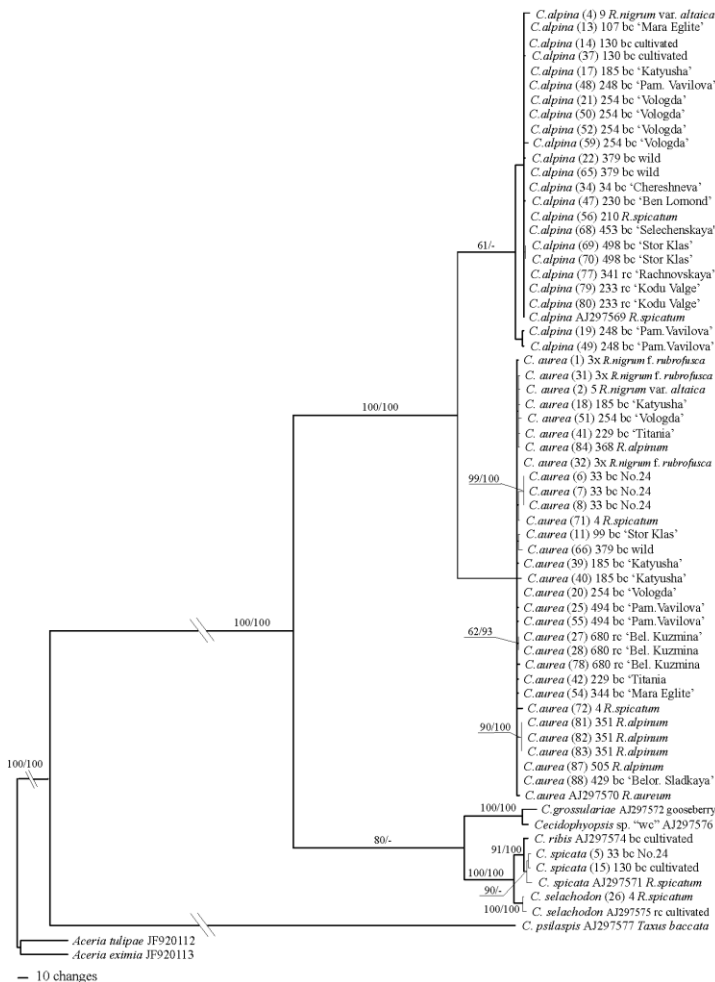
Saimniekaugs / Host: jāņoga / redcurrant

Cecidophyopsis ģints sugu filoģenētiskās radniecības salīdzināšanai izmantotas aptuveni 1400 nukleotīdu garas ribosomālās DNS sekvences, kas ietvēra iepriekš minētos ģēnus un nekodējošos reģionus. Filoģenētiskajā kokā, ar augstu statistikas atbalstu (*bootstrap support*), visas Latvijas paraugu, kā arī *GenBank*

datubāzē pieejamās sekvences sadalās trīs izteiktās grupās. Tālāk sugas sadalās mazākās grupās, atbilstoši šā brīža uz jāņogu ģints augiem sastopamo *Cecidophyopsis* ģints sugu koncepcijai (2.4. att.). Tomēr *C. aurea* un *C. alpina*, kā atsevišķiem klāsteriem, nav iegūts pietiekams statistikas atbalsts. *C. alpina* gadījumā salīdzinoši ar *C. aurea* ir vērojama lielāka vienveidība, izņemot divas sekvences, kas iegūtas no upeņu šķirnes 'Pamât' Vavilova', un kas grupējas attāli. Trijos gadījumos *C. alpina* un *C. aurea* noteiktas no viena un tā paša auga, un visos gadījumos no dažādām upeņu šķirnēm — 'Katūša', 'Vologda' un nezināma šķirne (2.4. att.). Visi trīs saimniekaugi bija no dažādām vietām.

Abu veidu filoģenētiskajās analīzēs iegūti līdzīgi rezultāti. Vienīgi vienā gadījumā *Cecidophyopsis alpina* un *C. aurea* sekvences grupējās savstarpēji jauktā veidā vienā klāsterī. *Cecidophyopsis aurea* gadījumā novērota lielāka daudzveidība, kad no atsevišķiem augiem un atradnēm iegūtās ērcu sekvences veidoja atsevišķas grupas ar augstu statistikas atbalstu. Piemēram, no Nacionālā Botāniskā dārza kolekcijas jāņogas 'Belaâ Kuzmina', no upenes hibrīda Nr. 24 Dobeles novadā un no alpīnās vērenes (*Ribes alpinum*) Ogrē. Ievērojami atšķirīgi no citiem bija visi *C. aurea* kloni no upenes Nr. 24 (Dobeles novadā), jo novērotas unikālas trīs nukleotīdu mutācijas *ITS1* reģionā, kā arī trīs atšķirīgi nukleotīdi gēnā 5.8S. Šo atšķirību dēļ būtu nepieciešams pievērst padziļinātu uzmanību ērcēm uz šī auga genotipa.

Apkopojot sekvenču rezultātus par *Cecidophyopsis* ģints sugām, kas sastopamas uz jāņogu ģints augiem, vērojama sakritība ar rezultātiem, kas iegūti sugas nosakot morfoloģiski. Abos gadījumos vērojama līdzība starp *C. alpina* un *C. aurea*, kuras morfoloģiski bija iespējams noteikt vienīgi kā *C. alpina* / *C. aurea* kompleksu. Vēl viena līdzība ir tā, ka ar abām metodēm sugas noteiktas kā dominējošās, kā arī šīm ērcēm ir noteikti jauni saimniekaugi (izplatības kartes — upenēm 2.5. att.; jāņogām 2.6. att. un vērenēm 2.7. att. (22. un 23. lappuse).



2.4. att. *Cecidophyopsis* ģints ērcu filogēnēze

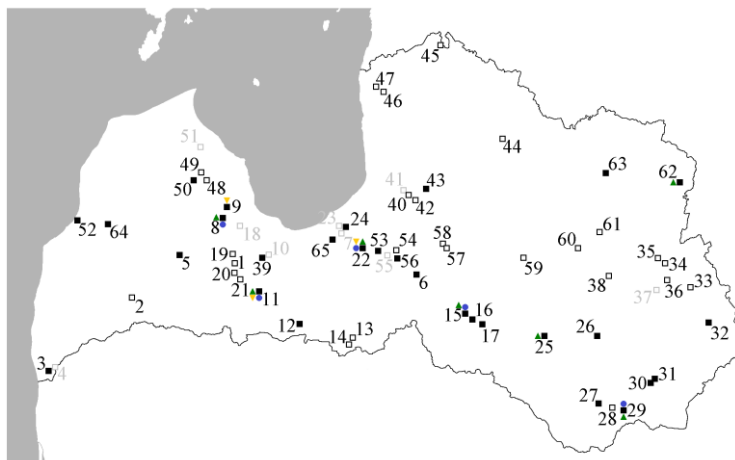
Phylogeny of *Cecidophyopsis* mites

Viens no 141 filogēnētiskajiem kociem, kas iegūts ribosomālās DNS reģionam *ITS1* / *5.8S* / *ITS2*, un daļēji ģēniem *18S* un *28S*, ietverot 64 ģints *Cecidophyopsis* astoņu ērcu sugu sekvences, kā arī *Aceria tulipae* un *Aceria eximia* kā attāli radniecīgas sugas / *One of 141 most parsimonious trees based on 64 whole ITS1 / 5.8S / ITS2 region and partial 18S, 28S sequences from eight Cecyodophiopsis species and Aceria tulipae and Aceria eximia used as outgroups*

***Cecidophyopsis* sugu noteikšana ar multiplekso PCR un fragmentu garumu analīzi.** Ar multiplekso PCR un fragmentu garumu analīzi izanalizēti visi iegūtie ērcu DNS paraugi. Iegūtajos PCR produktos ne visi amplificētie DNS paraugi atbilda tam nukleotīdu sekvenču garumam, kāds DNS fragmentiem *S1*, *S2* un *S3* ir norādīts literatūrā¹⁷. Pirms visu paraugu iegūto DNS fragmentu garumu informācijas analīzes, veikta salīdzināšana, izdarot tādu pašu multiplekso PCR jau sekvencētai un noteiktai ērcu DNS (klonu plazmīdu DNS). Līdz ar to iegūta informācija par iespējamajām fragmentu garumu nobīdēm. Iegūtās nobīdes salīdzinoši ar sekvenci kopumā variēja no -4 līdz +3 nukleotīdiem. Vismazākā nobīde novērota *C. selachodon* garākajam fragmentam *S1*, bet *C. spicata* gadījumā šim pašam DNS fragmentam nobīdes vispār nav novērots. Tālāk fragmentu garumu analīzē iegūto DNS fragmentu profili analizēti, ņemot vērā šo nobīžu diapazonu katram fragmentam.

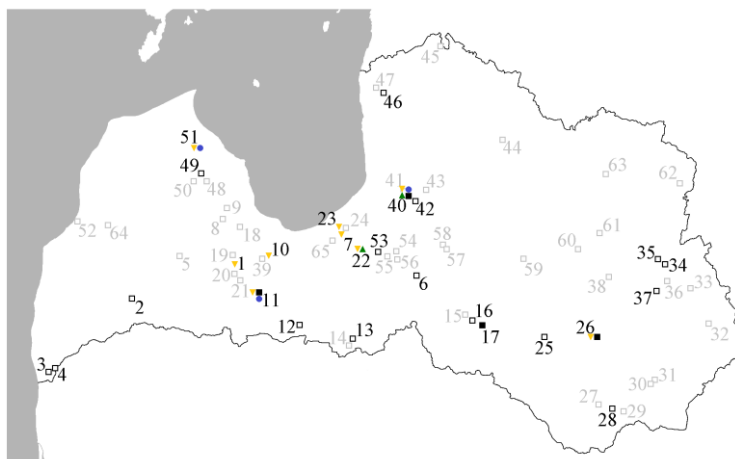
Kopumā ar multiplekso PCR, balstoties uz DNS fragmentu *S1*, *S2* un *S3* profiliem, noteiktas četras ērcu sugas — *Cecidophyopsis alpina*, *C. aurea*, *C. selachodon* un *C. spicata* (2.5., 2.6. un 2.7. att.). No tām *C. spicata* dominēja upenēm, bet nedaudz mazāk suga bija jāņogām. Vērenēm *C. spicata* noteikta tikai dažos paraugos. Jāņogu gadījumā dominēja *C. selachodon*, kas pirmo reizi noteikta arī upenēm, bet sugas *C. alpina* un *C. aurea* bija noteiktas tikai vērenēm. Daļā paraugu vienlaicīgi noteiktas vairākas sugas. Papildinot sekvencēšanas rezultātus, *C. alpina* apstiprināta arī vērenēm.

¹⁷ LAVA KUMAR, P., FENTON, B. & A. T. JONES, 1999. Identification of *Cecidophyopsis* mites (Acari: Eriophyidae) based on variable simple sequence repeats of ribosomal DNA internal transcribed spacer-1 sequences via multiplex PCR. *Insect Molecular Biology*, **8**, 347-357.



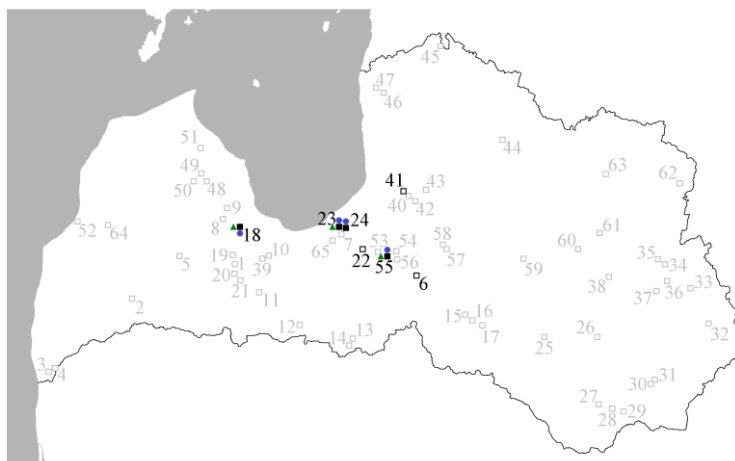
2.5. att. Noteiktās *Cecidophyopsis* ģints ērcu sugas un to izplatība upenēm
Identified Cecidophyopsis mite species: distribution on blackcurrants

- — ērces nav konstatētas / mites not found
- — *Cecidophyopsis alpina* ▲ — *Cecidophyopsis aurea*
- ▼ — *Cecidophyopsis selachodon* ■ — *Cecidophyopsis spicata*



2.6. att. Noteiktās *Cecidophyopsis* ģints ērcu sugas un to izplatība jānogām
Identified Cecidophyopsis mite species: distribution on blackcurrants

- — ērces nav konstatētas / mites not found
- — *Cecidophyopsis alpina* ▲ — *Cecidophyopsis aurea*
- ▼ — *Cecidophyopsis selachodon* ■ — *Cecidophyopsis spicata*



2.7. att. Noteiktās *Cecidophyopsis* ģints ērcu sugas un to izplatība vērenēm
Identified Cecidophyopsis mite species: distribution on alpine currants

- — ērces nav konstatētas / mites not found
 ● — *Cecidophyopsis alpina* ▲ — *Cecidophyopsis aurea*
 ■ — *Cecidophyopsis spicata*

Parausiem iegūti arī tādi DNS fragmenti, kas, ņemot vērā iepriekš noteiktās iespējamās nobīdes, neatbilda DNS fragmentiem *S1*, *S2* un *S3*. Bija arī atsevišķi gadījumi, kad sugas klātbūtni nevarēja apstiprināt, jo fragmentu garumu analizē bija amplificējies tikai viens no trim vajadzīgajiem DNS fragmentiem. Pētījuma laikā pieņemts, ka suga noteikta, ja ar automātisko ģenētisko analizatoru nolasīti vismaz divi atbilstoša garuma fragmenti.

Trim no četrām Latvijā noteiktajām sugām pirmo reizi ir konstatēti jauni saimniekaugi, kas līdz šim attiecīgajām sugām nebija zināmi (2.3. tabula).

2.3. tabula

Kopsavilkums par *Cecidophyopsis* sugām Latvijā un to saimniekaugi
Summary of Cecidophyopsis species in Latvia and their hosts

Ērcu suga <i>Mite species</i>	Upenes <i>Blackcurrants</i>	Jāņogas <i>Redcurrants</i>	Vērenes <i>Alpine currants</i>
<i>Cecidophyopsis aurea</i>	■	■	■
<i>Cecidophyopsis selachodon</i>	■	□	—
<i>Cecidophyopsis alpina</i>	■	■	□
<i>Cecidophyopsis spicata</i>	□	□	□

- — saimniekaugi bija zināmi agrāk / *host plants were known before*
 ■ — jauns saimniekaugs, kas konstatēts šajā pētījumā / *new host plant, which is found in this study*

Pētījuma laikā ir apstiprināta hipotēze, jo uz jāņogu ģints augiem konstatētas vairākas pumpurērcu sugas, kas varētu izraisīt atšķirīgu augu rezistenci katras pumpurērcu sugas gadījumā. Bez jau izvirzītās hipotēzes apstiprinājuma, ir iegūtas papildu ziņas par plašāku saimniekaugu loku katrai pumpurērcu sugai. Iegūtas arī jaunas atziņas par to, ka dēļ dažu sugu lielās ģenētiskās līdzības, sevišķi starp *C. alpina* un *C. aurea*, ir nepieciešams risināt jautājumu par šo sugu koncepciju, kam ir nepieciešami turpmāki pētījumi.

SECINĀJUMI

1. Latvijā uz jāņogu ģints augiem sastopamas četras pumpurērcu sugas — *Cecidophyopsis alpina*, *C. aurea*, *C. selachodon* un *C. spicata*, kas apstiprinātas ar DNS analīzēm. Agrāk Latvijā minētā suga *C. ribis* šajā pētījumā nav apstiprināta.
2. Automātiskā ģenētiskā analizatora izmantošana multipleksās PCR laikā iegūto DNS fragmentu profiliem ļauj atšķirt *C. spicata* un *C. selachodon* fragmentu profilus, kas nebija precīzi iespējams, izmantojot poliakrilamīda gelu.
3. Atkarībā no izmantotās noteikšanas metodes un saimniekauga, kā dominējošas sugas uzskatāmas *Cecidophyopsis alpina*, *C. aurea*, un *C. spicata*.
4. Latvijā pumpurērces sastopamas visos apsekotajos biotopos — komercstādījumos, augu kolekcijās, kokaudzētavās, piemājas dārzos un apstādījumos, kā arī savvaļā. Ar pumpurērcēm invadēti augi visvairāk novēroti augu kolekcijās (49.1 % augu) un piemājas dārzos (50.0 %).
5. Ar pumpurērcēm invadētas liela daļa pazīstamāko upeņu un jāņogu šķirņu. Visbiežāk — upeņu šķirnes 'Katūša', 'Mara Eglīte' un 'Stor Klas' un balto ogu jāņogu šķirnes 'Kodu Valge' un 'Suur Kodu Valge'.
6. Uz jāņogu ģints augiem dzīvojošās *Cecidophyopsis* ģints pumpurērces nav šauri specializētas baroties tikai uz vienas saimniekauga sugas. Trim pumpurērcu sugām apstiprināti jauni saimniekaugi: *Cecidophyopsis alpina* — upenes un jāņogas; *C. aurea* — upenes, jāņogas un vērenes; *C. selachodon* — upenes.
7. Vairāku sugu esamība uz jāņogām un upenēm norāda uz nepieciešamību turpmāk augu rezistences pētījumos ņemt vērā katrā valstī sastopamo pumpurērcu sugu sastāvu, nevis tikai vienu sugu, *Cecidophyopsis ribis*, kā tas darīts līdz šim.
8. Ņemot vērā sugu *Cecidophyopsis alpina* un *C. aurea* dominējošo raksturu, visticamāk arī šīs abas sugas ir iesaistītas upeņu reversijas vīrusa pārnēsē.
9. *Cecidophyopsis alpina* / *C. aurea*, kā arī *C. ribis* / *C. spicata* tuvā filoģenētiskā un morfoloģiskā līdzība norāda uz iespēju, ka atsevišķi taksoni nav izdalāmi kā patstāvīgas sugas. Uz jāņogu ģints augiem dzīvojošo *Cecidophyopsis* sugu gadījumā ir nepieciešami papildus padziļināti pētījumi par šo ērcu sugu koncepciju.

REKOMENDĀCIJAS

1. Lai novērstu pumpurērcu savairošanās iespējas augu kolekcijās, ģenētisko resursu kolekciju stādījumi būtu jānodala no stādījumiem, kur veic zinātniskos pētījumus un šķirņu vērtēšanu, īpaši ja pētījumi saistīti ar augu izturības pret pumpurērcēm skaidrošanu. Augu kolekcijas un mātesdārzus būtu jāierīko, kur tiešā tuvumā nav šo augu stādījumu.
2. Plānojot jāņogu ģints augu selekcijas programmas, augu rezistences mehānismu pret pumpurērcēm novērtēšanā un rezistentu šķirņu selekcijā, būtu ieteicams veikt precīzu pumpurērcu sugu identifikāciju konkrētajā valstī, reģionā. Lai varētu spriest par augu rezistenci pret pumpurērcēm, augi būtu jānovēro vismaz desmit gadus.
3. Augu kolekcijās un mātesdārzos paralēli ir jāīsteno dažādi pasākumi pumpurērcu ierobežošanai, lai nepieļautu ērcu savairošanos. Ieteicamie pasākumi — zaru ar invadētiem pumpuriem izgriešana ziemā un laputu regulāra ierobežošana. Lai ierobežotu pumpurērcu izplatīšanās iespējas, šajos stādījumos laputis jāierobežo neatkarīgi no laputu kaitējuma nozīmes.

ZINĀTNISKĀ DARBA APROBĀCIJA APPROBATION OF THE SCIENTIFIC WORK

Publikācijas Publications

Recenzēti zinātniskie raksti Peer-reviewed articles

1. STALAŽS, A., 2012. Diversity of currant (*Ribes*) species and cultivars infested by *Cecidophyopsis* mites in Latvia. *Acta Horticulturae*, (946), 333-337.
2. STALAŽS, A. & I. TURKA, (revīzijas procesā) Bibliographical checklist of eriophyoid mites (Acari: Eriophyoidea) in the fauna of Latvia. *Zootaxa*.
3. STALAŽS, A. & I. MOROČKO-BIČEVSKA, (recenzēšanas procesā) Species identification, host range and diversity of *Cecidophyopsis* mites (Acari: Trombidiformes) infesting *Ribes* in Latvia. *Experimental and Applied Acarology*.

Citi zinātniskie raksti Other articles

1. СТАЛАЖС, А. Я., 2007. О видовом составе почковых клещей рода *Cecidophyopsis* (Eriophyidae) на растениях рода *Ribes* (Grossulariaceae) и связанных с этим проблемах. In: *Актуальные проблемы садоводства России и пути их решения. Материалы Всерос. науч.-метод. конф. молодых ученых*, 2–5 июля 2007 г., Орел, 245-253.
2. STALAŽS, A., 2011. Occurrence and distribution of *Cecidophyopsis* mites on different currant cultivars and species in Latvia. *IOBC/wprs Bulletin*, **70**, 93-95.

Metodika Methodics

1. STALAŽS, A., 2010. Eiropas faunas pumpurērcu *Cecidophyopsis* ģints sugu latviskie nosaukumi. In: *V Jauno zinātnieku konference (2009), Rakstu krājums*, Rīga, 151-156. (recenzēts raksts / peer-reviewed article)

Konferenču tēzes Abstracts of conference thesis

1. STALAŽS, A., 2009. Plants of *Ribes* genus infected by gall forming *Cecidophyopsis* mites in Latvia. In: *5th International conference "Research and conservation of biological diversity in Baltic Region"*, Daugavpils (Latvia), April 22–24, 2009, *Book of abstracts*, Daugavpils, 132.
2. STALAŽS, A., 2010. *Cecidophyopsis* mites on different currant cultivars in Latvia. In: *XXVIII Nordic-Baltic Congress of Entomology*, Birštonas, August 2nd–7th, 2010, *abstract book*, 25.

3. STALAŽS, A., 2010. Occurrence and distribution of *Cecidophyopsis* mites on different currant cultivars and species in Latvia. In: *7th Workshop on integrated soft fruit production*, 20–23 September 2010, Budapest, Hungary, 27.
4. STALAŽS, A., 2012. *Cecidophyopsis* ģints pumpurērcu ģeogrāfiskās izplatības īpatnības uz *Ribes* ģints augiem Latvijā. In: *Ģeogrāfija mainīgajā pasaulē. IV Latvijas ģeogrāfijas kongress*, 2012. gada 16.–17. marts, Referātu tēzes, Rīga, 192–193.
5. STALAŽS, A. & I. MOROČKO-BIČEVSKA, 2015. Detection of *Cecidophyopsis* species and their host range in Latvia. In: *8th International Conference on Biodiversity Research*, Daugavpils, 28–30 April, 2015, *Book of abstracts*, Daugavpils, 144

Dalība konferencēs, semināros **Participation in conferences and seminars**

Starptautiskas zinātniskas konferences
International scientific conferences

1. STALAŽS, A., Plants of *Ribes* genus infected by gall forming *Cecidophyopsis* mites in Latvia. *5th International conference "Research and conservation of biological diversity in Baltic Region"*, Daugavpils, April 22–24, 2009
2. STALAŽS, A., Occurrence and distribution of *Cecidophyopsis* mites on different currant cultivars and species in Latvia. *7th Workshop on integrated soft fruit production*, 20–23 September 2010, Budapest, Hungary
3. STALAŽS, A., *Cecidophyopsis* mites on different currant cultivars in Latvia. *XXVIII Nordic-Baltic Congress of Entomology*, August 2–7, 2010, Birštonas (Lithuania)
4. STALAŽS, A. & I. MOROČKO-BIČEVSKA, Detection of *Cecidophyopsis* species and their host range in Latvia. *8th International Conference on Biodiversity Research*, Daugavpils, 28–30 April, 2015

Vietējās zinātniskas konferences
Local scientific conferences

1. STALAŽS, A., Pumpurērces *Cecidophyopsis* Keifer, 1959 un ar tām saistītās problēmas ogulāju audzēšanā, *Latvijas Universitātes 66. zinātniskā konference, Zooloģijas un dzīvnieku ekoloģijas sekcija*, 2008. gada 8. februārī.
2. STALAŽS, A., *Cecidophyopsis* pumpurērcu izplatība Latvijā, *Latvijas Universitātes 68. zinātniskā konference, Zooloģijas un dzīvnieku ekoloģijas sekcija*, 2010. gada 2. februārī.
3. STALAŽS, A., *Cecidophyopsis* ģints pumpurērcu ģeogrāfiskās izplatības īpatnības uz *Ribes* ģints augiem Latvijā. *Ģeogrāfija mainīgajā pasaulē. IV Latvijas ģeogrāfijas kongress*, 2012. gada 16.–17. marts, Rīga.
4. STALAŽS, A., Maurērcu (Acari: Eriophyoidea) ietekme uz augiem, LU 70. Zinātniskā konference, Augu bioloģijas sekcija, 2012. gada 1. februārī.

Praktiskie semināri augļkopjiem
Practical seminars for farmers

STALAŽS, A., Pumpurērces uz jāņogu ģints (*Ribes*) augiem — problēmas un kontrole — Seminar about cultivars and growing technologies of currants and raspberries, Dobeles (Latvia), July 29, 2011 (organised by Latvia–Lithuania Cross Border Cooperation Programme 2007–2013 Project LLII-060).

INTRODUCTION

Due to favourable climatic conditions, plants of the genus *Ribes* are economically important in Latvia. As regards the area, blackcurrants are one of the most widely grown berry crops. Taking into account the importance of these plants, Latvia is one of the few European countries where plants of the genus *Ribes* have been professionally bred for many years, focusing also on selection of genotypes resistant to gall mites. Some of the pests detrimental to the plants of the genus *Ribes* have not been sufficiently studied in Latvia, including gall mites of the genus *Cecidophyopsis* whose distribution and economic importance are not entirely clear, and the composition of the species of the gall mites of the genus *Cecidophyopsis* occurring in Latvia is not known. The gall mites of the genus *Cecidophyopsis* are economically detrimental pests in most blackcurrant growing regions. Considering the occurrence of gall mites in plant collections, today they are recognized as one of the most detrimental pests of blackcurrants in Latvia, yet so far their distribution in Latvia in general has not been ascertained, including commercial gardens and wild plants. Both in Latvia and in other countries, contradictions persist with regard to the resistance of several genotypes, which were introduced in new areas as resistant to gall mites. The ability of *Cecidophyopsis ribis* to adopt and overcome plant resistance may account for these contradictions. In Latvia and in other countries, creation of resistant cultivars and studies of resistance mechanisms focus on one gall mite species — *Cecidophyopsis ribis*. New information has been obtained in several other European countries about species of the genus *Cecidophyopsis*, their importance and composition depending on the region, including their potential role in the transmission of *Black currant reversion virus*.

Currently, it is believed that seven species of gall mites of the genus *Cecidophyopsis* live on the plants of the genus *Ribes*. Although only specific species of gall mites have been reported as infesting blackcurrants and redcurrants, in Finland *C. spicata* has been collected from the buds of several host plants, namely, redcurrants, blackcurrants and alpine currants. In studies from various countries, differing results have been obtained regarding the resistance of black currants to *C. ribis*, which implies that more gall mite species may infest black currants than was previously believed. This was also confirmed by the Finnish studies, identifying *C. spicata* on black currants, which was previously identified only in the buds of *Ribes spicatum*. Consequently, it was necessary to establish a possible relationship between various host plants and gall mite species infesting them, which may explain the differences observed in resistance of plants to gall mites.

The hypothesis of the Thesis: the varying composition of species of the genus *Cecidophyopsis* in different regions accounts for the varying resistance of plants.

The aim of the Thesis: to determine the composition and distribution of the species of the genus *Cecidophyopsis*, and their relationship with various genotypes of plants of the genus *Ribes* in Latvia.

The tasks of the Thesis:

1) Covering the entire territory of Latvia, to obtain material for the studies of the gall mites of the genus *Cecidophyopsis*;

2) To ascertain if molecular methods for identification of gall mite species recommended in literature can be used;

3) To determine the distribution of gall mite species on host plants of the genus *Ribes* in different biotopes, covering as many genotypes of host plants as possible;

4) On the basis of the results obtained to establish a possible relationship in distribution between gall mite species, their host plants, as well as to determine the economic importance of the species.

The Thesis has four parts — Literature review, Materials and Methods, Results, and Discussion. Amount of Thesis: 76 pages (bibliographical list and appendices not included); Thesis contains 27 tables, 18 figures; 293 bibliographical sources, and 3 appendices. Thesis has nine conclusions.

Scientific novelty of the Thesis. For the first time in Latvia, the gall mites of the genus *Cecidophyopsis* infesting the plants of the genus *Ribes* have been identified at the species level, the Thesis also explains their distribution in different habitats and on different host plants. This study is the most comprehensive research on the gall mites of the genus *Cecidophyopsis* that has been carried out to date in terms of the number of samples and host plant species and genotype diversity, which allowed new information to be obtained about the composition of mite species and their occurrence in Europe, the range of their host plants, as well as their genetic diversity. During the study, a method of molecular diagnostics was improved which was used for identification of gall mite species living on the plants of the genus *Ribes*. New host plants have been determined for the species *Cecidophyopsis alpina*, *C. aurea* and *C. selachodon*.

Practical value of the Thesis. The results of the study and findings about the composition of mite species and the range of their host plants can be used when planning fruit breeding programs for black currants, red currants and golden currants in Latvia, they can also be helpful in exploration of plant resistance mechanisms against gall mites and selection of resistant cultivars not only in Latvia, but in other European countries as well.

The study was conducted in the Latvia State Institute of Fruit-Growing between 2007 and 2014, collecting material for research in the entire territory of Latvia from 65 sites and 1,235 plants of the genus *Ribes*, including commercial orchards, plant collections, mother plants of tree nurseries, home gardens, greenery and wild plants.

Studies have been performed **as part of the projects:**

1) Project No. 2 ‘High-value Latvian berries: from cultivar to high quality, safe and healthy products’ (2007–2009) of the State Research Program No. 9: surveys on site of the areas where plants of the genus *Ribes* are growing, collection of samples and creation of DNA collections;

2) in the framework of the Leonardo da Vinci program Project No. 2010-1-LV1-LEO02-00675 (2010) skills necessary for morphological studies of mites of the eriophyoid mites were acquired at the Warsaw University of Life Sciences, under the guidance of Mariusz Lewandowski and January Boczek;

3) ERDF Project No. 2010/0317/2DP/2.1.1.1.0/10/APIA/VIAA/155 ‘Efficient fruit plant regeneration methods and development of new components for pathogen diagnostics in order to obtain virus-free planting material’ (2011–2013): identification of mite species and analysis of their genetic diversity, improvement of the identification method;

4) ESF Project No. 2013/0048/1DP/1.1.1.2.0/13/APIA/VIAA/008 ‘Establishment of a group of scientists for the research focusing on drupe propagation, improvement of quality of generative processes and possible ways of fruit utilisation’ (2013–2015): preparation of the Doctoral Thesis, presentation of research results at the international scientific conference in 2015.

1. MATERIAL AND METHODS

Surveying and sampling of plants of the genus *Ribes*. To gather the data characterising the overall situation in the country, in March and April of 2008 and 2009, surveying was performed in the areas where the plants of the genus *Ribes* were growing trying to collect the material for studies from the entire territory of Latvia and from differing biotopes (Fig. 1.1 page 7).

The plants growing in commercial orchards were surveyed, taking into account the information available to the Latvian Fruit-Growers Association about the areas where blackcurrants and redcurrants are grown. Plants growing wild were surveyed at random, i. e. in areas where it was possible to find plants of the genus *Ribes*. The main focus was on commercial orchards and plant collections, also trying to cover as many host plant genotypes as possible.

Collecting samples, three to five branches were taken from each bush cutting them as close to the ground as possible. Bud material collected from one bush is regarded as one sample. If the number of plants was sufficient, five bushes were selected from one cultivar or from a species grown in plant collections that constituted five samples. If cultivars were unknown, branches for samples were taken from five similar plants. In case of unknown black currant cultivars, samples were taken separately — from each type of the bush if the plants had differently coloured buds (green or reddish). In the wild, samples were taken from such a number of wild plants that could be found. In some cases samples were also collected from a larger number of bushes.

In total 65 sites were surveyed (Fig. 1.2 page 8) most of which were commercial orchards, and samples were collected from 1,235 bushes.

In the laboratory, normal-looking buds were randomly removed from the cut branches along with all buds whose shape differed or which already had galls. Buds were stored in 96 % ethanol.

Detection of the presence of gall mites. The collected buds were dissected with a scalpel and examined under a stereo-microscope to detect the presence of mites in the buds. If no mites were found in the buds, the results of observations were recorded stating the number of the buds which contained no mites (12,120 buds in total). Afterwards these buds were used to obtain gall mites and then for DNA extraction from gall mites.

DNA extraction from gall mites. Both parts of the dissected bud were placed in a sterile 1.5 mL Eppendorf tube, then 1 mL of sterile water was poured on the sample. Tubes with the buds were inserted in the centrifuge Eppendorf Centrifuge 5415 R and the samples were centrifuged at 13,200 rpm for five minutes. After centrifugation, the water was carefully extracted and bud residues were removed.

Extraction of DNA from gall mites was carried out using the genomic DNA extraction kit (#K0512, Thermo Scientific™) according to the manufacturer's protocol. In total, 665 DNA samples of gall mites were obtained (Table 1.1 page 9).

Morphological identification of species. For morphological identification of gall mite species 16 sample bushes were selected from which 324 mites were analysed. When preparing samples for microscopy, mites were placed in a drop of lactic acid to clean them, where they were heated for 12 hours at about 70 C°.

After initial treatment of mites in lactic acid, they were mounted in a drop of Berlese's fluid. After placing a cover slip over the sample prepared for microscopy, it was heated to 70 C° completing the cleaning of the mite and drying up the fixative solution. After about 12-hour long heating, the sample was ready for microscopic analysis.

The microscope Leica DMLS (eyepieces HC PLAN s 10×/22, objectives PLAN 4×/0.10; 10×/0.22 PH 1 and 100×/1.25 oil PH 3) and the digital camera Leica EC3 were used for identification of mite species and the images were processed using the software Leica LAS EZ (2010 version 2.0.0).

Initially, the samples prepared for microscopy were examined using objectives with magnification 4× and 10× in order to find mites in the prepared samples; as well as magnification 10× — to measure the length and width of mites; the oil-immersion objective with magnification 100× — to view specific morphological features clearly and, in some cases, to measure the width of the mite. All images were obtained using the 100× objective.

To distinguish the mites, visual differences of prodorsal shield lines were used according to the description of the species¹⁸, paying attention to figures 'M', 'N' and 'A' formed by the first to fourth submedian lines of the prodorsal shield. The features measured: the length and width of mites and the relationship between the length and width.

Polymerase chain reaction (PCR) amplification, cloning and sequencing. The full ribosomal DNA ITS/5.8S region and partial 18S and 28S genes were amplified using primers E and C¹⁹. PCR amplification was carried out in a reaction volume of 20 µL, including 1.5 µL of genomic DNA, 1 µL of each 10 µM primer, 0.4 µL Phire Hot Start II DNA polymerase (#F-122L, Thermo Scientific™), 10 µL 2X Phire Animal Tissue PCR buffer (#F-140, Thermo Scientific™) and 6.4 µL PCR grade water. Purified water was also used for control. To facilitate PCR, a thermal cycler, EP Gradient, Eppendorf, was used which was programmed as follows: 1 cycle at 98 °C with duration of 5 minutes and 37 cycles with the following settings: 10 seconds at 98 °C, 10 seconds at 65 °C and 25 seconds at 72 °C, finishing with a 1-minute final step at 72 °C. The obtained products of PCR amplification were separated by electrophoresis using agarose gel (1.5 %) to which ethidium bromide was added to visualise the existing DNA fragments in ultraviolet

¹⁸ AMRINE, J. W., DUNCAN, G. H., TEIFION JONES, A., GORDON, S. C. & I. M. ROBERTS, 1994. *Cecidophyopsis* mites (Acari: Eriophyidae) on *Ribes* spp. (Grossulariaceae). *International Journal of Acarology*, **20**, 139-168.

¹⁹ FENTON, B., BIRCH, A. N. E., MALLOCH, G., WOODFORD, J. A. T. & C. GONZALEZ, 1994. Molecular analysis of ribosomal DNA from the aphid *Amphorophora idaei* and an associated fungal organism. *Insect Molecular Biology*, **3**, 183-189.

light. A length marker GeneRuler Low Range DNA Ladder (# SM1193, Thermo Scientific™) was used to mark the approximate lengths of DNA.

The amplified fragments were ligated into the pJET1.2/blunt cloning vector using CloneJET™ PCR Cloning Kit (#K1232, Thermo Scientific™), focusing on blunt ends of DNA strands and protocol of uncleaned PCR reaction in accordance with the manufacturer's instructions. Transformation was performed using *Escherichia coli* strain TOP10 (Invitrogen™) and a reagent kit TransformAid™ Bacterial Transformation Kit (# K2710, Thermo Scientific™).

Colonies of positive clones were analysed directly by PCR using the same primers as in the original amplification and the reagent kit Dream Taq Green PCR Master Mix (#K1081, Thermo Scientific™). Preparation of plasmids for sequencing was done with QIAprep Spin Miniprep columns (#27104, Qiagen). Primers pJET1.2 F and R (together with vector) and mite-specific primers MiteB and MiteG²⁰ were used for sequencing of the cloned fragments. The information about the DNA samples used for sequencing is summarised in Table 1.2 (page 11).

Further DNA sequencing was outsourced to the Latvian State Forestry Research Institute 'Silava'.

Phylogenetic analyses. Manual editing of the obtained sequences was performed using the SeqMan program from the Lasergene 9.1 software package (DNASTAR Inc., USA). Alignment of multiple sequences was carried out using the Clustal W method and percentage similarities of sequence pairs were calculated using the MegAlign program of Lasergene 9.1. Nucleotide sequences of the whole amplified region, in total from 56 clones which were obtained from 27 DNA samples of gall mites, were compared with eight taxa sequences of *Cecidophyopsis* which are available in the GenBank database²¹ from the earlier studies²². In addition, separate sequence data matrices were prepared for the ribosomal DNA regions ITS1, 5.8S and ITS2 to compare them with other available sequences²³. The BLAST analysis²⁴ was performed for initial comparison of sequences.

The software PAUP (version 4.0b10²⁵) was used to make phylogenetic analyses (Maximum Parsimony) for partial 18S, 28S genes and a complete ITS1/5.8S/ITS2 region with 1,000 random addition sequences and without the MulTrees option, but using the option Steepest descent, Tree bisection reconnect-

²⁰ FENTON, B., MALLOCH, G. & E. MOXEY, 1997. Analysis of eriophyid mite rDNA internal transcribed spacer sequences reveals variable simple sequence repeats. *Insect Molecular Biology*, **6**, 23-32.

²¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

²² FENTON, B., BIRCH, A. N. E., MALLOCH, G., LANHAM, P. G. & R. M. BRENNAN, 2000. Gall mite molecular phylogeny and its relationship to the evolution of plant host specificity. *Experimental and Applied Acarology*, **24**, 831-861.

²³ LAVA KUMAR, P., FENTON, B. & A. T. JONES, 1999. Identification of *Cecidophyopsis* mites (Acari: Eriophyidae) based on variable simple sequence repeats of ribosomal DNA internal transcribed spacer-1 sequences via multiplex PCR. *Insect Molecular Biology*, **8**, 347-357.

²⁴ ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. & D. J. LIPMAN, 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, **215**, 403-410.

²⁵ SWOFFORD, D. L., 2002. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*And Other Methods). Version 4.0b10. Sinauer Associates: Sunderland, Massachusetts.

tion branch swapping and perceiving spaces as a fifth nucleotide. The same parameters were used for calculating bootstrap support which was carried out in 1,000 repetitions with addition of five random sequences in each of 1,000 repetitions. The outgroup analysis included two distantly related species, namely, *Aceria tulipae* (GenBank No. JF920112) and *Aceria eximia* (JF920113) from the earlier studies²⁶.

For a more thorough analysis of similarities shared among the *Cecidophyopsis* species phylogenetic analyses were conducted also using a different method, i. e. Bayesian analyses in the MrBayes software program (version 3.0b4²⁷). Before the sequence analysis, the most appropriate model of analysis was determined for the data matrix using the software program MrModeltest v2²⁸, and this model was GTR + G. The method Markov chain Monte Carlo^{29, 30} was used to determine posterior probabilities of phylogenetic trees.

Identification of the *Cecidophyopsis* species with multiplex PCR and analysis of fragment length. All DNA samples obtained from the mites were subjected to multiplex PCR reaction to identify the mite species, using the methodology described in previous publications and four primers developed previously³¹, obtaining fragments S1, S2 and S3 of the ribosomal DNA region which includes the ITS1 region and certain nucleotide sequences of the gene 18S and 5.8S. In this study, modification was performed, using primers MITS1 and MITS3 that were labelled with fluorescent dye 6-FAM and HEX at the 5' end. Primers labelled with fluorescent dyes were used in the study so that it could be possible to identify the obtained DNA fragments with the automated genetic analyzer.

PCR amplification was carried out in a reaction volume of 20 μ L, including 1 μ L of genomic DNA, 1 μ L of each 10 μ L primer, 10 μ L of 2X Phire Animal Tissue PCR buffer (#F-140, Thermo ScientificTM), 0.4 μ L of Phire Hot Start II DNA polymerase (#F-122L, Thermo ScientificTM) and 4.6 μ L of PCR grade water. Purified water was also used for control. To facilitate PCR, a thermal cycler, EP Gradient, Eppendorf, was used which was programmed as follows: 1 cycle at 98 $^{\circ}$ C with duration of 5 minutes and 35 cycles with the following settings: 5

²⁶ SKORACKA, A., KUCZYNSKI, L., DE MENDONCA, R. S., DABERT, M., SZYDŁO, W., KNIHINICK, D., TRUOL, G. & D. NAVIA, 2012. Cryptic species within the wheat curl mite *Aceria tosichella* (Keifer) (Acari: Eriophyoidea), revealed by mitochondrial, nuclear and morphometric data. *Invertebrate Systematics*, **26**, 417-433.

²⁷ HUELSENBECK, J. P. & F. RONQUIST, 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, **17**, 754-755.

²⁸ NYLANDER J. A. A. 2004. MrModeltest v2. Computer program distributed by the author. Uppsala: Evolutionary Biology Centre.

²⁹ LARGET, B. & D. L. SIMON, 1999. Markov chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 750-759.

³⁰ MAU, B., NEWTON, M. A. & B LARGET, 1999. Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. *Biometrics*, **55**, 1-12

³¹ FENTON, B., MALLOCH, G. & E. MOXEY, 1997. Analysis of eriophyid mite rDNA internal transcribed spacer sequences reveals variable simple sequence repeats. *Insect Molecular Biology*, **6**, 23-32.

seconds at 98 °C, 7 seconds at 59 °C and 20 seconds at 72 °C, finishing with a 1-minute final step at 72 °C.

Further automated identification of the obtained DNA fragments was outsourced to the Latvian State Forestry Research Institute 'Silava'.

Gall mite species were identified on the basis of the length combinations of the three obtained DNA fragments. To verify the accuracy, the length of the obtained fragments was compared with the length of the fragments that were obtained from purified clone plasmid DNA used in sequencing, applying the same method. A mite species was considered to be identified if at least two lengths of DNA fragments were obtained, which corresponded to some of the species described in literature³².

³² LAVA KUMAR, P., FENTON, B. & A. T. JONES, 1999. Identification of *Cecidophyopsis* mites (Acari: Eriophyidae) based on variable simple sequence repeats of ribosomal DNA internal transcribed spacer-1 sequences via multiplex PCR. *Insect Molecular Biology*, **8**, 347-357.

2. RESULTS

Distribution of gall mites (genus *Cecidophyopsis*) in Latvia. Gall mites were found on 375 bushes (31.2 %) in 38 of 65 surveyed sites (Fig. 2.1 page 14). Overall, mites were found in buds of redcurrants (section *Ribes*), blackcurrants (section *Botrycarpum*) and alpine currants (section *Berisia*) (Table 2.1 page 15), while no mites were found in buds of the other species.

In all cases gall mites were found in the galls of the buds, while no mites at all were found in normal-looking buds. Only buds of a few redcurrants were less swollen as compared to other plants. Though bud galls of redcurrants are generally less swollen, yet they can be clearly distinguished from normal buds.

The highest percentage of damage was caused by gall mites to plant collections (in total 49.1 % of the plants), home gardens and some commercial orchards. Overall, occurrence of gall mites in commercial orchards was minimal, only 20 % of the plants were infested (Table 2.2 page 16).

Large numbers of buds of wild plants were infested with gall mites, on some bushes of *Ribes spicatum* in the Gauja Valley, in Sigulda, even the majority of buds were damaged.

The appearance of damaged buds differs among the plants of all three groups: blackcurrants have the biggest galls, especially the cultivars with light-green buds; alpine currants have slightly smaller galls, while redcurrants have the smallest ones. Bud galls of the blackcurrant cultivar 'Titania' resembled galls which were more characteristic of redcurrants. Bud galls of alpine currants were rather oblong than round what is a typical slender shape of normal buds. Redcurrant galls occur more densely and they often are small. Visually, most mites were spotted on the large galls of blackcurrant buds, especially of the cultivars which had green buds.

With regard to the cultivar 'Titania', the plants most damaged by gall mites were found in the older plant collections and some older commercial plantations. These observations imply for the cultivar 'Titania', more time is needed for gall mites to infest the plants on a larger scale. This can be inferred from the fact that in recently established gardens, where several cultivars were planted at approximately the same time, cultivars with light green buds had a large number of bud galls. The cultivars 'Katūša' and 'Mara Eglite' had a particularly large number of bud galls, while the plants of the cultivar 'Titania' growing nearby were not damaged to such an extent.

Observations show that among the commercially important cultivars, gall mites most often infest the cultivars 'Katūša', 'Mara Eglite' and 'Stor Klas'. In case of redcurrants, large numbers of gall mites were found on the plants of the white berry cultivars 'Kodu Valge' and 'Suur Kodu Valge'.

Morphological identification of species. At least one parameter, i. e. the length or width of the body could be measured for 300 mites. Overlapping of distinguishing parameters and limited options of microscopy allowed identifying

mites as two complexes of species. Most of the examined specimens of gall mites were identified as the complex of *Cecidophyopsis alpina / aurea*, and only a small percentage of mites were identified as the complex of *C. ribis / selachodon*. One bud of the black currant cultivar ‘Sozvezdie’ (site: Tukums novads, plant collection) also contained a mite of the genus *Eriophyes*, the species of which has not been identified.

Mites of the complex *Cecidophyopsis alpina / aurea* were collected from bud galls of redcurrants, blackcurrants and alpine currants. Mites that correspond to the *C. ribis / selachodon* complex were found in smaller numbers and only on the plants of redcurrants and blackcurrants. Mites of the complex *Cecidophyopsis ribis / selachodon* were identified as markedly thinner, with the smallest body width.

Analysing morphological similarities, i. e. proportion between the length and width of mites’ bodies and figures of letters formed by prodorsal shield lines, no distinct differences were found between those of *C. ribis* and *C. selachodon* described in 1994³³ and those between *C. alpina* and *C. aurea*. The figure ‘M’ formed by prodorsal shield lines in most of Latvia’s samples corresponded to the one included in the original *C. alpina* description, while some of the samples had features characteristic of the species *C. aurea* (Fig. 2.2 page 17) that are very similar in the original descriptions of the species.

Observations show that morphology of the prodorsal shield of *Cecidophyopsis alpina / aurea* is variable. Complexes of species can be distinguished using the average values of their length and width measurements. For *Cecidophyopsis alpina / aurea* the average length of the body may be shorter than the average length of these species indicated in their original description. The measured minimum length of the body of some of the examined mites was even smaller than the minimum length of *C. alpina* (153.7 µm), which would correspond more to *C. grossulariae* according to the original description of the species, however, these species can be clearly distinguished also by their average parameters of the width of the body since *C. grossulariae* is the thinnest of all these species. *Cecidophyopsis alpina / aurea* are typically wider and they can easily be distinguished from *C. grossulariae*, but it is difficult to distinguish them from *C. ribis / selachodon* (Fig. 2.3 page 18).

Identification of species using ribosomal DNA sequencing and phylogenetic analyses. Overall 56 ribosomal DNA sequences were obtained for phylogenetic analyses, and according to the sequences deposited in the GenBank database they corresponded to four *Cecidophyopsis* species, namely, *C. alpina* (23 sequences) *C. aurea* (30), *C. selachodon* (1) and *C. spicata* (2).

In Latvia, *C. alpina* occurs on redcurrants and blackcurrants which are new host plants for this species. For the mites collected from *Ribes alpinum*, none of the

³³ AMRINE, J. W., DUNCAN, G. H., TEIFION JONES, A., GORDON, S. C. & I. M. ROBERTS, 1994. *Cecidophyopsis* mites (Acari: Eriophyidae) on *Ribes* spp. (Grossulariaceae). *International Journal of Acarology*, **20**, 139-168.

obtained sequences corresponded to the species *C. alpina*. By contrast, *C. aurea* occurs on blackcurrants, redcurrants and alpine currants, all of which are new host plants for this species. *Cecidophyopsis spicata* occurs only on blackcurrants, but *C. selachodon* was collected only from the buds of *Ribes spicatum* growing wild in the Gauja Valley. Both these species were identified together with one of the other gall mite species — *C. alpina* and *C. aurea*. For Latvia, all the species have been confirmed for the first time.

Approximately 1,400-nucleotide ribosomal DNA sequences were used to compare phylogenetic affinity of the species of the genus *Cecidophyopsis*, which included the above-mentioned genes and non-coding regions. In the phylogenetic tree, with high bootstrap support, all Latvian samples, as well as the sequences available in the GenBank database, fall into three separate groups. Further the species fall into smaller groups according to the current concept of the species of genus *Cecidophyopsis* occurring on the plants of the genus *Ribes* (Fig. 2.4 page 20). However, *Cecidophyopsis aurea* and *C. alpina*, as individual clusters, lack sufficient statistical support. In case of *C. alpina*, in comparison with *C. aurea*, there is a greater uniformity; with the exception of two sequences that are derived from the black currant cultivar ‘Pamât’ Vavilova’ and which distantly may belong to the same group. In three cases, *C. alpina* and *C. aurea* were identified from the same plant, and in all cases from different blackcurrant cultivars, i. e. ‘Katūša’, ‘Vologda’ and an unknown cultivar (Fig. 2.4 page 20). All three host plants were from different sites.

Both types of phylogenetic analyses produced similar results. In only one case *Cecidophyopsis alpina* and *C. aurea* sequences grouped in a mutually mixed way in one cluster. In case of *C. aurea*, a greater diversity was observed when the sequences of the mites collected from separate plants and sites formed separate groups with high bootstrap support. For example, the ones collected from the redcurrants ‘Belaâ Kuzmina’ growing in the plant collection of the National Botanic Garden of Latvia, from the blackcurrant hybrid No. 24 in Dobeles novads and from *Ribes alpinum* in Ogre city. All *C. aurea* clones from the blackcurrant No. 24 (Dobeles novads) considerably differed from the rest since unique three nucleotide mutations in the ITS1 region were observed, as well as three different nucleotides in the 5.8S gene. Due to these differences, it would be necessary to pay greater attention to the mites on the plants of this genotype.

The sequencing results regarding the species of the genus *Cecidophyopsis* occurring on the plants of the genus *Ribes*, coincide with the results obtained when identifying species morphologically. In both cases, similarities are observed between *C. alpina* and *C. aurea*, the morphology of which could be identified only as the complex of *C. alpina* / *aurea*. Another similarity is the fact that the species are identified as dominant with both methods, and that new host plants of these mites have been established (distribution maps — for blackcurrants Fig. 2.5 (page 22); redcurrants Fig. 2.6 (page 22) and alpine currants Fig. 2.7 (page 23)).

Identification of the *Cecidophyopsis* species with multiplex PCR and analysis of fragment length. All obtained mite DNA samples were subjected to multiplex PCR and analysis of fragment length. Not all amplified DNA samples in the obtained PCR products corresponded to the length of nucleotide sequences indicated for the DNA fragments S1, S2 and S3 in literature³⁴. Before analysing the information about the length of the obtained DNA fragments of all the samples, the comparison was made performing the same multiplex PCR on mite DNA (clone plasmid DNA) that had been previously sequenced and identified. Thus, the information was acquired on possible deviations in fragment length. On the whole, the deviations compared to the sequence varied from -4 to +3 nucleotides. The smallest deviation was for the longest fragment S1 of *Cecidophyopsis selachodon*, but in case of *C. spicata* no deviation was observed for the same DNA fragment at all. Then the DNA fragment profiles which were obtained in the analysis of fragment length were analysed, taking into account the range of these deviations for each fragment.

In general, on the basis of S1, S2 and S3 profiles of DNA fragments, four mite species were identified using multiplex PCR, i. e. *Cecidophyopsis alpina*, *C. aurea*, *C. selachodon* and *C. spicata* (Fig. 2.5 (page 22); 2.6 (page 22) and 2.7 (page 23)). Most often the samples contained the species *C. spicata*, which was the dominant species for blackcurrants and to a lesser degree — for redcurrants. The species was identified only in some samples for alpine currants. In case of redcurrants *C. selachodon* was dominant and for the first time it was also found on blackcurrants, but the species *C. alpina* and *C. aurea* were found only on alpine currants. In some of the samples several species were identified together. In addition to sequencing results, *C. alpina* was also identified on alpine currants.

There were also such DNA fragments obtained from the samples which, taking into account the possible deviations established previously, did not correspond to the necessary DNA fragments S1, S2 and S3. There were also separate cases when the presence of the species could not be confirmed because only one of the three required DNA fragments had amplified in the analysis of fragment length. During the research, the species was deemed to be identified if the automated genetic analyzer had read at least two fragments of an appropriate length.

For the first time new host plants have also been established for three of the four species identified in Latvia which so far were not known for the respective species (Table 2.3 page 23).

During the study the hypothesis was confirmed, since several gall mite species were found on the plants of the genus *Ribes* which may account for a different resistance of plants to each gall mite species. In addition to the confirmed hypothesis, new findings have been obtained about the range of host plants for

³⁴ LAVA KUMAR, P., FENTON, B. & A. T. JONES, 1999. Identification of *Cecidophyopsis* mites (Acari: Eriophyidae) based on variable simple sequence repeats of ribosomal DNA internal transcribed spacer-1 sequences via multiplex PCR. *Insect Molecular Biology*, **8**, 347-357.

each gall mite species. Besides, it has been established that due to considerable genetic similarities between several species, especially between *C. alpina* and *C. aurea*, it is necessary to review the concept of these species, which requires further studies.

CONCLUSIONS

1. In Latvia, four species of gall mites infest plants of the genus *Ribes*, namely, *Cecidophyopsis alpina*, *C. aurea*, *C. selachodon* and *C. spicata*, and it has been proved by DNA analyses. This study provided no proof of the species *C. ribis*, which was previously reported in Latvia.
2. The automated genetic analyzer allows distinguishing between the fragment profiles of *C. spicata* and *C. selachodon* analysing the DNA fragment profiles obtained during the multiplex PCR which could not be done precisely using polyacrylamide gel.
3. Depending on the used method of identification and the host plant, *Cecidophyopsis alpina*, *C. aurea* and *C. spicata* are considered to be the dominant species.
4. In Latvia, gall mites occur in all the habitats surveyed, i. e. in commercial plantations, plant collections, tree nurseries, home gardens and greenery, as well as in the wild. A considerable amount of the plants infested with gall mites were observed in plant collections (49.1 % of the plants) and in home gardens (50.0 %).
5. A large number of the most popular blackcurrant and redcurrant cultivars are infested with gall mites. Most often gall mites live on blackcurrant cultivars 'Katūša', 'Mara Eglite' and 'Stor Klas', and on white berried redcurrant cultivars 'Kodu Valge' and 'Suur Kodu Valge'.
6. The gall mites of the genus *Cecidophyopsis* living on the plants of the genus *Ribes* are not specialized to feed off only one host plant species. It has been confirmed that three gall mite species have new host plants: for *Cecidophyopsis alpina* — blackcurrants and redcurrants; for *C. aurea* — blackcurrants, redcurrants and alpine currant; for *C. selachodon* — blackcurrants.
7. The existence of several species on red currants and black currants means that the composition of species of the gall mites occurring in each country should be taken into account in further studies of plant resistance, not just one species, *Cecidophyopsis ribis*, as it has been done so far.
8. In view of the dominant nature of the species *Cecidophyopsis alpina* and *C. aurea*, both these species are likely to transmit *Black currant reversion virus*.
9. Close phylogenetic and morphological similarity between *Cecidophyopsis alpina* / *C. aurea* as well as *C. ribis* / *C. spicata* implies that separate taxa may not be distinguished as independent species. In case of the *Cecidophyopsis* species living on the plants of the genus *Ribes* additional in-depth studies are necessary on the concept of these mite species.

RECOMMENDATIONS

1. To eliminate the possibility of gall mites multiplying in plant collections, the orchards of the plant genetic resources collections should be separated from orchards which are used for scientific research and evaluation of cultivars, especially if studies are related to understanding plant resistance to gall mites.
2. When plant breeding programs are planned, for evaluation of mechanism of plant resistance against gall mites, it is suggested to do adequate identification of gall mites in a particular country or region. To enable definitive conclusions on plant resistance against gall mites, it would be necessary to provide for plant observations at least for ten years.
3. In addition, it is necessary to provide different measures to prevent gall mites in plant collections and mother plant plantations. Recommended measures are cutting of infested branches during winter period, and regular elimination of aphids. To eliminate possibilities for gall mites to spread, in the previously mentioned plantations, aphids should be eliminated independently of the degree of damage caused by them.