



10 Международный Нематологический Симпозиум
и научная школа по теоретической и прикладной
нематологии для молодых ученых

Научная программа

01 – 05 июля 2013г.

Голицыно – Большие Вязёмы

Редколлегия сборника:

М.В. Приданников *к.б.н., ВНИИ фитопатологии, Большие Вязёмы, МО
Центр паразитологии ИПЭЭ РАН, г. Москва*

Ж.В. Удалова *к.б.н., Центр паразитологии ИПЭЭ РАН, г. Москва*

Н.Н. Буторина *к.б.н., Центр паразитологии ИПЭЭ РАН, г. Москва*

Материалы 10 Международного нематологического симпозиума. Большие Вязёмы: *Всероссийский Научно-исследовательский Институт Фитопатологии*, 2013. 135с.

В сборнике представлены статьи, подготовленные по материалам 10-го Международного нематологического симпозиума Российского общества нематологов (1-5 июля, 2013г, Голицыно – Большие Вязёмы, Россия). Рассмотрены вопросы, связанные с изучением теоретических и прикладных проблем современной нематологии: экологии популяций, оценки видового разнообразия, филогении и таксономии нематод, роль нематод в индикации трансформации или загрязнения наземных и водных экосистем, актуальные проблемы мониторинга и управления популяциями паразитических нематод, изучение паразито-хозяйственных отношений.

Симпозиум проведен при финансовой поддержке

Международного Научно-Технического Центра

Agricultural Research Service (ARS USDA)

Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант Г 13-04-06042\13)

Фонда Дмитрия Зимина «Династия» (грант ДП-СШ-03/13)

ЗАО «Щелково-Агрохим»



© Коллектив авторов, 2013

© ВНИИ фитопатологии, Большие Вязёмы, МО
Центр паразитологии ИПЭЭ РАН, г. Москва

Организаторы:

Российское общество нематологов

Всероссийский научно исследовательский институт фитопатологии

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова

Институт биологии Карельского научного центра

Институт биологии моря ДВО РАН

При поддержке:

**Отделения биологических наук
Российской Академии Наук**

и

**Отделения защиты и биотехнологии растений
Российской академии сельскохозяйственных наук**

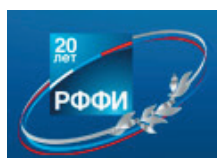
Спонсоры:



Международный Научно-Технический Центр



Agricultural Research Service (ARS USDA)



Российский Фонд Фундаментальных Исследований



Фонд Дмитрия Зимина «Династия»



ЗАО «Щелково-Агрохим»



Оглавление:

Аникиева Л.В. Структура и функционирование паразитарной системы нематоды <i>Toxascaris leonina</i> – паразита хищных млекопитающих	6
Байчева О., Удалова Ж.В., Зиновьева С.В., Герасимова Н. Г., Дамянова А. Влияние соединений хитозана с салициловой кислотой на заражение томатов <i>Meloidogyne incognita</i>	7
Белогурова Л.С. Мейобентос глубоководного района залива Петра великого и анализ сообществ свободноживущих нематод	11
Блюммер А.Г., Ривкус Ю.З. Нематодная инвазия как фактор влияния на численность популяций блохи <i>Cortopsylla lamellifer rostrata</i> Ioff et Tifl., 1934 (Syphonaptera, Cortopsyllidae), паразитирующей на песчанках в центральных и южных Кызылкумах	13
Бутова К. Б., Приданников М.В. Фитопаразитическая галловая нематода <i>Meloidogyne hapla</i> в России	16
Ефейкин Б.Д., Михайлов К.В., Алёшин В.В., Спиридонов С.Э., Панчин Ю.В. Филогенетическое родство волосатиков и нематод по результатам анализа рибосомальных белков (RPL-RPS)	17
Жилина Т.Н., Шевченко В.Л. Почвообитающие нематоды сосновых лесов природно-заповедных территорий Черниговщины	20
Жилоков А., Кожевников К. Электронный учет коллекций патогенных биологических агентов (ПБА)	23
Зиновьева С.В. Устойчивость растений к паразитическим нематодам: молекулярно-генетические и биохимические аспекты	26
Зиновьева С.В., Удалова Ж.В., Герасимова Н.Г. Роль жасмоновой и салициловой кислот в устойчивости томатов к галловой нематоде, <i>Meloidogyne incognita</i> (Kofoid, White, 1919)	29
Иешко Е.П., Матвеева Е.М., Сысоева М.И. Генотипическая вариабельность восприимчивости картофеля к <i>Globodera rostochiensis</i>	32
Колесова Е.А., Шестеперов А.А. Разработка компьютерной модели «Прогноз потерь урожайности картофеля в зависимости от интенсивности развития глободероза»	34
Корма А.М. К биологии нематод рода <i>Bursaphelenchus</i> Восточного полесья Украины	36
Коропец С.И. Особенности развития нематодозов семян <i>Pinus sylvestris</i>, проблемы их диагностики и прогноза	38
Кулинич О.А., Арбузова Е.Н., Козырева Н.И., Мазурин Е.С., Ромашова Н.Б., Кольчихина М.С., Рысс А.Ю. Нематоды <i>Bursaphelenchus mucronatus</i> и связанные с ними бактерии, как возможная причина гибели сосновых насаждений на территории России	41
Лаврова В.В., Сысоева М.И., Матвеева Е.М. Температурный прайминг – основа повышенной устойчивости растений к заражению фитонематодой	43
Матвеева Е.М., Сущук А.А., Диева Д.С. Сообщества почвенных нематод под пропашными культурами и многолетними травами (на примере Южной Карелии)	46
Мироненко Н.В., Rogozina E.V., Лиманцева Л.А., Афанасенко О.С. Выживаемость патотипа Ro1 <i>Globodera rostochiensis</i> на частично устойчивых гибридах картофеля	47

Приданников М.В., Петелина Г.Г. Проект МНТЦ по изучению биоразнообразия нематод России как основа международных исследований фитопаразитических нематод Евразии	50
Романенко Н.Д., Перевертин К.А., Метлицкая К.В., Заец В.Г., Таболин С.Б., Попова Е.Н., Попов И.О., Петруня И.В. Изучение биологической и хозяйственной активности грибов и бактерий - антагонистов и возможности их использования в защите растений	52
Романенко Н.Д., Перевертин К.А., Попов И.О., Попова Е.Н., Петруня И.В. К вопросу выявления комплексных (смешанных) вирусных инфекций и оценка их влияния на урожай клубней картофеля	54
Рысс А.Ю. О приложимости концепции трансмиссивных инфекций к нематодозам растений и животных	58
Рысс А.Ю., Андреев М.П., Курбатова Л.Е. Нематоды Антарктиды	59
Рысс А.Ю. Исторические этапы изучения нематод в России на примере коллекции зоологического института РАН	59
Спирidonов С.Э., Одоевская И.М., Букина Л.А., Хилюта Н.В. Нуклеотидные различия по последовательностям <i>Coxb mtDNA</i> между видами рода <i>Trichinella</i> из Российских арктических регионов	60
Суцук А.А., Матвеева Е.М. Сообщества почвенных нематод северных островных биоценозов	63
Таболин С.Б. К вопросу о фауне нематод в почве парков г. Москвы	66
Таболин С.Б., Романенко Н.Д., Титова А.С. К вопросу разработки экологически безопасных защитных мероприятий от комплекса вредных организмов на землянике садовой	68
Фадеева Н.П., Мордухович В.В. Многоклеточная мейофауна и особенности нематоценов северо-западного континентального склона Японского моря	70
Худякова Е.А., Сударикова С.В. Валидация метода FLASH-PCR для идентификации нематод <i>Globodera rostochiensis</i> (Woll.) Behrens	73
Хусаинов Р.В. Фауна и экология нематод-ксилобионтов ивы ломкой (<i>Salix fragilis</i>) на территории Центрально-Европейской части России	75
Чижов В.Н., Буторина Н.Н., Перевертин К.А. Влияние комплекса корневых паразитических нематод на продуктивность (<i>Festuca pratensis</i> Huds.) и (<i>Phleum pratense</i> L.) в Центральном районе РФ	77
Шошин А.В., Шошина Е.А. Морфология супплементарных органов нематод семейства Tobrilidae	79
Шошин А.В., Шошина Е.А. Морфология и эволюция губной области нематод семейства Tobrilidae	81
Щуковская А.Г., Ткаченко О.Б., Шестепёров А.А. Размножение микогельминтов <i>Aphelenchus avenae</i>, <i>Paraphelenchus tritici</i>, <i>Aphelenchoides saprophillus</i> на мицелии гриба <i>Microdochium nivale</i>, возбудителя розовой снежной плесени озимой пшеницы	83
Эшова Х.С., Саидова Ш.О. Влияние арахисовой галловой нематоды - <i>Meloidogyne arenaria</i> на структуру корней томата	85

СТРУКТУРА И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ПАРАЗИТАРНОЙ СИСТЕМЫ НЕМАТОДЫ *TOXASCARIS LEONINA* – ПАРАЗИТА ХИЩНЫХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Аникиева Л.В.

Учреждение Российской академии наук Институт биологии, Карельского НЦ РАН,
г. Петрозаводск, 185910, Россия; E-mail: anikieva@krc.karelia.ru

Toxascaris leonina - паразит хищных млекопитающих семейств собачьих и кошачьих. Необычайно широкий круг хозяев, обитающих во всех физико-географических зонах, простой цикл развития (прямой и с участием факультативных хозяев), высокая выживаемость преимагинальных фаз и их устойчивость к неблагоприятным факторам внешней среды определяют всесветное распространение нематоды (Мозговой, 1953; Sprent, 1959; Аникиева и др., 1984; Аникиева, Аниканова, 2007).

В естественной среде обитания паразитарная система *T. leonina* полигостальна. В круг хозяев входят все обследованные в паразитологическом отношении виды собачьих и кошачьих: лев, тигр, леопард, ирбис, кошки, серваль, пума, лисицы, песец, волк, собаки, шакал, гепард и др. Структура паразитарной системы *T. leonina* в разных климатических зонах определяется пространственной неоднородностью распределения хозяев. Разные виды хозяев могут играть сходную роль в существовании паразита и взаимно заменять друг друга.

Антропогенный фактор способствует формированию специфической структуры паразитарной системы *T. leonina*. Одомашнивание диких собачьих (лисицы, песца, енотовидной собаки) и разведение их на фермах приводит к появлению устойчивых ассоциаций паразитов, которые вызывают заболевания с атипичным течением, невыраженными клиническими признаками и даже гибель животных (Шустрова, 2003). В условиях domestikации паразитарная система *T. leonina* упрощается. Ее гостальная структура соответствует числу видов хозяев. Разновозрастные группировки хозяев играют неодинаковую роль в функционировании паразитарной системы *T. leonina*. Наиболее высоко заражен молодняк (до 95 %). Зараженность взрослых животных значительно ниже и не превышает 30 %. Распределение численности нематоды в популяции хозяина подчиняется негативно-биномиальному типу. При сходном индексе обилия нематод взрослые животные и молодняк (9.3 – 7.2 экз.) различаются уровнем агрегированности, что свидетельствует об их неодинаковой устойчивости к заражению.

Анализ особенностей жизненного цикла *T. leonina*, продолжительности развития яиц при разных температурах и их устойчивости к абиотическим факторам, а также путей заражения песцов *Alopex lagopus* в зоокультуре позволяет представить структуру паразитарной системы и процесс поддержания численности *T. leonina* следующим образом. Прямой цикл развития и продуцирование яиц в течение большей части года определяют постоянное заражение животных, что приводит к полициклическому развитию *T. leonina*. Численность гельминтов пополняется также за счет резервных латентных личинок. Многократное заражение зверей, в свою очередь, приводит к формированию сложной внутрипопуляционной структуры *T. leonina*. Отдельные фазы и стадии развития нематоды характеризуются морфофизиологическими особенностями и разной локализацией. Преимагинальная фаза (яйца и личинки I – II стадии) рассредоточена во внешней среде, латентные личинки III стадии локализуются в стеках кишечника хозяина, активные личинки V стадии, неполовозрелые и половозрелые нематоды – в его кишечнике. У молодняка различаются две наиболее четко выраженных генерации нематод.

В зимний период популяция нематоды малочисленна и представлена латентными личинками и половозрелыми нематодами в состоянии половой депрессии. В весенне-летний период численность популяции резко возрастает за счет яйцепродукции. Яйца и личинки I – II стадий обуславливают массовое расселение гельминтов во внешней среде и освоение ими новых особей хозяина. После заражения молодняка наблюдается усложнение паразито-хозяйинных отношений, связанных со становлением защитных механизмов у песцов и напряженностью внутривидовых отношений у нематод. Об этом свидетельствуют: неравномерность распределения нематод у молодых песцов, отход половозрелых гельминтов в период возможных реинвазий и неодновременность развития особей одной генерации.

Структура и функционирование паразитарной системы *T. leonina* зависят от интенсивности заражения хозяина и стадии развития гельминта. При низкой дозе заражения (10 яиц) в системе «нематода *T. leonina* - песец» сохраняется относительное равновесие. Более 90 % прижившихся личинок достигают зрелости. Взрослые гельминты имеют крупные размеры и высокую плодовитость. У хозяина повышаются показатели естественной защиты организма, активность обменных процессов близка к норме. Повышение дозы заражения (100 яиц) в большей степени отражается на состоянии паразита. За счет угнетения паразита сохраняется гомеостаз хозяина. Высокая доза (1 тыс. яиц) вызывает обострение внутривидовых и межвидовых отношений и сопровождается выраженными изменениями в показателях и хозяина и паразита. Более резкие отклонения (снижение приживаемости, изменение возрастной и половой структуры, снижение размеров и плодовитости самок) характерны для паразита. Особенности состояния гельминта приводят и к более глубоким нарушениям обменных процессов в организме песцов. Наиболее выраженное воздействие оказывают личинки паразита, в период жизнедеятельности которых даже при небольшой дозе заражения отмечены изменения активности холинэстеразы и щелочной фосфатазы. При высокой дозе заражения большое количество личинок усиливает поражающий эффект, нарушается нормальный баланс метаболических процессов, что отрицательно сказывается на продуктивных качествах зверей. Изменение приживаемости и морфобиологических показателей *T. leonina* при разных дозах заражения хозяина позволяет высказать суждение о сравнительно низком пороговом уровне включения регуляторных механизмов численности гельминта.

ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЙ ХИТОЗАНА С САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ НА ЗАРАЖЕНИЕ ТОМАТОВ *MELOIDOGYNE INCOGNITA*

Байчева О.¹, Удалова Ж.В.², Зиновьева С.В.², Герасимова Н. Г.³, Дамянова А.¹

¹ Институт ядерных исследований и ядерной энергии БАН, София, Болгария;
E-mail: andam@inrne.bas.bg

² Центр паразитологии ИПЭЭ РАН, Ленинский пр. 33, Москва, 119071, Россия;
E-mail: udalova.zh@rambler.ru

³ Институт биохимии им.А.Н.Баха РАН, Ленинский пр. 33, Москва, 119071, Россия;

Галловая нематода, широко распространенный патоген, способный паразитировать на значительном круге растений-хозяев, включая основные экономически значимые овощные и декоративные культуры. Она отличается высокой плодовитостью, способностью размножаться партеногенетически и длительное время сохраняться в почве; и, как правило, данная нематода лучше своего хозяина приспособлена к неблагоприятным воздействиям. Одним из направлений в защите растений от патогенов является индуцирование устойчивости с помощью элиситоров и сигнальных молекул. Индуцирование устойчивости

может происходить как локально, например, в месте нанесения элиситора (развивается реакция сверхчувствительности), так и системно, т.е. формируется сигнал, который передаётся в другие части растений, где индуцируются защитные реакции. Характерной особенностью системной индуцированной устойчивости (СИУ) является эффективность против широкого круга патогенов и продолжительность действия. Салициловая кислота (СК), входящая в сигнальную систему растений, относится к индукторам СИУ. В настоящее время имеется много данных, показывающих, что СК играет центральную роль в защите растений от биотрофных патогенов. СК активно задействована в создании иммунного статуса растения. Она выступает в роли медиатора, воспринимающего, умножающего и передающего информацию из клетки, атакуемой патогеном, на ее генетический аппарат, где происходит экспрессия защитных генов. Содержание СК в тканях растений при действии на них патогенов или элиситоров возрастает в десятки раз. Этот процесс называется «салицилатным взрывом». Накопление СК в растительных тканях начинается только в ответ на инфицирование и не связано с поранением.

Элиситор хитозан вызывает в растениях как локальную, так и системную устойчивость. Ранее нами было установлено, что хитозан повышал содержание свободной формы СК, являющейся важным медиатором сигнальных систем в тканях томатов, инфицированных галловой нематодой. Добавление СК к хитозану усиливало его способность стимулировать защиту растений в отношении исследованных патогенов. Сравнительный анализ биологической активности в системе картофель-фитофтора ряда производных хитин-хитозанового олигомера, показал, что наиболее активным был N-(2-гидрокси-3-метоксибензил)-N-пиридоксхитозан, содержащий в своей цепи фрагменты СК. Данное соединение стимулировало раневую репарацию тканей картофеля и повышало устойчивость к фитофторозу (1, 2).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Лабораторные исследования действия низкомолекулярного хитозана (5 кДа), N-2-гидрокси-3-метоксибензил)-N-пиридоксхитозан и СК проводили на патологической системе томаты - галловая нематода (*Meloidogyne incognita*). Соединения хитозана любезно предоставлены сотрудниками Центра «Биоинженерии» РАН Варламовым В.П. и Левовым А.Н. Исследовали устойчивый (F1 Шаганэ) и восприимчивый (F1 Гамаюн) к галловой нематоды гибриды томатов. Обработку проводили замачиванием семян с последующим опрыскиванием вегетирующих растений растворами препаратов. Вегетирующие растения были инвазированы *M. incognita* (3 тыс. личинок/растение). Было заложено два опыта. В первом исследовали действие хитозана, СК и хитозана+СК, во втором – хитозана и модифицированного хитозана (N-(2-гидрокси-3-метоксибензил)-N-пиридоксхитозан). Контроль – вода. В процессе вегетации оценивали рострегулирующую активность соединений. Через 3 нед. после заражения опыт был снят для оценки на зараженность корней, наличие самцов и самок нематод, а также на плодовитость самок. Здоровые растения томата Гамаюн, обработанные модифицированным хитозаном, были исследованы на содержание металлов-микроэлементов (Zn, Mn, Fe, Cu, Mg). Анализ проводили методом атомной абсорбционной спектроскопии. (PERKIN ELMER 3030 – France).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Обработка томатов хитозаном и хитозаном совместно с СК существенно подавляла инвазию восприимчивых растений томатов галловой нематодой и влияла на морфо-физиологическое состояние паразита (табл. 1). Растения, обработанные хитозаном, оказывались более устойчивыми к поражению нематодами и заметно лучше развивались по сравнению с контрольными. Что касается нематод, то было обнаружено достоверное уменьшение размера самок и снижение плодовитости. Обработка растений хитозаном+СК в большей степени снижала поражаемость растений нематодой, плодовитость которой также

оказалась самой низкой, число яиц в оотеках было в 1,5 раза меньше по сравнению с контрольным вариантом. Интересно, что СК стимулировала развитие растений, однако количество галлов на корнях и число яиц в оотеках самок было существенно выше контрольного варианта. Исследования, проводимые нами ранее в данной патологической системе по определению оптимальной концентрации СК, не дали однозначных результатов в отношении повышения устойчивости к нематод. С другой стороны, добавление СК к элиситору хитозану позволило повысить эффективность от обработки по сравнению с одним хитозаном. Полученные данные дали основания предположить, что в случае обработки семян и растений СК совместно с элиситором экспрессия генов, контролирующей устойчивость растений, меняется сильнее.

Таблица 1. Влияние обработки томатов хитозаном и СК на развитие и зараженность растений и морфо-физиологические и популяционные характеристики галловой нематоды.

Вариант обработки	Вес стебля и листьев, г.	Длина стебля, см	Балл заражения*	Число галлов/растение	Ср. число яиц/оотека
Контроль (здоровый)	59,3	62,3	-	-	-
Контроль (зараженный)	45,3	58,8	3,0	352	108
СК	141,0	147,0	4,0	413 (117%)	189 (175%)
Хитозан	86,0	124,3	2,0	193 (55%)	99 (91%)
Хитозан +СК	103,3	128,5	1,5	144 (41%)	68 (63%)

* по 5-балльной шкале (Удалова, 1993)

Сравнительные исследования применения хитозана и модифицированного фрагментами СК хитозана показало, что соединения хитозана не угнетали развития растений, а в некоторых вариантах стимулировали их рост. Ростстимулирующая активность зависела от сортовой принадлежности томатов и особенно ярко проявилась на томатах восприимчивого гибрида. Следует отметить, что хитозан в большей степени влиял на рост и развитие растений, чем его модифицированный вариант. Как видно из таблицы 2 зараженные растения, обработанные хитозаном и модифицированным хитозаном, хорошо развивались. На корнях были единичные галлы, тогда как в контроле отмечалось много сингаллов (слившихся галлов), что существенно сказывается на состоянии растений. Средние размеры, образовавшихся на корнях галлов при обработке хитозаном и модифицированным хитозаном в 1,9 и 2,1 раза мельче контрольных. Балл заражения томатов, обработанных модифицированным хитозаном, был значительно ниже в сравнении с контрольными растениями. Обработка томатов препаратами хитозана значительно отразилась на развитии нематод. Отмечено наличие большого числа неполовозрелых самок, соответственно, их размеры и среднее число яиц в оотке были существенно ниже контрольных.

Таблица 2. Влияние обработки томатов хитозаном и модифицированным хитозаном на вес и зараженность растений и морфо-физиологические и популяционные характеристики галловой нематоды.

Вариант	Вес растения, г	Балл заражения	Ср. размер галла, мм ²	Ср. размер самки, мм ²	Ср. число яиц/оотека
Контроль	14,2	3,0	9,913	0,368	237
Хитозан	12,0	2,25	5,114 52%	0,295 80%	162 68%
Модифицированный хитозан	21,2	1,25	4,720 47%	0,315 91%	134,5 47%

Заражение растений галловой нематодой приводит к нарушению биохимических и физиологических процессов в растениях. Показано, что хитозан способствует нормализации гомеостаза растений нарушенного при различных стрессовых воздействиях. Об изменениях происходящих в растениях при стрессах биотической и абиотической природы можно судить по содержанию в тканях и органах растений микроэлементов, например различных металлов. Обладая высокой биологической активностью, они представлены в растениях в очень низких дозах. Своё влияние на различные биологические процессы они осуществляют посредством взаимодействия с важнейшими регуляторными веществами: гормонами и витаминами. И их участие в формировании иммунитета значительно.

Таблица 3. Влияние модифицированного хитозана на содержание металлов-микроэлементов в тканях томатов.

Элемент	Орган растения	Контроль (вода)	Модифицированный хитозан
Zn	Листья	40,4	63,2
	Корни	55,6	164,1
Mn	Листья	56,0	51,4
	Корни	32,6	65,0
Fe	Листья	124,8	143,2
	Корни	103,8	198,6
Cu	Листья	7,8	9,0
	Корни	4,2	6,4

Как видно из представленной таблицы 3, обработка томатов модифицированным фрагментами СК хитозаном позволяет увеличить содержание исследованных металлов-микроэлементов как в надземных, так и в подземных органах растений, но в корнях увеличение содержания этих элементов при обработке происходит значительно, чем в листьях. Что может быть существенно, поскольку галловые нематоды локализуются в корневой системе.

Очевидно, что обработка растений исследованными препаратами хитозана тормозит развитие нематод. Сравнивая действие хитозана с его производным, можно отметить высокую элиситорную активность совместного внесения хитозана с СК и модифицированного хитозана и по некоторым показателям она была значительно выше одного хитозана. Так один из основных показателей зараженности - степень галлообразования при обработке модифицированным хитозаном составила в среднем около 13%, при обработке хитозаном - 37%, в контроле около 70 %. Это позволяет говорить о том, что модифицирование хитозана СК может усилить защитное действие в отношении галловой нематоды. Предполагается, что в олигомерах СК-модифицированная часть определяет свои сигнальные потоки, отличные от индуцируемых хитозановой частью (3). Было показано, что введение различных фрагментов салициловой кислоты в хитозан неоднозначно влияет на защитные и репарационные свойства растений (2). На основании имеющихся данных можно предположить, что изменение химической, а также пространственной структуры олигомера введением в цепь двух фрагментов 2-гидрокси-3-метоксибензильного и пиридоксалевого, способствует запуску процессов, связанных с экспрессией защитных генов.

ЛИТЕРАТУРА

Львова А.Н. Получение низкомолекулярного хитозана и его производных, обладающих защитными и репарационными свойствами Автореф. Дисс.. Щелково.2010., 26с.

Васюкова Н.И., Озерецковская О.Л., Чаленко Г.И., Герасимова Н.Г., Львова А.А., Ильина А.В., Варламов В.П., Тарчевский И.А. Иммуномодулирующая активность производных хитозана с салициловой кислотой и её фрагментами. // Прикладная биохимия и микробиология, 2010, Т. 46, № 3, С. 379-384

Яковлева В.Г., Тарчевский И.А., Левов А.Н.// Материалы 9 Междунар. конф. «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана» М.; ВНИРО, 2008. С.261-263

МЕЙОБЕНТОС ГЛУБОКОВОДНОГО РАЙОНА ЗАЛИВА ПЕТРА ВЕЛИКОГО И АНАЛИЗ СООБЩЕСТВ СВОБОДНОЖИВУЩИХ НЕМАТОД

Белогурова Л.С.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки, Институт биологии моря
им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, г. Владивосток, Россия;

Впервые изучены глубоководные сообщества мейобентоса залива Петра Великого (Японское море). Пробы собраны в августе - сентябре 2010 года (14 станций) в батиалях (Шунтов, 2001) на глубинах 270, 400, 600 и 800 м. В местах взятия проб все донные осадки содержат алеврито-пелитовые фракции и много мертвых створок диатомовых водорослей *Actinoptychus senarius*, *Coccinodiscus oculusiridis* и створок радиолярий

Мейобентос района исследования представлен 7 таксономическими группами. Эвмейобентос включал в себя такие группы, как Foraminifera, Acarina, Nematoda. Псевдомейобентос был представлен неполовозрелыми Oligochaeta, Polychaeta, Ophiuroidea, Tanaidacea. Нематоды были встречены на всех глубинах. Доля нематод по станциям изменялась от 11.6 до 91.7%, составив в среднем 21% от суммарной плотности поселения мейобентоса. Самая высокая численность нематод (30744 экз./м²) отмечена на заиленных грунтах с огромным количеством мертвых створок диатомовых водорослей *Actinophychus senarius* на глубине 400 м. Самая низкая плотность поселения нематод (6048 экз./м²) зарегистрирована в сильно эаиленном грунте с большим количеством мертвых створок диатомовых водорослей *Coccinodiscus oculusiridis* на глубине 800 м.

В данном районе идентифицировано 19 видов свободноживущих морских нематод, относящихся к 18 родам, 11 семействам и 4 отрядам. С глубиной меняется таксономический состав фауны. Так, на глубине 270 м комплекс видов состоит из *Metaparoncholaimus* sp. (2B) и *Dorylaimopsis peculiaris* Platonova, 1971 (2A). Наибольшее число видов (12) обнаружено на глубине 400 м: *Onchium minutum* Kito, 1981 (1A), *Adoncholaimus* sp.(2B), *Curvolaimus originalis* Belogurov, 1981 (2B), *Oxystomina elegans* Platonova, 1971 (1A), *Tychnodora rectispiculata* Platonova, 1971 (1A), *Axonolaimus seticaudatus* Platonova, 1971 (2A), *Dorylaimopsis peculiaris* Platonova, 1971 (2A), *Setosabatieria coomansi* Huang and Zhang, 2006 (2A), *Sabatieria pulchra* (Schneider, 1906) Riemann, 1970 (1B), *Megadesmolaimus rhodinus* Chesunov et Yuchin, 1991 (1B), *Terschellingai* sp (1B) и *Daptonema procerum* Gerlach, 1951 (1B). Наименьшее число видов (2) отмечено на глубине 600 м: *Dorylaimopsis peculiaris* Platonova, 1971 (2A) и *Terschellingia glabricutis* Platonova, 1971 (1B). На глубине 800 м было найдено 5 видов нематод: *Dorylaimopsis peculiaris* Platonova, 1971 (2A), *Rhabdodemania orientalis* Platonova, 1974 (2B), *Halichoanolaimus* sp.(2A), *Halichoanolaimus sonorus* Belogurov et Fadeeva, 1980 (2A), *Sphaerolaimus gracilis* De Man, 1876 (2B), из которых 4 последних вида не были отмечены на других глубинах.

Анализ видового состава нематод батиаля зал. Петра Великого показал, что общими для четырех станций оказался 1 вид - *Dorylaimopsis peculiaris*. Этот вид широко распространен на песчаных илах залива от 3 м до максимальных глубин, как показали наши исследования.

Для оценки трофической структуры сообщества морских нематод использовали классификацию Визера, основанную на строении и функционировании ротовой полости животных (Wieser, 1953). Выделены четыре трофические группы: 1А – избирательные детритофаги (потребляют бактерий и мелкие частицы детрита из грунта); 1В – неизбирательные детритофаги (потребляют детритные комплексы); 2А – “соскабливатели” (питаются бактериями и микроводорослями, которые образуют пленку); 2В – хищники (ведут хищнический образ жизни, заглатывая мелких животных, в том числе и нематод).

В районе исследования представлены все трофические группировки: избирающие детритофаги (1А, 16%), неизбирающие детритофаги (1В, 26%), соскабливатели (2А, 26%), хищники (2В, 32%) (Рисунок 1).

Как показали проведенные исследования, данные по распределению трофических групп нематод в батии залива Петра Великого совпадают с таковыми для различных районов Японского моря и других морей (Гальцова, 1991). В песчаных осадках, как правило, преобладают “соскабливатели” (2А) и хищники (2В), в илистых осадках – детритоядные нематоды (Фадеева, 1991; Szulwinski et al., 2001).

Таким образом, в зал. Петра Великого Японского моря впервые изучены глубоководные сообщества мейобентоса и нематод. Выявлено изменение таксономического состава фауны нематод с глубиной. Нематоды в донных осадках распределены неравномерно. Всего найдено 19 видов нематод, среди которых доминирует *Dorylaimopsis peculiaris*. Наибольшее число видов (12) обнаружено на глубине 400 м, а наименьшее (2) – на глубинах 270 и 600 м. Преобладающей трофической группировкой нематод в исследуемом районе являются «хищники».

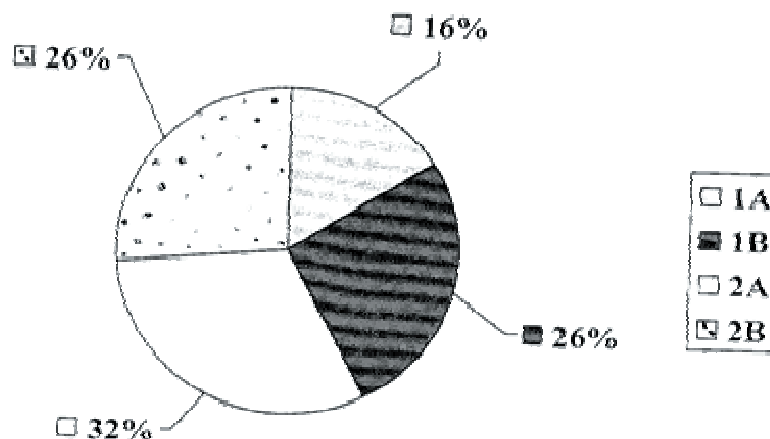


Рисунок 1. Соотношение трофических групп нематод (%) в батии залива Петра Великого. 1А – избирательные детритофаги, 1В – неизбирательные детритофаги, 2А – соскабливатели, 2В – хищники.

ЛИТЕРАТУРА

- Гальцова В.В. Мейобентос в морских экосистемах на примере свободноживущих нематод. Л.:ЗИН АН СССР, 1991. 240 с.
- Фадеева Н.П. Распределение свободноживущих нематод в районе бухты Киевка // Биологические исследования бентоса и обрастания в Японском море. – Владивосток: ДВО АН СССР. - 1991. – С. 66-84.

- Шунтов В.П. Биология дальневосточных морей России. Том 1. – Владивосток: Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр (ТИНРО-центр), 2001. 580 с.
- Szulwinski M., Radziejewska T., Drgas A. Trophic structure of free-living nematode assemblages along a southern Baltic transect // Folia Univ. Agr. Stetin. – 2001. – Vol. 218. Pisc. 28. – P. 141-150.
- Wieser W. Die Beziehung zwischen Mundholengestalt, Ernährungswiese und Vorkommen bei freilebenden marinen Nematoden // Ark. Zool. – 1953. – Bd. 4, H. 5. – S. 439-484.

**НЕМАТОДНАЯ ИНВАЗИЯ КАК ФАКТОР ВЛИЯНИЯ НА ЧИСЛЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИЙ БЛОХИ
COPTOSYLLA LAMELLIFER ROSTRATA IOFF ET TIFL., 1934 (SYRPHONAPTERA, COPTOSYLLIDAE),
ПАЗАРИТУЮЩЕЙ НА ПЕСЧАНКАХ В ЦЕНТРАЛЬНЫХ И ЮЖНЫХ КЫЗЫЛКУМАХ**

Блюммер А.Г.¹, Ривкус Ю.З.²

¹ *Всероссийский центр карантина растений, ул. Пограничная, 32, пос. Быково-2, Раменский район, Московская область, 140150, Россия; E-mail: agbugs@mail.ru*

В 1983-1997 гг. в центральной (40°-42° с.ш.) и южной (39°-40° с.ш.) широтных климатических подзонах пустыни Кызылкум нами изучались блохи песчанок. Среди этих блох в холодное время года субдоминантом, а в отдельные месяцы и годы – доминантом, является *Coptosylla lamellifer rostrata*. Истинным хозяином паразита в Кызылкумах является большая песчанка *Rhombomys opimus*, второстепенными хозяевами – песчанки рода *Meriones*: полуденная *M. meridianus*, краснохвостая *M. erythrorurus* и гребенщикова *M. tamariscinus*. Блоха была относительно слабо изучена, несмотря на то, что играла определённую роль как переносчик чумного микроба в Кызылкумском природном очаге чумы.

Сбор материала проводился преимущественно в осенние месяцы, в период работы авторов в составе эпидемиологических отрядов и зоопаразитологических групп Узбекской противочумной станции, проводившей эпизоотологическое обследование территории Кызылкумского природного очага чумы.

На каждом пункте сбора осматривали по 10-20 нор большой, 20-30 нор полуденной и краснохвостой песчанок, а также все встреченные норы других грызунов. Осматривали норы хищников. В сентябре и октябре вылов блох производился преимущественно в верхних отделах нор большой песчанки и песчанок *Meriones*. Позднее, когда устанавливалась холодная погода, сбор проводился, главным образом, в кормовых камерах раскопанных семейных нор («колоний») большой песчанки. Значительное число блох удавалось выбрать непосредственно из запасов растительного корма и подстилки этих камер. Пять нор большой песчанки были раскопаны до зимовочных гнезд.

Непосредственно авторами было собрано и изучено в лабораториях противочумной службы около 25 тысяч блох *C.l.rostrata*.

Материал по распространению и ландшафтной приуроченности *C.l.rostrata* был собран в 600-х пунктах. Блохи отлавливались, главным образом в норах песчанок, в их поселениях в различных ландшафтах: разных типов песков – мелко- и крупно-бугристых, грядовых, грядово-бугристых, ячеистых, супесчаных подгорных равнинах останцовых хребтов (Букантау, Тамдытау, Алтынтау и др.); территориях, подвергшихся антропогенной трансформации. Несколько тысяч блох были вычесаны из шерсти отловленных песчанок.

В 1993-1997 гг., в октябре и ноябре а, в отдельные годы - и в зимние месяцы (по февраль включительно) проводили вскрытие самок изучаемых блох. За указанный период было вскрыто в общей сложности более 1400 самок *C.l.rostrata*, добытых на двухстах пунктах сбора.

По завершении полевых и лабораторных исследований, были проанализированы архивные материалы многих эпидемиологических отрядов и зоопаразитологических групп Узбекской противочумной станции, которые проводили обследование центральных и южных районов Кызылкумов в 1977-1996 гг.

В результате комплексных исследований была создана база данных, содержащая сведения о более, чем 70 тысячах *Coptosylla lamellifer rostrata*, собранных в 4-х тысяч пунктов в центральной и южной климатических подзонах пустыни.

Движение численности *C.l.rostrata* явственно синхронизировано с таковым её основного хозяина - большой песчанки. В обоих широтных подзонах наблюдалось по два пика численности. В первом интервал между максимальными подъемами численности составил 3 года, во втором – 6 лет. Данный факт свидетельствует о большей стабильности популяций паразита в южной части пустыни.

Ежегодно значительная часть самок были инвазированы нематодами. Часть зараженных экземпляров устанавливались без вскрытия, по ряду морфологических изменений разных отделов тела блохи, а также парных семяприемников. В последнем случае отклонения от их нормальных формы и размеров были видны через покровы брюшка в световой микроскоп.

В Центральном Кызылкумах зараженные особи встречались с начала октября до конца ноября. Их количество нарастало к 3-й декаде октября – 1-й декаде ноября. Максимальная зараженность наблюдалась в 1-й декаде ноября – 32,2 % (Блюммер, 2011).

В Южных Кызылкумах первые самки с нематодами отмечались в 3-й декаде октября. Экстенсивность инвазии достигала пика к 3-й декаде ноября и не превышала 20%. По данным Ю.А.Морозова (1974), в пустыне Муюнкум пик зараженности самок *Coptosylla lamellifer* приходился на третью декаду октября – 57,3% зараженных особей.

В годы регистрации зараженности самок гельминтами плотность популяции *C.l.rostrata* в норах большой песчанки была ниже средних многолетних показателей для тех пунктов сбора, которые обследовались многократно, а инвазия выявлялась не ежегодно. При раскопках семейных нор («колоний») в центральных районах пустыни среднее количество экземпляров изучаемого подвида на одну нору было ниже в 3-5 раз, в южных – 1,5-2,5 раза, чем в поселениях песчанок, где эта блоха были свободна от нематод.

Вскрытие самок *C.l.rostrata* в 1993-1997 гг., позволило обнаружить инвазированных особей на 70-и пунктах из более, чем двухсот обследованных. С учетом данных за весь период работы авторов и привлечения архивных сведений, нематодная инвазия установлена для 1200 пунктов из 4-х тысяч.

Нами обращено внимание на феномен повторяемости пунктов сбора с выявленной инвазией. В отдельных районах на таких пунктах встречались самки с гельминтами по 3-5 лет подряд. Наиболее часто подобное явление наблюдалось в мелко-бугристых песках.

В тоже время, во многих географических районах пустыни, гельминты не обнаруживались не только в те или иные годы, но и в течение всего периода наблюдений. Приведённые факты являются свидетельством очагового характера распространения тиленхид в Кызылкумах. Первым о подобной специфике тиленхидной инвазии *Coptosylla lamellifer* высказался И.А. Рубцов (1981), анализируя материалы 60-х годов прошлого века Ю.А. Морозова, собранные в пустыне Муюнкум.

По нашему мнению, высокая экстенсивность заражения гельминтами *C.l.rostrata* может объясняться такими особенностями её биологии, как:

1. высокая численность имаго в норах большой песчанки в осенние месяцы (октябрь);
2. пролонгированное, по сравнению с другими блохами песчанок, преимагинальное развитие, которое у отдельных особей длится до 2-х лет (Соколова, Попова, 1969);
3. концентрация личинок, куколок и имаго в кормовых и гнездовых камерах большой

песчанки;

4. продолжительное существование стадии «имаго в коконе» - от 3-х до 14-и месяцев и более;

5. уникальная способность к спариванию до первого кровососания;

6. политопность, т.е. способность к существованию в разнообразных ландшафтах и биотопах;

7. способность, в отсутствие песчанок, насасываться крови любых встреченных животных, включая хищников, мозолоногих, копытных, что объясняется наличием крупного хоботка, превосходящего по длине хоботок любого другого вида комплекса блох песчанок в 2-3 раза.

Логическим завершением анализа упомянутой выше базы данных явилось построение карты ареала изучаемого подвида с помощью растрового метода, или метода формальных квадратов. Большая фактологическая основа обеспечила возможность детального анализа внутриареальных особенностей географического распространения *C.l.rostrata*, особенностей локализации очагов паразитических нематод, др. Материалы по распространению были опубликованы (Блюммер, 2002; 2007).

Суть примененной разновидности метода квадратов заключалась в следующем. Картооснова с прямоугольной градусной сеткой была разбита на квадраты со стороной 10 км. Если в пределах квадрата обнаруживали изучаемый подвида, то, независимо от точного места сбора, в его середину ставили условный знак – черную точку. Неисследованные квадраты отмечали незатушёванным кружком. Прочие квадраты оставляли без обозначений. В итоге получили прерывистую сеть пересекающихся вертикальных и горизонтальных рядов точек. Пустые квадраты свидетельствовали о том, что сборы блох осуществлялись, но интересующий нас таксон не был обнаружен.

На карте выявились пустые зоны площадью от одной до 6 тыс.км². Они представляли собой совокупность квадратов без условных значков, что свидетельствовало об отсутствии паразита в сборах. Сопоставление «точечного» ареала блохи с таковым большой песчанки Ю.А. Дубровского с соавт. (1980), а также растровыми картами ареалов полуденной и краснохвостой песчанок, позволяет высказать предположение о том, что пустые зоны на карте могут свидетельствовать о вымирании *C.l.rostrata* вследствие тилехидной инвазии. Периодически повторяющиеся и длящиеся по несколько лет депрессии численности большой песчанки не могут являться фатальными для мезопопуляций изучаемой блохи, так как в годы депрессий паразит способен успешно существовать в поселениях не только краснохвостых и полуденных песчанок, но и других грызунов, например, тонкопалого суслика.

Можно предположить, что в отдельные годы, в границах отдельных районов Кызылкумов, экстенсивность заражения самок *C.l.rostrata* нематодами может достигать верхнего порогового уровня, при котором происходит деграция мезопопуляции блохи и ее элиминация из паразитоценоза большой песчанки. Ответить на вопрос о величине этого порога в настоящее время не представляется возможным.

ЛИТЕРАТУРА

- Блюммер А.Г. 2002. Блохи *Coptosylla* J.& R, 1908 (Siphonaptera, Coptosyllidae) в пустыне Кызылкум: особенности распространения и паразито-хозяйинные связи // Материалы конф. «Эпидемиологическая безопасность на Кавказе. Итоги и перспективы». Ставрополь, 15-16 октября 2002. С. 29-31.
- Блюммер А.Г. 2007. Некоторые итоги изучения блох *Coptosylla* J. et R., 1908 (Siphonaptera, Coptosyllidae) в пустыне Кызылкум // 13-й съезд Русского энтомологического общества. Тезисы докладов. Краснодар, 9-15 сентября 2007. С. 31-33.
- Блюммер А.Г. 2011. Особенности нематодной инвазии блох *Coptosylla* J.et R., 1908 (Siphonaptera, Coptosyllidae), паразитирующих на песчанках в пустыне Кызылкум // Материалы 9-го симпозиума Российского общества нематологов «Нематоды

естественных и трансформированных экосистем». Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. С. 45-47.

- Блюммер А.Г., Пак М. И., Саттаров Ф.Р. 1995. Блоха *Coptosylla lamellifer rostrata* Ioff et Tifl. в урочище Карнабчуль: распространение, связь с хозяевами, численность // Материалы конф. «Экологические проблемы приамударьинского региона Средней Азии». Бухара. С. 53-56.
- Дубровский Ю.А., Бурделов А.С., Жерновов И.В. и др. 1980. Составление карты ареала большой песчанки в Средней Азии и Казахстане методом градусных полей // Современные проблемы зоогеографии. М.: Наука. С. 167-180.
- Морозов Ю.А. 1974. Влияние зараженности нематодами на размножение блох песчанок в Муюнкумах // Материалы 8-й научн. конф. противочумн. учрежд. Сред. Азии и Казахстана. Алма-Ата. С. 338-340.
- Соколова А.А., Попова А.С. 1967. К биологии блохи *Coptosylla lamellifer*. Сообщение 1 // Материалы 5-й научн. конф. противочумн. учрежд. Сред. Азии и Казахстана. Алма-Ата. С. 186-187.
- Соколова А.А., Попова А.С. 1969. К биологии блохи *Coptosylla lamellifer*. Сообщение 2 // Материалы 6-й научн. конф. противочумн. учрежд. Сред. Азии и Казахстана. Алма-Ата. Вып. 2. С. 90-92.
- Рубцов И.А. 1981. Паразиты и враги блох // Л.: Наука. 101 с.

ФИТОПАРАЗИТИЧЕСКАЯ ГАЛЛОВАЯ НЕМАТОДА *MELOIDOGYNE HARPA* В РОССИИ

Бутова К.Б.^{1,2}, Приданников М.В.^{2,3}

¹ *Всероссийский центр карантина растений – ул. Пограничная, 32, п. Быково, Московская обл., 140150, Россия; E-mail: butova.ksenia@mail.ru*

² *ВНИИ фитопатологии Россельхозакадемии – ул. Институт, р.п. Большие Вязёмы, Московская обл., 143050, Россия;*

³ *Центр паразитологии Института проблем экологии эволюции им. А. Н. Северцова РАН – Ленинский пр-т, 33, Москва, 119071, Россия;*

В настоящее время известно более 80 видов галловых нематод рода *Meloidogyne*. В основном они распространены в странах с тропическим и субтропическим климатом. Значительно реже галловые нематоды встречаются в условиях полупустынь и в умеренных широтах. Для мирового сельского хозяйства угрозу представляют 10 видов; из них 4 являются основными и распространены по всему миру (Karrsen, 2002).

На территории России в естественных условиях зарегистрировано всего два вида: березовая галловая нематода *Meloidogyne ardenensis* и северная галловая нематода *Meloidogyne harpa*. Первая известна только как паразит берёзы бородавчатой (Чижов, Турнкина, 1986). Вторая трофически связана со многими растениями из разных семейств, в том числе и сельскохозяйственными культурами.

Северная галловая нематода имеет очень широкий спектр растений-хозяев, включающий практически все виды бобовых, многие виды астровых, маревых, зонтичных, лилейных, крестоцветных, пасленовых, гречишных, розоцветных и ряда других семейств, которые в местах их естественного произрастания являются природными резерватами этой нематоды (Буторина, Зиновьева, Кулинич и др., 2006).

Как и другие виды галловых нематод, *M. harpa* является эндопаразитом корневой системы. Цикл развития протекает в тканях корня, а на его поверхности формируются яйцевые мешки. Количество яиц в яйцевом мешке варьирует от 25 до 1337 (в среднем 400-600 яиц). При оптимальных температурах 18-25°C появление первых яиц происходит через

20-30 дней после заражения, а новых инвазионных личинок второго поколения – через 39-68 дней. В центральном и северо-западном районах развивается одно-два поколения, а в южных два-три за вегетационный период. В месте питания самки образуется нарост из ткани (галл), иногда несколько самок образуют крупный (до одного сантиметра в диаметре) сингалл (Буторина, Зиновьева, Кулинич и др., 2006).

Зимует *M. hapla* в почве и на корнях пораженных растений. В стадии яйца выдерживает отрицательные температуры до – 11°C в течение 90 дней. Нематода очень вредоносна для молодых проростков моркови: если инвазионная личинка поражает проросток, то в дальнейшем формируется короткий (2-4 см) корнеплод. В отсутствие растения-хозяина инвазионные личинки сохраняют в почве жизнеспособность до двух лет (Зиновьева, Чижов, Приданников, 2012).

Очень характерной реакцией растений на поражение северной галловой нематодой является образование множества мелких боковых корешков. Рост и развитие зараженных растений задерживается, вес клубней и корнеплодов сильно снижается, заметно ухудшаются их товарные качества. При сильном поражении клубней картофеля в местах локализации нематоды на их поверхности образуются небольшие возвышенные участки, и ткани клубня в этих местах постепенно подвергаются некрозу (Кирьянова, Краль, 1971).

В связи с тем, что северная нематода не является карантинной, отсутствует контроль за распространением данного вида на территории РФ. В последние годы всё чаще отмечаются случаи сильного поражения ею в Московской и Псковской областях. Частники, дачники, владельцы малых личных подсобных хозяйств, в большинстве своём, не компетентны в вопросах определения и идентификации того или иного заболевания, и зачастую, проводят обмен продукцией на посадку не зная, что она заражена. Такой обмен может производиться между разными по удалённости регионами с различными климатическими и почвенными условиями, благоприятными для развития патогена. Таким образом распространяется и северная галловая нематода.

Meloidogyne hapla является важным объектом для изучения с точки зрения защиты растений, так как нет зарегистрированных нематодцидов для открытого грунта и зарегистрированных сортов овощных культур, устойчивых к галловой нематоды. Выведение или выявление которых, может послужить началом работы с устойчивостью культур к карантинным видам, таким как *Meloidogyne chitwoodi* и *Meloidogyne fallax*.

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ РОДСТВО ВОЛОСАТИКОВ И НЕМАТОД ПО РЕЗУЛЬТАТАМ АНАЛИЗА РИБСОМАЛЬНЫХ БЕЛКОВ (RPL-RPS)

Ефейкин Б.Д.,¹ Михайлов К.В.,² Алёшин В.В.,² Спиридонов С.Э.,¹ Панчин Ю.В.^{2,3}

¹ Центр паразитологии Института проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова
Российской Академии наук, Москва, Россия; E-mail: bocha19@yandex.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, НИИ ФХБ имени А.Н.
Белозерского, Москва, Россия; E-mail: aleshin@genebee.msu.su

³ Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской Академии наук,
Москва, Россия; E-mail: ypanchin@yahoo.com

Волосатики (Nematomorpha) – группа червообразных организмов, ведущих паразитический образ жизни на личиночной стадии. Взрослые волосатики выходят из тела зараженного хозяина в воду, не питаются и отыскивают партнера для копуляции активно двигаясь в водоеме. Из многочисленных отложенных яиц выходят микроскопические (до 100 мкм длиной) личинки, вооруженные хоботком с шипиками. Личинки проникают внутрь тела промежуточного или окончательного хозяина и начинают паразитическую фазу

жизненного цикла. В настоящий момент известно около 360 видов волосатиков. Большинство представителей относится к классу *Gordioida* – это пресноводные волосатики, паразиты членистоногих, остальные - это группа морских волосатиков - класс *Nectonematoida* - паразиты бентосных ракообразных.

До настоящего времени не существует единого мнения о филогенетических отношениях волосатиков с другими группами животных. В 1980 году В.В. Малахов создает новую группу – тип *Cephalorhyncha* (головохоботных червей), куда относит приапулид, киноринх и волосатиков, а в 1986 году туда же были добавлены и лорициферы. Основным морфологическим признаком для такого объединения стало наличие хоботка на какой-либо стадии жизненного цикла. Правомерность выделения этого типа не была, однако, принята всеми, и большее число сторонников получила концепция родства волосатиков с нематодами. Основанная на морфологических признаках, эта гипотеза родства волосатиков получила определенное подтверждение по результатам филогенетического анализа 18S rDNA. Филогенетические построения, основанные на анализе одного участка ДНК, не могут быть стабильными, поскольку достоверность получаемых топологий сильно зависит от состава сравниваемых групп животных, общего числа информативных признаков, скорости эволюции в отдельных группах. Возможным путем повышения достоверности молекулярно-филогенетического анализа положения волосатиков в системе Царства животных может стать полногеномное секвенирование с охватом многих генов.

Для получения полногеномных данных ДНК выделяли фенол-хлороформным методом из собранного в Адыгее волосатика *Gordionus alpestris* и проводили секвенирование на секвенаторе Illumina Hi-seq 2000. Полученные библиотеки очищали от адаптеров и чтений с недостаточным качеством прочтения и проводили сборку в ассемблере Velvet.

В таблице 1 приведены выходные данные сборки полученных последовательностей в программе Velvet. По результатам сборки двух чтений мы выяснили, что геном волосатика имеет длину около 270 Mb и двадцатикратное нуклеотидное покрытие, значение N50 равно 4050. На данном этапе мы решили провести анализ рибосомальных белков RPL-RPS. В этом случае, полученное нами покрытие генома и значение N50 являются оптимальными.

С помощью стандартного алгоритма *makedb* из пакета Standalone Blast последовательность контигов преобразовывали в базу данных. Далее, в этой базе с помощью алгоритма *tblastn* мы проводили поиск рибосомальных белков, используя в качестве query последовательности белков из генбанка. Затем, найденные в геноме *G. alpestris* последовательности добавляли с помощью программы MUSCLE к выравниваниям, содержащим последовательности этого же белка более чем трехсот организмов. Преимущество программы MUSCLE в данном случае объясняется тем, что она обладает функцией «профильное выравнивание», то есть при добавлении одной последовательности к выравниванию последовательности других организмов не изменяются.

При подготовке данных для филогенетического анализа из выравнивания были удалены неоднозначно выравненные позиции, и индивидуальные выравнивания генов рибосомальных белков были конкатенированы программой SCaFoS 1.24 в единое выравнивание длиной 10717 позиций. Реконструкция филогенетического дерева проводилась методом максимального правдоподобия, реализованного программой RAxML 7.2.6. Для расчета была использована модель LG с учетом разности скорости эволюции между сайтами и эмпирическими частотами аминокислот, выбранная программой ModelGenerator 0.85 в качестве наиболее подходящей модели молекулярной эволюции. Расчет поддержки узлов дерева осуществлялся программой RAxML на основе 100 бутстрэп реплик.

В результате, мы получили филогенетическое дерево, построенное по результатам анализа аминокислотных последовательностей рибосомальных белков RPL-RPS. Всего были использованы аминокислотные последовательности этих белков для 77 организмов, относящихся к различным типам и классам животных. На Рис. 1 представлен фрагмент полученного филогенетического дерева, содержащий лишь обсуждаемые группы и ближайших к ним родственных таксонов.

Таблица 1. Выходные данные программы Velvet.

	K59,cov_cutoff=5, min_pair_count=5
контиги, длиной>=100	345 742
Общая длина	272 841 633
N50	4050
N90	201
максимальная длина контига	64 799
Использованных чтений (из 138 134 236)	107 200 269

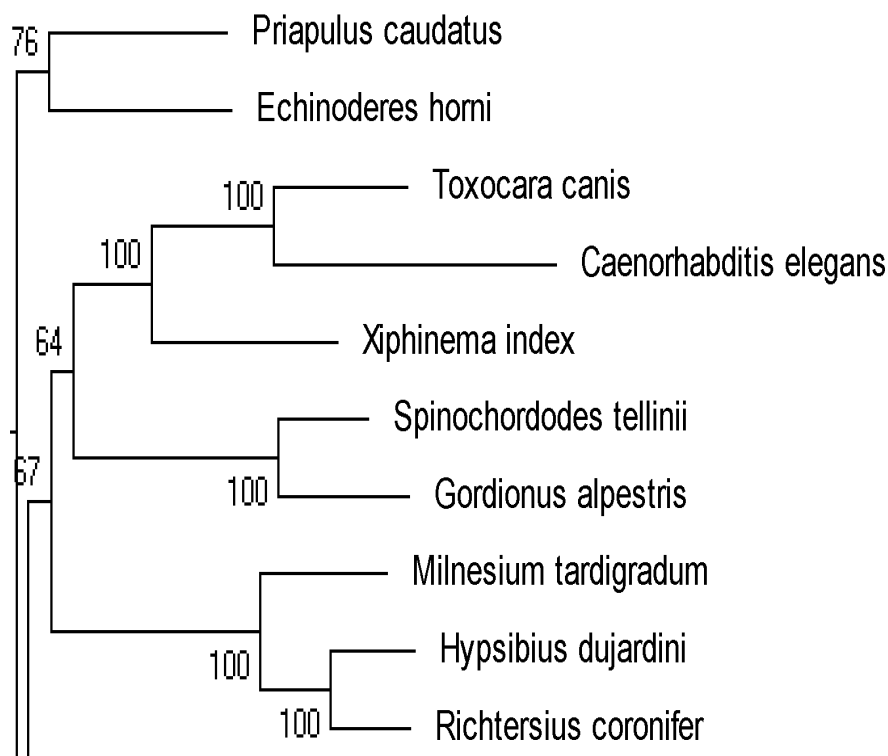


Рис. 1. Информативная часть общего филогенетического дерева родства, отражающего родство волосатиков с другими группами животных по результатам анализа RPL-RPS-белков.

Можно видеть, что полученные результаты подтверждают теорию родства волосатиков и нематод. Однако, также достаточно близко оказываются и тардиграды. Несмотря на начальный этап нашего исследования, данное дерево можно считать наиболее информативным анализом, касающейся данной группы животных.

Проведенные исследования показывают также необходимость дальнейшей разработки таксономии волосатиков. Одной из целей более широкого анализа будет выяснение положения волосатиков *Gordionus alpestris* в системе класса *Gordioida* и выявление филогенетических связей рода *Gordionus* с другими волосатиками. Эти исследования должны ответить на вопрос: насколько типичными для всего класса являются волосатики

этого рода. Для этого предполагается широкое по охвату изучение нуклеотидных различий между волосатиками по 18S рДНК, 28S рДНК и COI мтДНК.

ЛИТЕРАТУРА

- Малахов, В. В. Cephalorhyncha— новый тип животного царства, объединяющий Priapulida, Kinorhyncha и Gordiacea и система первичнополостных червей. // Зоологический журнал. 1980. Т. 59. С. 485—499.
- Edgar, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 2004. V. 32, P. 1792-1797.
- Kristensen, R. M. Loricifera, a new phylum with Aschelminthes characters from the meiobenthos. *Zeitschrift für Zoologische Systematik und Evolutionsforschung*. 1983. Bd. 21. P.163–180.
- Roure B., Rodriguez-Ezpeleta N. and Philippe H. SCAFoS: a tool for Selection, Concatenation and Fusion of Sequences for phylogenomics. *BMC Evolutionary Biology*, 2007, V. 7(Suppl 1). P. 2.
- Zerbino D.R. and Birney E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research*. 2008. V. 18, P. 821-829.

ПОЧВОБИТАЮЩИЕ НЕМАТОДЫ СОСНОВЫХ ЛЕСОВ ПРИРОДНО-ЗАПОВЕДНЫХ ТЕРРИТОРИЙ ЧЕРНИГОВЩИНЫ

Жилина Т.Н., Шевченко В.Л.

Черниговский национальный педагогический университет имени Т.Г.Шевченко, ул. Полуботка, 53, г. Чернигов, 14013, Украина; E-mail: zhylinat@mail.ru

Общая площадь земель лесного фонда Черниговской области одна из наибольших в Украине и составляет 738,1 тыс. га. Определяющее экологическое и экономическое значение в жизни области имеют сосновые леса. Однако, в связи с усилением антропогенного влияния и негативными изменениями составляющих окружающей среды стойкость сосновых лесов не только на Украине, но и в странах Европы и Азии снижается, а санитарное состояние ухудшается. Усыхание и выпадение деревьев в последнее время привлекает к себе внимание ученых разных направлений: экологов, энтомологов, фитопатологов. Данная работа является продолжением исследований нематодофауны почв сосновых лесов начатых в 2006 году. Целью работы было изучение сообществ почвенных нематод в лесных биоценозах природно-заповедных территорий, расположенных в Городнянском и Черниговском районах области. Материал был собран в сентябре 2012 года маршрутным методом в сосновых лесах, которые принадлежат к разным ассоциациям (таблица).

Таблица 1 Характеристика мест изучения почвообитающих нематод

Название	Категория	Координаты	Тип леса
Бигацкий лес	Лесной заказник	51°36'37" 31°38'37"	Сосновый лес злаково-зеленомоховой
Тупичевская дача-1	Ботанический заказник	51°48'44" 31°27'41"	Сосновый лес зеленомоховой
Гниздыщанская дача	Заповедное урочище	51°52'34" 31°26'46"	Елово-дубовый сосновый лес черничный

Образцы почвы на глубину до 10 см отбирали на однородных участках площадью около 100 м² по диагонали в десятикратной повторности, тщательно измельчали, перемешивали и готовили усредненную пробу. Выделяли нематод из навесок почвы (20 г) вороночным методом Бермана при экспозиции 48 часов и фиксировали раствором ТАФ. Видовой состав нематод изучали по временным водно-глицериновым препаратам с

помощью биологического микроскопа Delta Optical Genetic Pro. Пересчет численности осуществляли на 100 г почвы. Использовали таксономическую структуру класса Nematoda по Малахову (Малахов В.В., 1982).

В почве обследованных сосновых лесов природно-заповедных территорий зарегистрировано 30 видов нематод. Показатель таксономического богатства (сумма таксонов сообщества, обитающего на данной территории) равен 73. Для сосновых лесов Межреченского регионального ландшафтного парка этот показатель равен 77 [3].

Общая численность нематод в среднем оказалась невысокой и составила 673 особи в 100 г почвы. Выше она была в сосновом лесу злаково-зеленомоховом – 1059 особей в 100 г почвы. Растительный покров здесь хорошо развит, покрытие мхами среднегустое (50%). В этом типе леса выявлено 23 вида нематод.

Низкая численность почвенных нематод (185 особей в 100 г почвы) при небольшом количестве видов (9) была отмечена в сосновом лесу зеленомоховом. Эти леса на Черниговском Полесье преобладают, расположены они на вершинах склонов и песчаных гряд на слабоподзолистых почвах. Подлесок не выявлен. Травянисто-кустарниковый ярус негустой (20%). Моховой ярус почти сплошной (80%). Таким образом, более бедный флористический состав зеленомоховых сосновых лесов повлиял не только на численность, но и на видовое разнообразие почвенных нематод.

Подобные результаты получены и при изучении почвообитающих нематод сосновых лесов Межреченского регионального ландшафтного парка [3]. В сосновом лесу зеленомоховом обнаружено 16 видов нематод, численность их в 100 г почвы – 524 особи. В сосновом лесу чернично-зеленомоховом фауна более бедна видами (13), хотя численность была выше (1096 особей в 100 г почвы). Изучение фауны почвенных нематод лесов заповедника «Кивач» показало, что в сосняке брусничном выявлено 31 вид нематод, в сосняке чернично-брусничном фауна нематод имела низкое разнообразие – обнаружено 18 видов [1].

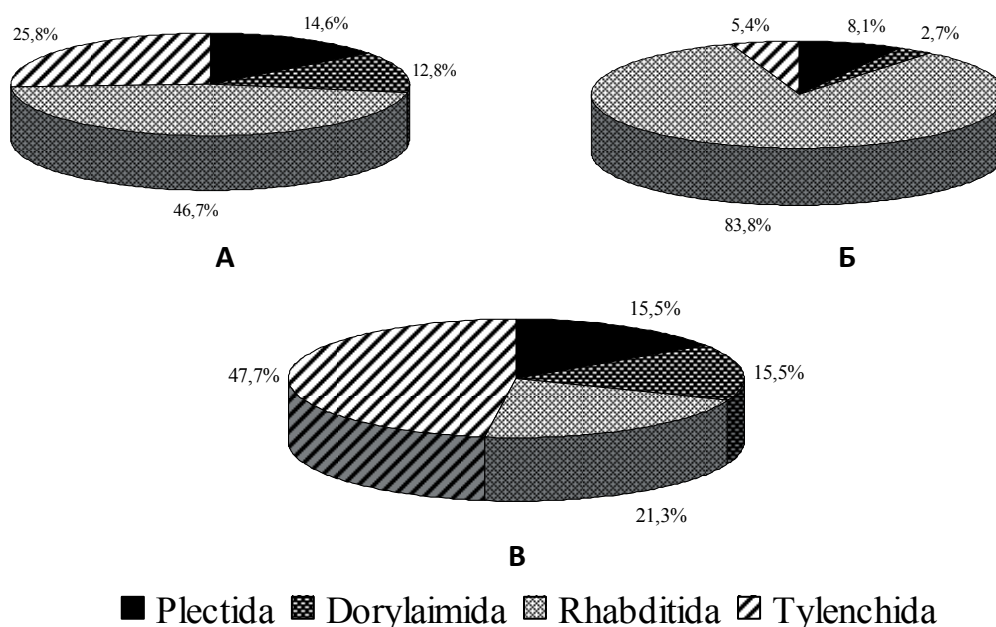


Рисунок 1. Таксономическая структура комплекса почвенных нематод сосновых лесов Черниговского Полесья: А - сосновый лес злаково-зеленомоховой, Б - сосновый лес зеленомоховой, В - елово-дубовый сосновый лес черничный

Выявленные виды принадлежат к четырем отрядам: Rhabditida, Tylenchida, Plectida, Dorylaimida. Наиболее обильными в почве оказались рабдитиды и тиленхиды. Доля участия их в общей численности нематод в почве сосновых лесов природно-заповедных территорий составляет в среднем 40,2% и 32,2% соответственно. Среди рабдитид доминирование

обеспечивает семейство *Cephalobidae* (26,3%), а тиленхид – семейство *Tylenchidae* (16,5%). Количество видов, принадлежащих к этим отрядам одинаковое – 11. Численность плектид и дорилаймид в таксономической структуре комплекса фитонематод сосновых лесов приблизительно одинакова – 14,4% и 12,9% соответственно. По количеству видов эти два отряда также уступают рабдитидам и тиленхидам. В каждом из них зарегистрировано по 4 вида.

Представители вышеназванных классов выявлены в почве всех обследованных типов леса. Доминирование по численности рабдитид характерно для сосновых лесов злаково-зеленомоховых и зеленомоховых, тогда как в елово-дубовом сосновом лесу черничном по численности доминировали нематоды из отряда *Tylenchida* (рисунок).

Если принять численность дорилаймид за 1, то соотношение представителей отрядов *Rhabditida* : *Tylenchida* : *Plectida* : *Dorylaimida* для всех обследованных лесов будет: 3,1:2,5:1,1:1. Несколько иной вид имеет это соотношение в почве сосновых лесов разных типов. А именно: в злаково-зеленомоховом – 3,6:2,0:1,1:1; в зеленомоховом – 31,0:2,0:3,0:1; елово-дубовом черничном – 1,4:3,1:1:1. Такие особенности таксономической структуры почвообитающих нематод, по-видимому, связаны с флористическим составом и типом почвы.

Общими для всех мест изучения оказались 7 видов, а именно: из отряда *Plectida* – *Wilsonema auriculatum* (*Bütschli, 1873*) *Cobb, 1913*; из отряда *Dorylaimida* – *Aporcelaimellus obtusicaudatus* (*Bastian, 1865*) *Heyns, 1965*; из отряда *Rhabditida* – *Cephalobus persegnis* *Bastian, 1865*, *Drylocephalobus moldavicus* *Lisetzkaja, 1969*, *Acrobeloides bütschlii* (*de Man, 1884*) *Steiner et Buhner, 1933*, *Cervidellus cervus* (*Thorne, 1925*) *Thorne, 1937*, *Rhabditis brevispina* (*Claus, 1862*) *Bütschli, 1873*. Перечисленные виды являются обычными для лесных почв Черниговщины. По доле участия в составе фауны эти виды имеют статус эудоминантов или субдоминантов, только *A. obtusicaudatus* относится к группе субрецендентов.

Выявленные виды являются представителями четырех эко-трофических групп: сапробионты (17 видов), микогельминты (9), полифаги (2), фитогельминты (2). В сообществе нематод отсутствует группа хищники. Соотношение нематод разных эко-трофических групп по численности следующее: сапробионты составляют 64,5% в общей численности; микогельминты – 29,4%; полифаги – 3,3%; фитогельминты – 2,8%.

В группе сапробионтов к видам эудоминантам относятся: *W. auriculatum*, *Tylencholaimus mirabilis* (*Bütschli, 1873*) *de Man, 1876*, *C. persegnis*, *A. bütschlii*, *Rh. brevispina*. Среди микогельминтов это: *Aphelenchoides parietinus* (*Bastian, 1865*) *Steiner, 1932*, *Coslenchus costatus* (*de Man, 1921*) *Siddiqi, 1978*, *Nothotylenchus exiguous* *Andrassy, 1958*. Полифаги не достигают высоких численностей, доля участия *A. obtusicaudatus* в общей фауне нематод составляет 1,0%, а *Eudorylaimus carteri* (*Bastian, 1865*) *Andrassy, 1959* – 2,2%. Численность фитогельминтов *Helicotylenchus dihystra* (*Cobb, 1893*) *Sher, 1961* и *Gracilacus audriellus* *Brown, 1959* в общей численности нематод составляет 2,4% и 0,5% соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

- Груздева Л. И., Матвеева Е. М., Коваленко Т. Е. Фауна почвенных нематод различных типов леса заповедника «Кивач» //Труды Карельского научного центра РАН. - Выпуск 10: Петрозаводск, 2006. – С. 14–21.
- Малахов В.В. Система крупных таксонов нематод: подклассы, отряды //Зоологический журнал. – 1982. – Т. 61. - №8. – С. 1125-1134.
- Шевченко В.Л. Ґрунтови нематоди лісів регіонального ландшафтного парку «Міжрічинський» (Чернігівська область) //Заповідна справа в Україні. – том 15, випуск 2, 2009. – С. 93 -94.

ЭЛЕКТРОННЫЙ УЧЕТ КОЛЛЕКЦИЙ ПАТОГЕННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ АГЕНТОВ (ПБА)

Жилоков А., Кожевников К.

*PACS Analyst, Federal Services Division, Black & Veatch, Ул. Марксистская, д. 16, 109147
Moscow, Russia; E-mail: zhilokov@bv.com, Kozhevnikovk@bv.com*

Задачи, возникающие на стыке различных сфер науки и деятельности всегда являлись наиболее интересными и, зачастую, сложными с точки зрения поиска оптимального и элегантного решения. Такого решения, которое отвечало бы требованиям и ограничениям всех сфер и одновременно было бы понятным и доступным для тех, в чьей деятельности данное решение будет применяться. Одной из таких задач является создание электронных систем для осуществления учета и контроля патогенных биологических агентов, хранящихся в коллекциях научно-исследовательских институтов и лабораторий. Данная задача возникает в пограничной области научно-исследовательской деятельности и информационных технологий. Решению подобной задачи и посвящена данная статья.

Для начала необходимо обозначить основные требования к такого рода системам. С одной стороны система должна обеспечивать необходимый уровень безопасности и надежности хранения информации о ПБА, являющейся, как правило, конфиденциальной, а также соответствовать существующим требованиям по учету биоматериалов. С другой стороны – быть простой и удобной в использовании и предоставлять дополнительные преимущества для работы с информацией по сравнению с бумажными записями.

Наличие системы учета на основе бумажных записей, используемой во всех без исключения научных организациях, обладающих коллекциями микроорганизмов, вызвано очевидной необходимостью ведения четкого учета всех единиц хранения, их передвижения и изменения параметров в целях нераспространения как самих биоагентов, так и информации о них, а также с целью соблюдения правил и требований контролирующих служб и органов. Системы, основанные на бумажных записях, за многолетнюю историю доказали свою эффективность и надежность. Тем не менее, развитие научно-технического прогресса позволяет применить новые знания в сфере информационных технологий для разработки электронных систем, которые полностью покрывали бы возможности бумажных и могли бы предоставить ряд дополнительных существенных преимуществ.

Одно из решений, удовлетворяющих вышеперечисленным требованиям – Система контроля патогенных материалов (PathogenAssetControlSystem) или СКПМ (PACS). Данная система разработана на основе Санитарных правил СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности», выпущенных Госкомсанэпиднадзором РФ, а также с учетом аналогичных нормативных актов, регулирующих порядок работы с микроорганизмами в странах СНГ. Разработка и внедрение системы осуществляется в рамках совместного проекта правительств стран СНГ, РФ, США и при участии Международного Научно-Технического Центра (МНТЦ).

СКПМ представляет собой электронную систему для учета и контроля патогенных материалов, хранящихся в коллекциях ПБА, с широкими возможностями проведения инвентаризации и отчетности, и обеспечивающую высокий уровень безопасности и надежности хранения информации.

Концепция СКПМ подразумевает установку узлов компьютерной системы во всех точках, где производится регистрация, хранение и исследование патогенных микроорганизмов для обеспечения непрерывной цепочки учета всего жизненного цикла микроорганизмов. Учет осуществляется с использованием технологии штрихкодирования контейнеров с биоагентами.

Схематично концепция операций и основные узлы СКПМ изображены на Рис.1. Работа системы подразумевает наличие центральной базы данных и клиентской части программы во всех необходимых подразделениях. Кроме лабораторий, осуществляющих работу с микроорганизмами, узлы системы могут быть установлены в пункте приема патогенного материала, у администратора и руководства учреждения, а также в других подразделениях в случае необходимости.

В рамках одного учреждения может быть установлено от одной до более, чем 30 точек доступа с возможностью одновременной работы. База данных СКПМ позволяет хранить информацию о более, чем 5 миллионах контейнеров с биоагентами без существенного влияния на производительность, что, как правило, значительно превышает требуемый объем информации. Таким образом, СКПМ одинаково подходит как для небольших лабораторий узкого профиля, так и для крупных научных организаций с большим числом подразделений и распределенной структурой хранения биоагентов.

Система разрабатывается на основе технологии .Net в среде Microsoft Visual Studio 2010 на языке CSharp. Система управления базой данных – Microsoft SQL Server 2008. Система спроектирована для работы с серверными и клиентскими операционными системами линейки Microsoft – Windows Server, Windows XP, Windows Vista, Windows 7.

Пользовательский интерфейс программы современен, прост и удобен в использовании, что позволяет легко и быстро научиться работать с СКПМ.

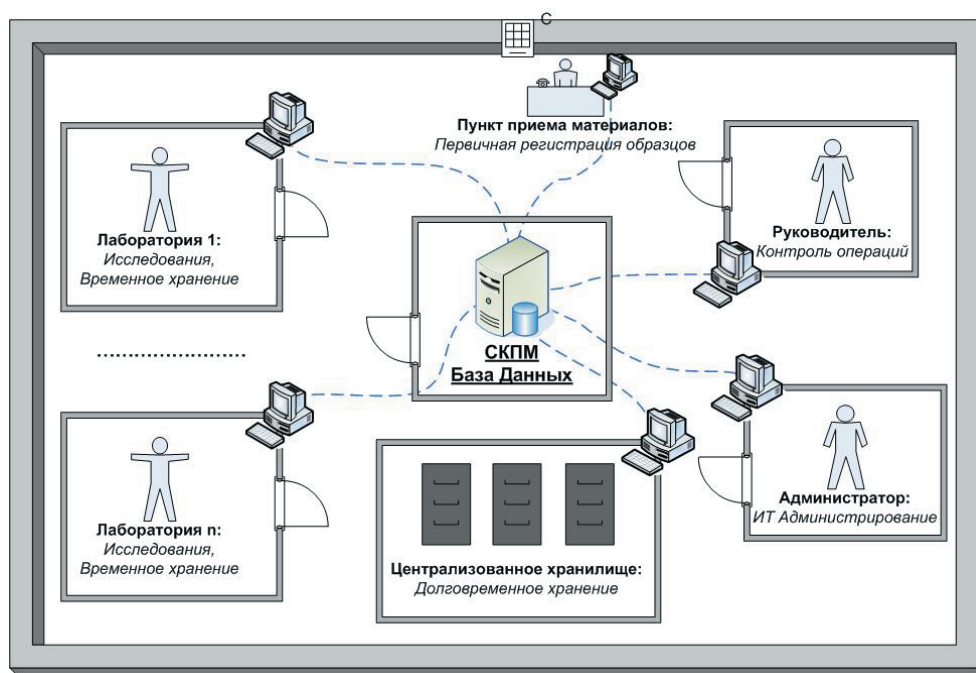


Рис.1. Концепция операций и основные узлы СКПМ

Среди основных возможностей СКПМ необходимо отметить следующие:

- **Создание детальной конфигурации хранилища.** Данная функция позволяет пользователям создать точную копию хранилища: помещения, холодильники, полки, коробки, штативы и далее до индивидуальных ячеек хранения внутри коробок.
- **Регистрация поступающих биоагентов.** Позволяет регистрировать все поступающие на исследование и хранение патогенные материалы, присваивать им уникальные штрих-кодовые номера, указывать точное местонахождение в хранилище и регистрировать все их свойства и параметры, указанные в сопутствующих документах (сопроводительная записка, паспорт). Электронные формы учета материалов могут быть при этом настроены в соответствии с требованиями конкретного учреждения и типов принимаемых биоагентов

• **Настройка параметров доступа к данным.** Использование системы доступа к данным на основе индивидуальных учетных записей пользователей позволяет ограничивать доступ к информации для каждого сотрудника в соответствии с его полномочиями и должностными обязанностями

• **Инвентаризация коллекции.** Функция инвентаризации позволяет провести полную проверку хранилища и выяснить точность и актуальность информации о биоматериалах, хранимой в базе данных

• **Отчетность.** СКПМ предоставляет возможность создания, как стандартных отчетов для распечатки (Форма учета материала, Акт регистрации и т.п.), так и настраиваемых отчетов, формат которых может быть выбран в соответствии с пожеланиями пользователей

• **Контроль действий персонала.** Все действия пользователей записываются в журналах событий системы, что позволяет отслеживать информацию о доступе сотрудников к тем или иным данным. Кроме того, система предоставляет возможность активировать опцию «удаленной авторизации», требующая предварительного разрешения руководителя для выполнения операций в системе

• **Безопасность данных.** Система предоставляет возможность осуществления резервного копирования и восстановления данных

• **Дополнительные операции с биоматериалами:** Пересев, Разделение, Перемещение, Выдача, Уничтожение, Разбавление, Использование

Вышеперечисленные особенности – лишь малая часть возможностей, предоставляемых системой СКПМ пользователям. Развитие продукта продолжается и сейчас, на данный момент выпущена версия 4, выпуск следующей, 5-й версии запланирован на осень 2013 года. В текущей версии СКПМ имеется возможность использовать радиочастотную идентификацию (RFID) для маркировки материалов (RFID метки), отслеживания перемещения материалов (RFID ворота), а также для упрощения и ускорения операций с материалами (RFID сканеры/считыватели).

В завершение хотелось бы отметить ряд научных институтов, успешно использующих программный продукт СКПМ:

- Всероссийский НИИ фитопатологии (ВНИИФ), МО, Большие Вяземы, РФ
- Национальная лаборатория им. Лоуренса (Lawrence Livermore National Laboratory), г. Ливермор, Калифорния, США
- Научная лаборатория Университета Северной Аризоны (Northern Arizona University), г. Флагстафф, Аризона, США
- Научная лаборатория по исследованию заболеваний птиц (Southeast Poultry Research Laboratory), Джорджия, США
- Казахский научный центр карантинных и особо опасных инфекций (КНЦКЗИ), г. Алматы, Казахстан
- Национальный референтный центр по ветеринарии (НРЦВ), г. Астана, Казахстан
- Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности (НИИПББ), г. Отар, Казахстан
- Центральная противочумная станция, г. Баку, Азербайджан
- НИИ контроля ветеринарных препаратов, г. Баку, Азербайджан
- Национальный центр контроля заболеваний, г. Тбилиси, Грузия
- Украинский научно-исследовательский противочумный институт им. И.И. Мечникова (УНИПИ), г. Одесса, Украина

Кроме того, система находится на стадии пробной эксплуатации в 3-х научных институтах США.

Разработка системы продолжает осуществляться в тесном сотрудничестве с пользователями, нынешними и будущими, для гарантирования её востребованности и применимости в целевой сфере.

УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ К ПАЗАРИТИЧЕСКИМ НЕМАТОДАМ: МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Зиновьева С.В.

*Центр паразитологии Института проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова РАН,
Москва, Ленинский проспект, дом 33, e-mail: zinovievas@mail.ru*

В последние годы, благодаря объединению усилий специалистов различного профиля, появилось значительное количество данных о механизмах устойчивости растений к нематодам, особенно к седентарным – галловым и цистообразующим, образующим в корнях инвазированных растений особые зоны питания – гигантские клетки или синцитий. Основная роль во взаимоотношениях растений и нематод принадлежит секретам пищеводных желез, поверхности кутикулы и амфид. Эти секреты, являются основными сигналами, исходящими от нематод, содержат молекулы-эффекторы, определяющие их патогенность, а также играющие роль в модуляции защитного потенциала и ответных реакциях в корнях растения-хозяина (Gheysen, Mitchum 2011, Rosso et al., 2012). Узнавание патогена служит пусковым механизмом для индукции защитных реакций и активации экспрессии защитных генов. Информация об инфекции передается от мест первичного поражения на геном с помощью сигнальных молекул (мессенджеров, индукторов фитоиммунитета), таких как салициловая и жасмоновая кислота.

В настоящее время установлено, что у растений существует несколько линий защиты против паразитических нематод, которые объединены понятием врожденного иммунитета. Врожденный иммунный ответ растений можно условно разделить на *неспецифический (базовый)* – развивающийся в ответ на консервативные молекулярные паттерны, ассоциированные с патогенами (pathogen- или microbe-associated molecular patterns, PAMPs или MAMPs) или молекул, образующихся из поврежденных клеток самого растения (damage-associated molecular patterns, DAMPs) и зависящий от передачи сигнала через трансмембранные “паттерн распознающие рецепторы” (PRRs) – первая линия защиты; и *специфический*, или вторичный, – развивающийся в ответ на присутствующие у патогенов эффекторный белки, распознаваемые цитоплазматическими рецепторами. Растительные PRRs представляют собой трансмембранные белки, во внеклеточной части которых присутствуют LRRs (leucine-rich repeats – лейцин богатые) повторы, вовлеченные в связывание ассоциированных с патогенами молекулярных паттернов. Нематодными PAMPs, узнаваемых растениями, и вызывающих защитную реакцию возможно являются компоненты кутикулы нематод (глюканы, гликопротеины, липополисахарид (ЛПС)), а также другие соединения, контактирующие с клетками растений. Связывание PAMPs с рецепторами приводит к индукции базальной защитной реакции, обозначаемой как PTI (PAMPs-triggered immunity), которая и является первой преградой для нематод и сопровождается изменением концентрации ионов (Ca^{+}), продукцией активных форм кислорода и азота, сигнальных гормонов: жасмоновой и салициловых кислот, этилена и продукцией антимикробных молекул, таких как фитоалексины. В корнях томатов, инвазированных галловыми нематодами, обнаружены гены, гомологичные некоторым известным защитным генам (включая гены пероксидазы, хитиназы, липоксигеназы и ингибиторов протеиназ), а также ряд других генов, кодирующих ферменты, участвующие в защите растений от окислительного стресса, вызванного паразитическими нематодами.

PAMPs могут избегать распознавания рецепторами или подавлять PTI и проникать в клетки. Эволюция патогенов, направленная на преодоление PTI, привела к появлению эффекторных белков, подавляющих эту первичную защитную реакцию (Quentin, Abad, Favery, 2013). свою очередь, эволюция защитной системы растений связана с появлением белков рецепторов, участвующих в специфическом распознавании эффекторных белков патогенов и индуцирующих развитие “вторичного” ответа (ETI, effector-triggered immunity). Такие рецепторы называются R-белками (R-proteins, resistance proteins). Большая часть R-белков структурно относится к семейству белков, содержащих нуклеотид связывающий домен и лейцин богатый домен (NB-LRRs). Таким образом, для обеспечения второй линии защиты от патогенов, которым удалось преодолеть первую линию защиты, основанную на активации PRRs, у растений существуют уникальные внутриклеточные цитоплазматические рецепторы NB-LRRs. В отличие от PRRs, распознающих PAMPs, NB-LRRs взаимодействуют со специфическими для определенных патогенов эффекторными белками. В системе NB-LRRs реализуется взаимодействие “ген на ген”. Это значит, что каждому рецептору растения соответствует распознаваемый им фактор авирулентности патогена. Специфика взаимоотношений нематод и растений в некоторых случаях определяется прямым или косвенным взаимодействием единственного гена устойчивости растения - хозяина с геном авирулентности паразита. При клонировании оказалось, что гены нематодоустойчивости растений принадлежит к классу NBS-LRR генов.

О природе генов авирулентности у нематод известно пока очень немного. В настоящее время обнаружены кандидаты на роль гена авирулентности галловых нематод к гену *Mi*. Сравнение растворимых белков вирулентных и авирулентных самок этих нематод в 2-D полиакриламидном геле показало наличие добавочного белка у авирулентных самок. Клонирование и молекулярный анализ этого белка показал, что он является одним из белков, выделяемых амфидами. Ген, кодирующий этот белок, возможно является геном авирулентности галловой нематоды (Semblat, Rosso, Hussey, et al. 2001). Также показано, что белки SPRYSEC GrRBP1 *Globodera pallida* взаимодействовать с LRR доменом и тем самым могут быть факторами авирулентности (Rehman et al., 2009). Активация NB-LRRs приводит гиперчувствительному ответу (реакция сверхчувствительности – СВЧ), который в большинстве случаев выражается в запрограммированной смерти зараженных клеток, что приводит к изоляции нематоды и ее гибели.

Некоторые эффекторы, секретлируемые пищеводными железами нематод, могут подавлять R-медиированную устойчивость. К таким эффекторам можно отнести хоризматмутазы, которые влияют на синтез флавоноидов, салициловой кислоты, фитоалексинов и ауксина, а также кальретикулин, который подавлял экспрессию защитных генов в тканях арабидопсиса, при инвазии галловой нематодой (Jaouannet et al. 2013). Недавно было показано, что присутствующий в секретах *Globodera rostochiensis* эффектор SPRYSEC-19 вызывает подавление СВЧ, которая является проявлением устойчивости, вызванной присутствием NB-LRRs генов (Postma et al, 2012).

R-ген медиированная устойчивость растений к нематодам сопровождается накоплением в некротических погибших клетках токсичных продуктов (фенолов, фитоалексинов, PR-белков, ингибиторов протеиназ и др.). В некоторых случаях проявление устойчивости в растениях с геном резистентности не связано с возникновением реакции СВЧ. Такой тип устойчивости развивается после проникновения нематод в растения и формирования питающих клеток (синцития или гигантских клеток). Нематода может развиваться до взрослой стадии, однако размножение не происходит, а питающие клетки спустя две-три недели деградируют (Bakker, Dees, Bakker, et al. 2006).

Согласно существующей классификации, химические соединения с помощью которых растения защищают себя от болезней, делят на фитоантиципины и фитоалексины (ФА).

Первые – низкомолекулярные антимикробные вещества, присутствующие в растении до заражения или продуцируемые после заражения из ранее присутствующих предшественников (фенолы, терпеноиды, гликозиды и др. вещества специализированного обмена растений); их количество как, правило, увеличивается при инвазии растений, особенно в устойчивых сортах; вторые – низкомолекулярные антимикробные вещества, которые синтезируются и аккумулируются в растении *de novo*. В настоящее время, помимо ФА, в растениях обнаружены и другие активные соединения - антимикробные полипептиды, с которыми связана устойчивость растений к паразитическим нематодам (PR-белки, ингибиторы протеиназ и др.). Устойчивость растений к нематодам может быть связана с доступностью или нехваткой соединений, жизненно необходимых для фитогельминтов, но не синтезируемых ими, в частности стеринов.

Наряду с R-ген медиированной устойчивостью, активно изучается и другая форма устойчивости растений – индуцированная устойчивость (ИУ), которая активизируется под влиянием метаболитов фитопатогенов, а также различных факторов биотической и абиотической природы, и отражает определенный адаптивный потенциал организма. Полученные нами данные показали, что при ИУ, вызванной хитозаном, арахидоновой кислотой и рядом других индукторов, в растениях активизируются те же защитные механизмы, которые действуют при генетически детерминированной устойчивости, но в отличие от последней, степень защиты, как правило, не превышает 30% (Зиновьева и др. 2013).

Обусловленная генами *R* устойчивость накладывается на биохимические пути основной (базовой) устойчивости растений. Базовая устойчивость, так же как и индуцированная устойчивость в той или иной степени ограничивает рост патогена после успешного заражения в отсутствие генов устойчивости и не допускает быстрой гибели зараженного восприимчивого растения. Поскольку ряд таких локусов необходим и для функции отдельных генов *R*, то представляется вероятным, что системы базовой и специфической защиты могут перекрываться. Пока остается неясным, какие именно из защитных реакций обусловлены геном *R*, а какие свойственны базовой устойчивости. Имеется предположение, что одной из функций (или даже основной функцией) генов устойчивости является более быстрая и эффективная активация механизмов защиты, играющих роль и в базовой устойчивости (Dangl, Jones J., 2001). Разница может заключаться в сигнальных системах, участвующих в формировании защитного ответа. Установлено, что в системе томаты-галловая нематода – *Meloidogyne incognita* индуцированная хитозаном устойчивость реализуется при участии двух медиаторов сигнальных систем - салициловой и жасмоновой кислот, тогда как в случае *Mi*- медиированной устойчивости в передаче сигнала на геном участвует СК (Molinari 2011, Зиновьева и др. 2013).

ЛИТЕРАТУРА

- Зиновьева С.В., Васюкова Н.И., Удалова Ж.В., Герасимова Н.А. (2013) Участие салициловой и жасмоновой кислот во взаимоотношениях растений с паразитическими нематодами. Известия РАН, серия. биол. № 3. С. 322-340.
- Bakker E , Dees R , Bakker J , Govers A. (2006) Mechanisms involved in plant resistance to nematodes . In: "Multigenic and induced systemic resistance in plants". (Eds Tuzum S. , Bent E.), Springer, Berlin , pp. 314 – 334.
- Dangl J.L., Jones J.D.G. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Nature. Vol. 411 (6839), pp. 826-833.
- Gheysen G., Mitchum M.G. (2011). How nematodes manipulate plant development pathways for infection. Current Opinion in Plant Biology, Vol.14, pp. 415–421.
- Jaouannet M., Magliano M., Arguel M.J. et al. (2013). The Root-Knot Nematode Calreticulin *Mi-CRT1* is a Key Effector in Plant Defense Suppression. MPMI. Vol. 126, (1), pp. 97–105.

- Molinari S. (2011). Natural genetic and induced plant resistance, as a control strategy to plant-parasitic nematodes alternative to pesticides. *Plant Cell. Rep.* V. 30, pp.311–323.
- Semblat JP, Rosso MN, Hussey RS, Abad P, Castagnone-Sereno P (2001) Molecular cloning of a cDNA encoding an amphid secreted putative avirulence protein from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Mol. Plant Microbe Interact.* Vol. 14, pp. 72–79.
- Postma W. J., Sloopweg E. J., Rehman S., Finkers-Tomczak A., Tytgat T. O. G., van Gelderen K. et al. (2012). The effector SPRYSEC-19 of *Globodera rostochiensis* suppresses CC-NB-LRR-mediated disease resistance in plants. *Plant Physiol.* V. 160, pp. 944–954.
- Quentin M, Abad P, Favery B. (2013). Plant parasitic nematode effectors target host defense and nuclear functions to establish feeding cells. *Front Plant Sc.* 2013; 4:53i.
- Rehman S., Postma W., Tytgat T., Prins P., Qin L., Overmars H. et al. (2009). A secreted SPRY domain-containing protein (SPRYSEC) from the plant-parasitic nematode *Globodera rostochiensis* interacts with a CC-NB-LRR protein from a susceptible tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.* Vol. 22, pp. 330–340.
- Rosso, M.-N. , Hussey R.S. Davis E.L. et al. (2012). Nematode Effector proteins: Targets and Function in plant Parasitism. In: *Effectors in Plant-Microbe Interactions.* (Eds F. Martin, S. Kamoun), pp. 327-354

РОЛЬ ЖАСМОНОВОЙ И САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТ В УСТОЙЧИВОСТИ ТОМАТОВ К ГАЛЛОВОЙ НЕМАТОДЕ, *MELOIDOGYNE INCOGNITA* (KOFOID, WHITE, 1919)

Зиновьева С.В.¹, Удалова Ж.В.¹, Герасимова Н.Г.²

¹ *Центр паразитологии ИПЭЭ РАН, 119071, Россия;*

² *Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН Москва, 119071, Россия;*

Галловые нематоды рода *Meloidogyne* являются экономически значимыми паразитическими организмами многих культурных растений, возделываемых в открытом и защищенном грунте. На территории России выявлено 5 видов данного рода нематод, три из которых распространены в закрытом грунте. Они наносят колоссальный ущерб овощным культурам, особенно огурцам и томатам. Основным способом защиты от нематод является использования устойчивых сортов и гибридов растений, если таковые имеются. Устойчивость томатов (*Lycopersicon esculentum*) к *M. incognita*, *M. arenaria* и *M. javanica* связана наличием доминантного гена *Mi-1.2*. Наряду с генетической устойчивостью проводится активное изучение индуцированной устойчивости (ИУ). При ИУ включаются те же защитные механизмы, что при генетической, однако, интенсивность защитных реакций несколько ниже. Но в интегрированной системе защиты растений ИУ активно применяется. ИУ обладает системным действием, возникает не только в месте нанесения элиситора или локализации патогена (локальная устойчивость), но и в отдаленных тканях растений (системная индуцированная устойчивость – СИУ). СИУ защищает растения от широкого круга патогенных организмов и продолжительна во времени. Процесс распознавания элиситоров осуществляется с помощью сигнальных систем, которые определяют реакцию клеток на воздействие. Наиболее известными медиаторами сигнальных систем являются оксигенированное производное полиненасыщенных жирных кислот – жасмоновая кислота (ЖК) и оксипроизводное бензойной кислоты - салициловая кислота (СК). Эти молекулы рассматривают как важные посредники в передаче стрессовых сигналов в геном растительной клетки. В зависимости от типа инфицирования и характера стресса растения активируют различные сигнальные системы с целью обеспечить оптимальную защиту своих тканей (Farmer et al., 2003) СК и ЖК являются ключевыми молекулами, принимающими участие в формировании иммунного ответа растений, однако их конкретная роль в устойчивости ещё недостаточно изучена. Полагают, что через СК сигнализацию

индуцируются защитные реакции растений при воздействии биотрофных патогенов (McDowell, Dangl, 2000). Жасмонаты и в их числе ЖК играют основную роль в запуске СИУ при поранении, атаке патогенов и вредителей. Полагают, что генетическая устойчивость растений к нематодам регулируется с помощью СК-зависимого сигнального пути (Molinari, 2007, Зиновьева и др., 2011). Показано, что заражение томатов приводит к существенному увеличению содержания СК в тканях томатов (Васюкова и др, 2003). В системе восприимчивые томаты-галловая нематода показано, что СК и ЖК в некоторой степени индуцирует устойчивость, но она не превышает 30%. Однако применение сигнальных молекул с биогенными элиситорами позволяет существенно повысить СИУ. В настоящем исследовании в системе томаты – галловая нематода *M. incognita* была предпринята попытка выявить участие и характер взаимоотношений между СК- и ЖК-сигналами при индуцированной и генетической устойчивостях и определить их совместное действие на поражаемость растений фитогельминтами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали устойчивый к галловой нематоды гибрид F₁ Шаганэ (*Mi+*) и восприимчивый - F₁ Гамаюн (*Mi-*). Поскольку ген *Mi-1.2* не работает при высоких температурах, исследования на растениях проводили при нормальной температуре (25°C) и повышенной (32°C). Томаты заражали в фазе 3-х настоящих листьев (3 тыс. личинок/растение). Обработку томатов СК (7×10^{-8} М) и ЖК (5×10^{-8} М) проводили дважды: замачивали семена в растворах (время экспозиции – 2 ч) и опрыскивали перед заражением. На 7 сут. отбирали листья томатов для биохимических исследований, на 40 сут. растения были сняты для оценки на зараженность нематодой.

РЕЗУЛЬТАТЫ О ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ растений томатов двух гибридов выращенных при нормальной и повышенной температуре показал, что увеличение температуры приводит к сильному заражению *Mi+* растений, хотя количество галлов на них было значительно ниже *Mi-* растений. В оотеках находились сформированные яйца, но их число уступало аналогичному показателю в *Mi-* растениях (Табл 1). Повышение температуры не влияло на поражаемость *Mi-* растений.

Обработка *Mi-* томатов ЖК позволили снизить зараженность растений, об этом свидетельствуют уменьшения числа галлов (независимо от температуры) и их размеров и плодовитости самок по сравнению с контрольными растениями, что свидетельствует о проявлении защитных свойств в растении. Обработка ЖК *Mi+* растений, выращенных при 25°C не оказала влияния на устойчивость. При 32°C обработка ЖК томатов *Mi+* значительно снизила заражение корней нематодой (в 2 раза, по сравнению с контролем), и плодовитость на 47%. При обработке СК *Mi-* томатов заражение также снизилось (на 20% по сравнению с контролем независимо от температуры), но фертильность самок нематод не изменилась. При нормальной температуре СК не влияла на устойчивость гибрида *Mi+*. При 32°C обработка СК *Mi+* растений значительно уменьшила заражение нематодой (число галлов на корнях на 60 % меньше по сравнению с контролем). Существенно уменьшились размеры самок и их плодовитость. Таким образом, обработка СК и ЖК *Mi-* растений позволила снизить заражение растений и подавить развитие паразитов вследствие проявления ИУ, вызванной этими соединениями. Обработка *Mi+* растений, утративших устойчивость под действием повышенной температуры, ЖК и СК показала, что эти соединения полностью не восстанавливают утраченную устойчивость, но каждое соединению помогало растениям сопротивляться воздействию нематоды, что также можно расценивать как участие процессах ИУ. Кроме того, обработка устойчивых растений ЖК не подавляла генетической устойчивости, что указывает на отсутствие конфликта между сигнальными системами. Чтобы выявить изменения в процессах синтеза СК и ЖК при экзогенной обработке препаратами,

исследовали активность фермента липоксигеназы (ЛОГ), участвующего в синтезе ЖК и фенилаланин аммиаклазы (ФАЛ), задействованной в синтезе СК. Активность ЛОГ возрастает в тканях томата *Mi-* при обработке ЖК по сравнению с контролем, а также в растениях *Mi+* при повышенной температуре. Исходя из этого, можно предположить, что ЖК участвует в сигнализации защитных ответов при индуцированной, но не генетической устойчивости. Анализ ФАЛ показал, что при обработке *Mi-* растений СК при 25°C увеличивает активность фермента, тогда как в устойчивых обработка подавляет этот показатель. Повышенная температура не влияла на активность ФАЛ в здоровых восприимчивых растениях, в устойчивых наблюдалось снижение активности. Обработка СК при 32°C повышала активность ФАЛ в *Mi+* растениях, а в *Mi-* уровень этого показателя был на уровне контроля. Можно предположить, что повышение активности ФАЛ связано в основном с индукцией системной устойчивости растений. Однако сильная активация фермента в зараженных *Mi-* растениях при 32°C, обработанных СК, и значительное угнетение репродукции нематод могут также свидетельствовать об участии СК не только в ИУ, но и в генетической устойчивости, поскольку известно, что инвазия томатов *Mi+* галловой нематодой приводила к повышению уровня СК, коррелирующей с активностью ФАЛ в растениях (Зиновьева и др., 2011).

Таблица 1. Действие ЖК и СК на показатели устойчивости томатов к *M. incognita* при различной температуре

	Генотип	Обработка	Число галлов в 1 г корня	Размер галлов, мм ²	Размер самок, мм ²	Число яиц в оотеке
T=25°C	<i>(Mi-)</i>	Контроль	246	1,52	0,33	158
		ЖК	175	1,43	0,29	118
		СК	202	1,86	0,34	145
	<i>(Mi+)</i>	Контроль	0	Нет	Нет	Нет
		ЖК	0	"	"	"
		СК	0	"	"	"
T=32°C	<i>(Mi-)</i>	Контроль	264	1,84	0,31	162
		ЖК	205	1,68	0,32	121
		СК	218	1,93	0,34	164
	<i>(Mi+)</i>	Контроль	147	1,32	0,33	63
		ЖК	73	1,28	0,31	36
		СК	62	1,16	0,24	23
<i>HCP*</i>			40	0,35	0,03	15

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии конфликта между сигнальными системами, участвующими в индуцированной и генетической устойчивости томатов к галловой нематоды. Проведенное исследование позволило сравнить действия индуцированной и *Mi*-медирированной устойчивости и определить влияние этих двух защитных ответов растения на галловую нематоду. При нормальной температуре (25°C) *Mi-1.2* подавлял репродукцию галловых нематод, в то время как обработка сигнальными молекулами приводила только к частичной устойчивости восприимчивых растений томатов. Высокая температура (32°C) приводила к потере устойчивости томатов к галловой нематоды, хотя поражаемость корней и репродукция галловой нематоды были ниже таковых у восприимчивых растений. В противоположность *Mi*-медирированной устойчивости, ЖК- и СК-индуцированная устойчивость оказалась стабильной к температуре. Кроме того, при

высокой температуре обработка растений ЖК или СК была способна снизить поражаемость нематодой растений с утраченной устойчивостью.

Таким образом, очевидно, что при определенных условиях *Mi*-медиированная и индуцированная устойчивость могут проявлять кумулятивные свойства и тем самым способствовать снижению поражаемости растений нематодами. Полученные данные позволяют предположить, что использование различных сигнальных систем позволяет растению оптимизировать их защитные ответы на инвазию галловыми нематодами в различных ситуациях – как при генетической, так и при индуцированной устойчивости.

ЛИТЕРАТУРА

- Васюкова Н.И., Панина Я.С., Зиновьева С.В. и др.* Участие салициловой кислоты в системной устойчивости томатов к нематодам // Докл. РАН. 2003. Т. 391. № 3. С.401–404.
- Зиновьева С.В., Васюкова Н.И., Удалова Ж.В. и др.* Участие салициловой кислоты в устойчивости растений к паразитическим нематодам // Известия РАН, Сер. биол. 2011. №5. С.532–538.
- Farmer E.E., Almeras E., Krisnamurthy V.* Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory // Curr. Op. Plant Biol. 2003. V. 6. P. 372-378.
- McDowell J.M., Dangl J.L.* Signal transduction in the plant immune response // Trends Biochem. Sci. 2000. V. 25. P. 79–82.
- Molinari S.* New developments in understanding the role of salicylic acid in plant defence // CAB Rev. 2007. V. 67. P. 1–10.

ГЕНОТИПИЧЕСКАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ВОСПРИИМЧИВОСТИ КАРТОФЕЛЯ К *GLOBODERA ROSTOCHIENSIS*

Иешко Е.П., Матвеева Е.М., Сысоева М.И.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, ул. Пушкинская, д.11, г. Петрозаводск, 185910, Республика Карелия, Россия; E-mail: ieshko@krc.karelia.ru

Проведены исследования восприимчивости генотипов картофеля к заражению паразитической нематодой *Globodera rostochiensis* Woll. Генотипы (популяция S₁) получены от соматического гибрида SH9A (родительские формы *Solanum commersonii* Dun., PI243503 - дикий вид, устойчивый к низкой температуре, (+) *S. tuberosum* L., SPV11 - культурный вид, чувствительный к данному абиотическому фактору). Генотипы различаются по морозоустойчивости: два гибрида наследуют от *S. commersonii* высокую и среднюю степень устойчивости (freezing-tolerant FT2019 и FT1020) и два гибрида, чувствительные к действию низких температур (freezing-sensitive FS2045 и FS2022). Для сравнения тенденций изменения восприимчивости к биотическому фактору в зависимости от устойчивости генотипов к абиотическому фактору исследовали степень зараженности культурного вида *S. tuberosum* (сорт Невский). Для оценки восприимчивости к заражению картофельной цистообразующей нематодой (КЦН) у различных по морозоустойчивости генотипов картофеля перед заражением паразитической нематодой растения в фазе трех настоящих листьев подвергали в течение 6 суток низкотемпературной обработке. Затем растения заражали КЦН. Доза заражения на растение – 20 цист *G. rostochiensis*.

Установлено, что среди генотипов, которые не подвергались низкотемпературной обработке и рассматривались как контроль (на рисунках показаны их названия с добавлением буквы С), наибольшей восприимчивостью к заражению (по значениям средней численности образовавшихся на корнях растений цист нематоды) отличались дикий вид (*S.com_C*) и высоко толерантный к действию низких температур генотип (FT2019_C) (рис. 1).

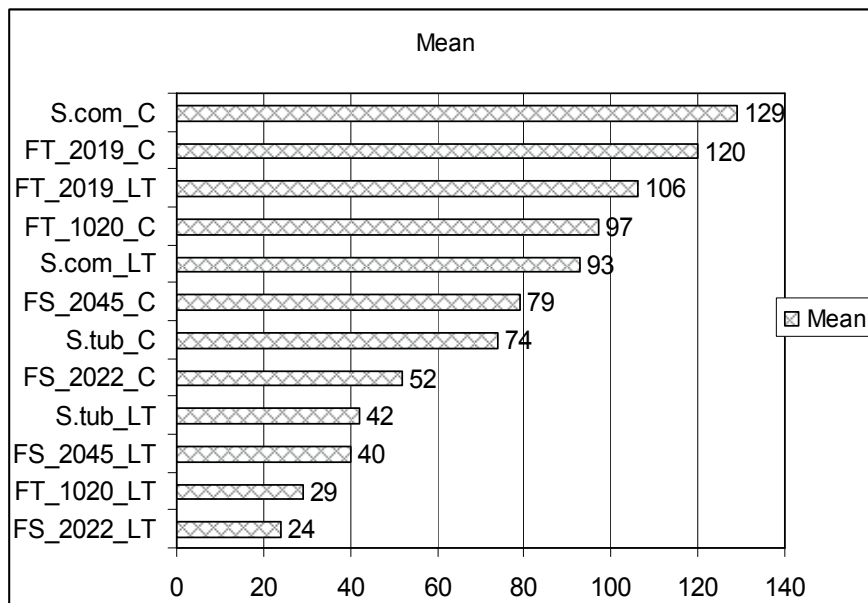


Рисунок 1. Средняя интенсивность заражения нематодой в контроле (С) и при воздействии низких температур (LT) у различных генотипов картофеля (обозначение генотипов даны в тексте).

Заметно ниже интенсивность заражения цистами КЦН отмечена у среднеустойчивого генотипа FT1020_C. Наибольшую устойчивость к заражению показали растения, принадлежащие к холодочувствительным генотипам – FS2045 и FS2022, а также культурного вида S.tub_C (рис. 1).

Для растений, подвергнутых низкотемпературной предобработке, установлено повышение устойчивости к заражению нематодой (рис. 1). Динамика снижения показателей зараженности (количества цист КЦН) выражалась в разной степени в зависимости от реакции растения на низкую температуру (толерантные FT и чувствительные FS генотипы). Дикий вид и высоко толерантный генотип после воздействия низких температур (S.com_LT и FT_2019_LT) показали незначительное снижение зараженности нематодой (рис. 1). Наблюдаемые различия в значениях количества цист, несмотря на демонстрируемый тренд на снижение, были статистически не достоверны. Генотип картофеля FT_1020_LT со средней устойчивостью к заморозкам после температурной обработки показал статистически достоверное снижение зараженности растений нематодой (коэффициент размножения k нематоды составил 1,4 против 4,9 в контроле).

Все чувствительные генотипы картофеля и культурный вид после воздействия низкими температурами (FS2045_LT, FS2022_LT и S.tub_LT) показали высокие показатели устойчивости к заражению нематодой ($k = 1.2-2.2$ против 2,6-4,0 в контроле) (рис. 1). Различия в численности цист КЦН, развившихся на корнях опытных и контрольных растений были статистически достоверными ($P < 0.05$).

Наиболее выраженное негативное влияние низкотемпературной предобработки на дальнейшее развитие личинок нематоды в корнях опытных растений было отмечено у среднеустойчивого к заморозкам генотипа FT_1020_LT: снижение количества цист КЦН составило 70% от контрольных растений; у высоко толерантных генотипов этот показатель составил 12-28%, а у чувствительных к заморозкам генотипов - 44-54%.

РАЗРАБОТКА КОМПЬЮТЕРНОЙ МОДЕЛИ «ПРОГНОЗ ПОТЕРЬ УРОЖАЙНОСТИ КАРТОФЕЛЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИНТЕНСИВНОСТИ РАЗВИТИЯ ГЛОБОДЕРОЗА»

Колесова Е.А., Шестеперов А.А.

Российский государственный аграрный заочный университет, г. Балашиха Московской области, 143900 Россия; E-mail: zr-kaf@mail.ru.

Серьезную тревогу вызывает расширение ареала опасного фитопатогена – цистообразующей золотистой картофельной нематоды (ЗКН), вызывающей карантинное заболевание – глободероз (ГЗ). В настоящее время этот объект зарегистрирован в 59 регионах России на площади около 70 тыс. га (*Справочник карантинных, фитосанитарных зон, 2010*). Ежегодно выявляются новые очаги глободероза. Монокультура картофеля и возделывание восприимчивых сортов в частном секторе, плохо контролируемые перевозки картофеля внутри страны, несоблюдение карантинных правил приводят к расширению ареала ЗКН и росту очагов. Широкому распространению нематоды способствуют ее высокая плодовитость и выживаемость, способность расселяться с почвой, переноситься с орудиями труда, транспортом при перевозке картофеля, посадочным материалом.

Картофельная нематода особенно вредоносна на приусадебных участках и на полях с укороченными специализированными севооборотами, где картофель выращивают бессменно или возвращают на прежнее место на второй-третий год. В среднем потери урожая составляют 30%, но известны случаи, когда они достигали 90%.

Цель исследований - изучить вредоносность золотистой картофельной нематоды и глободероза картофеля, разработать математические и компьютерные модели прогноза потерь урожайности в зависимости от интенсивности развития глободероза.

Сбор почвенных и растительных образцов проводили с 2002 по 2005 годы на посадках картофеля в личных подсобных хозяйствах Московской и Владимирской областей. Фитосанитарные, фенологические и фитогельминтологические учеты на посадках картофеля, оценку продуктивности растений проводили согласно общепринятым методам (*Шестепёров, Саватилов, 1995*).

Установлено, что в условиях личных подсобных хозяйств, в которых картофель выращивают в монокультуре, глободероз часто играет значительную роль в снижении урожайности и в период вегетации его отрицательное влияние практически неустранимо.

Проведенные корреляционный и регрессионный анализы экспериментальных данных по влиянию на урожайность восприимчивых сортов картофеля предпосадочной плотности популяции ЗКН в почве и интенсивности развития глободероза в период вегетации показали, что интенсивность развития глободероза на сортах Синеглазка и Невский (коэффициент корреляции $R=0,82$, $R=0,87$) более достоверно определяло урожайность, чем предпосадочная плотность популяции золотистой картофельной нематоды в почве ($R=-0,55$, $R=0,57$). Полученные математические модели прогноза потерь урожайности картофеля в зависимости от плотности популяции золотистой картофельной нематоды в почве на сортах Синеглазка и Невский, были менее достоверны (коэффициент детерминации $R^2=0,303$, $R^2=0,326$), чем модели прогноза потерь урожая в зависимости от развития глободероза ($R^2=0,68$, $R^2=0,76$). Урожайность картофеля обратно пропорционально интенсивности развития глободероза. Математическое представление зависимости урожайности (y) картофеля от интенсивности развития глободероза (x) имеет вид: $y=b-ax$, где b - урожайность непораженных глободерозом растений, a – коэффициент, величина которая зависит от сортовых особенностей, x – интенсивность развития глободероза в %. Высокие коэффициенты детерминации (Синеглазка $R^2=0,958$, Невский $R^2=0,985$) математических моделей, характеризующих интенсивность развития ГЗ в зависимости от предиктов,

свидетельствуют, что субъективная балльная оценка обследователей, основывается на учете модифицированной, унифицированной шкалы для наземной визуальной оценки поражения глободероза, достаточно объективна и может быть использована для установления фитогельминтологической ситуации и прогнозирования вредоносности глободероза.

Разработана на основе математических моделей компьютерная программа *«Прогноз потерь урожайности картофеля в зависимости от интенсивности развития глободероза»*, позволяющая в диалоговом режиме проводить компьютерные эксперименты.

Работа с компьютерной моделью *«Прогноз потерь урожайности картофеля в зависимости от интенсивности развития глободероза»* начинается с основного меню, из которого пользователь должен выбрать, последовательно, один из вопросов;

Вид меню следующий:

1. Что такое глободероз картофеля.
2. Возбудитель глободероза – золотистая картофельная нематода.
3. Симптомы глободероза картофеля.
4. Методы визуальной оценки развития глободероза в личных подсобных хозяйствах, в баллах и перевод в %.
5. Вредоносность глободероза и прогнозирование потерь урожая картофеля в зависимости от интенсивности его развития.
6. Компьютерная модель *«Прогноз потерь урожайности картофеля в зависимости от интенсивности развития глободероза»*.

Выбирая один из пунктов меню, пользователь переходит к следующему более специализированному меню и выходит на интересующий его раздел. В 6-ом пункте главного меню *«Прогноз потерь урожайности картофеля в зависимости от интенсивности развития глободероза»* производятся все расчеты по прогнозированию урожая и его потерь.

Начинается программирование со сбора данных. В диалоговом окне первый вопрос: Какой сорт картофеля вы выращиваете на зараженной ЗКН почве?

1. Сорт картофеля Синеглазка
2. Сорт картофеля Невский
3. Смесь сортов

После этого пользователь вводит значение развития ГЗ на посадке картофеля в конце июля – начале августа.

Диапазон ввода данных, развитие ГЗ, должен варьироваться от 0 до 100%. Компьютерная модель дает возможность выбрать пользователю, в каких единицах прогнозировать потери урожая, в % или в ц/га.

После ввода данных и нажатия кнопки «ОК» в диалоговом окне можно увидеть конкретные значения потерь урожайности картофеля в зависимости от степени развития глободероза или прогноз урожая с учетом потерь от глободероза, в зависимости от того, какой расчет был выбран пользователем. Проведение имитационных экспериментов на компьютерной диалоговой модели позволило установить, что интенсивность развития ГЗ (от 10 до 90%) вызывает потери урожайности картофеля сорта Синеглазка (от 12,2 до 78,2%), сорта Невский (от 10,8 до 75,3%), смесь сортов (от 7,2 до 64,9%).

ЛИТЕРАТУРА

Шестеперов А.А., Савотиков Ю.Ф. Карантинные фитогельминтозы. – М.: Колос, 1995. – 463 с.

К БИОЛОГИИ НЕМАТОД РОДА *BURSAPHELENCHUS* ВОСТОЧНОГО ПОЛЕСЬЯ УКРАИНЫ

Корма А.М.

Черниговский государственный институт экономики и управления, г. Чернигов, 14033,
Украина; E-mail: korma@km.ru

Изучению фитогельминтов, обитающих в древесине, стали уделять особое внимание после того, как была доказана роль нематод *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner) Nickle в возникновении болезни бурсафеленхоза (увядания) сосны в Японии. Одной из основных экологических особенностей древесных нематод является тесные взаимоотношения с жуками-переносчиками: в одних случаях по типу комменсализма в виде форэзии, в других – взаимоотношения приобретают характер факультативного, а порой и облигатного паразитизма.

При исследовании в условиях Восточного Полесья Украины фауны фитопаразитических нематод древесины сосны обыкновенной на наличие представителей рода *Bursaphelenchus*, нами было выявлено три вида фитогельминтов этого рода: *Bursaphelenchus mucronatus* Mamiya et Enda, *Bursaphelenchus sexdentati* Ruhm, *Bursaphelenchus eggersi* Ruhm. Трофическое группирование нематод-ксилобионтов носит относительный характер, поскольку эти нематоды в своем онтогенезе связаны с насекомыми, то есть являются энтомонематодами, и способны питаться мицелием древесных грибов – тем самым, являясь в определённой степени микофагами. Но влияние нематод этого рода на развитие патологического процесса в сосудистой системе деревьев даёт нам право отнести их к фитогельминтам специфического патогенного эффекта. Кроме большой вредоносности вида *B. xylophilus* (Steiner et Buhner) Nickle, который является карантинным организмом для многих стран мира, неоднократно была доказана патогенность и других видов нематод этого рода.

Проведенные в разных странах исследования показали разную степень патогенности различных популяций вида *B. mucronatus*. Кроме того, экспериментально было доказано, что патогенность этого вида в значительной мере зависит от условий окружающей среды, непосредственно температуры и размера инокулюма нематод на одно дерево [3]. Высокая степень патогенности изолята *B. mucronatus* из Приморского края России по отношению к сосне корейской *Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc. был экспериментально доказан в своей диссертационной работе Ириной Круглик [4]. Степень отмирания корейских сосен достигала 100% зараженных деревьев. Анализ микропрепаратов структуры проводящей системы деревьев показал сходство поражения этих тканей, выявленного при заражении карантинным видом *B. xylophilus* саженцев сосен *P. densiflora* Sieb. et Zucc. и *P. thunbergii* Parl. в Японии [1].

При изучении патогенности нематод *B. sexdentati* Ruhm в Греции путем искусственного заражения трехлетних сеянцев сосен *Pinus brutia* Tenore, *P. halepensis* Mill., *P. nigra* Arnold., *P. pinaster* Aiton и *P. sylvestris* L. был получен результат, который показал высокую вирулентность вида *B. sexdentati*. Отмирание сосен достигало 100% от данного вида нематод [2].

Среди выявленных нами в пробах древесины видов нематод рода *Bursaphelenchus*, *B. mucronatus* оказался доминирующим. Частота встречаемости его составляла 54,1% обследованных образцов. Два других представителя этого рода *B. eggersi* и *B. sexdentati* имели статус соответственно обычного и редкого с частотой обнаружения 9,8 и 4,9%. Высокий показатель частоты встречаемости *B. mucronatus* свидетельствует о том, что данный вид занимает выгодную экологическую нишу, проводящие сосуды деревьев, в которой практически отсутствующий ограничивающий фактор – конкурирующие виды фитонематод.

Причину доминирования *B. mucronatus* над другими представителями рода можно объяснить биологическими особенностями развития насекомых-переносчиков. Согласно литературным источникам, переносчиком *B. eggersi* является малый еловый лубоед *Hylurgops palliatus* Gyll., а *B. sexdentati* – короед-стенограф *Ips sexdentatus* Boern.. Эти вредители относятся к группе короедов. Они имеют на протяжении года 2-3 генерации, а, следовательно, продолжительность свободноживущей стадии у этих нематод короче чем у *B. mucronatus*, поскольку они вынуждены приспосабливаться к срокам вылета короедов из древесины. Кроме того, короеды зимуют преимущественно в стадии имаго, и весной дополнительное питание у них проходит под корой. В отличие от этого, переносчиком *B. mucronatus* является черный усач *Monochamus galloprovincialis* Oliv., развитие которого в дереве длится целый год, и зимует насекомое в стадии личинки в древесине. То есть данный вид нематод имеет большую продолжительность свободноживущих генераций. К тому же, дополнительное питание весной, после вылета из ствола дерева, этот жук проводит в кроне взрослого дерева, тем самым, увеличивая площадь заражения нематодами.

Согласно литературным источникам, основными переносчиками нематоды *B. mucronatus* являются усачи рода *Monochamus*. Нематоды переносятся в личиночной стадии IV возраста, при этом они располагаются на поверхности тела жука под надкрыльями или в трахеях.

Исследуя в качестве переносчиков нематод рода *Bursaphelenchus* чёрных сосновых усачей *Monochamus galloprovincialis* Oliv. методом полного гельминтологического вскрытия жуков [5], нами установлен интересный факт. У 50 заражённых нематодами жуков, пойманных в естественных условиях, личинки нематод на поверхности тела располагались в 26% случаев (13 жуков), в трахеях – в 18% случаев (9 жуков), а в 76% случаев (38 жуков) личинки нематод *B. mucronatus* были обнаружены в кишечнике и прямой кишке. То, что эти личинки относились именно к указанному виду, было подтверждено путём их дальнейшей инкубации в стерильной древесной стружке при температуре 28⁰С и экспозиции 72 часа. Кроме того, в 3 случаях в кишечнике жуков были обнаружены взрослые самки нематоды *B. mucronatus* в количестве от 1 до 20 особей. Факт размещения личинок нематод в кишечнике и переноса взрослых особей жуками-переносчиками в литературе ранее не описывался.

Как отмечают многие нематологи, у фитогельминтов наблюдается интенсивная эволюция адаптационных процессов. Вполне допустимо сделать предположение, что у нематод рода *Bursaphelenchus* происходит переход от типичных форетических связей к факультативному эндопаразитизму. С чисто биологической точки зрения, такая смена вполне целесообразна. Во-первых, на поверхности тела жука нам часто встречались клещи-нематофаги, которые высасывали содержимое нематод, оставляя засохшие кутикулы. Располагаясь внутри тела жука, личинки нематод укрыты от нападения клещей. Во-вторых, как описано в литературных источниках, заражение деревьев нематодами происходит, в том числе, и при откладывании самками жука яиц в насечку на коре. Попасть в насечку при откладывании в неё 1–2 яиц жуком гораздо удобнее из прямой кишки, нежели спускаться с поверхности тела.

Исследование других жуков-ксилобионтов позволило установить ещё один вид переносчиков нематоды *B. mucronatus* – златку хвойную восьмиточечную (*Ancylocheira octoguttata* L.). И хотя количество исследованных особей данного вида златок невелико, всего пять, четыре из них (т.е. 80%) были заражены личинками *B. mucronatus* численностью до 700 штук на одно насекомое.

Подводя итоги выше сказанному, хотелось бы ещё раз подчеркнуть важность дальнейшего изучения нематод-ксилобионтов разных эколого-трофических групп, а особенно фитогельминтов и энтомогельминтов. Изучение же механизма развития патологического процесса, вызываемого фитопаразитическими нематодами-ксилобионтами,

даст возможность предотвратить попадание и развитие болезни бурсафеленхоза сосны в хвойных лесах наших стран.

ЛИТЕРАТУРА

- Mamiya Y. Pathology of pine wilt disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus* / Y. Mamiya. // Annual Revive of Phytopathology. –1983. –№21. –P.201-220.
- Skarmoutsos G. Pathogenicity of *Bursaphelenchus sexdentati*, *Bursaphelenchus leoni* and *Bursaphelenchus bellenicus* on European pine seedlings / G. Skarmoutsos, H. Michalopoulos-Skarmoutsos // Forest Pathology -2000. –Vol.30, №3. –P.149-156.
- Shauer-Blume M. Preliminary investigations on pathogenicity of European *Bursaphelenchus* species in comparison to *Bursaphelenchus xylophilus* from Japan / M. Shauer-Blume. // Rev. nematol. - 1990. -Vol.13, №2. –P.191-195.
- Круглик И.А. Нематода *Bursaphelenchus mucronatus* – опасный паразит кедра на юге Дальнего Востока России / И.А. Круглик. // Взаимоотношения хозяина и паразита: Всерос. науч. конф. М. -1998. -С.37-39.
- Лазаревская С.Л. К методике изучения нематод насекомых / С.Л. Лазаревская. // Труды ГЕЛАН СССР. -1962. -Т.ХII. –С. 43-51.

ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ НЕМАТОДОЗОВ СЕЯНЦЕВ *PINUS SYLVESTRIS*, ПРОБЛЕМЫ ИХ ДИАГНОСТИКИ И ПРОГНОЗА

Коропец С.И.

Национальный университет биоресурсов и природопользования, ул. Героев Оборона, 15,
г. Киев-041, 03041, Украина; E-mail: bulterius@mail.ru

Временные лесные питомники (площадью 0,05-0,15 га) являются важнейшей составной частью лесопромышленной отрасли Украины. Каждый такой объект – это уникальный биологический комплекс. Тем не менее, специалисты-нематологи больше внимания уделяют постоянным крупным питомникам, порой ошибочно обобщая как их биоэкологические особенности, так и специфику хозяйственной деятельности.

С целью изучения данного вопроса, за период с 2007 по 2010 год были произведены нематологические исследования ряда временных питомников лесохозяйственных предприятий Сумской и Киевской областей Украины. Всего было отобрано и исследовано более 400 комплексных растительных и почвенных образцов. Нематод, способных к миграции, выделяли модифицированным вороночным методом Бермана.

Общий комплекс фитонематод, обнаруженных в ризосфере сеянцев сосны обыкновенной, представлен 67 видами. За экотрофическим группированием чуть более половины (36 видов или 54%) обнаруженных видов – сапробионты. К группе фитогельминтов специфического патогенного эффекта отнесено 10, фитогельминтов неспецифического патогенного эффекта – 7, микогельминтов – 9 и хищных нематод – 5 видов.

Типичными представителями фауны в прикорневой почве среди сапробионтов были фитонематоды родов *Dorylaimida* (виды родов *Aporcelaimellus*, *Aporcelaimus*, *Eudorylaimus*), *Plectida* (род *Anaplectus*), *Rhabditida* (роды *Mesorhabditis*, *Caenorhabditis*, *Acrobeloides*, *Chiloplacus*, *Cephalobus*); микогельминтов – виды родов *Aphelenchus*, *Aphelenchoides*; среди паразитических видов – преобладали фитогельминты неспецифического патогенного эффекта – родов *Aglenchus*, *Coslenchus*, и виды *Ditylenchus dipsaci*, *Pratylenchus vulnus*.

Комплекс фитонематод корневой системы сеянцев сосны был представлен преимущественно сапробиотическими видами (семейств *Plectidae*, *Cephalobidae*, *Rhabditidae*). Причем в корнях визуально здоровых сеянцев ни одного представителя данной

группы обнаружено не было. Преимущественно их наличие отмечалось в корнях с наличием некрозов или корневой системе отмерших семян. Доля фитопаразитических видов в корневом материале становила 28% (семейства Trichodoridae, Tylenchulidae, Anguinidae, Pratylenchidae, Telotylenchidae; а также роды *Psilenchus*, *Aglenchus*, *Coslenchus*, *Filenchus*, *Tylenchus*). Обнаружено 5 видов микогельминтов семейств Aphelenchidae, Aphelenchoididae, Neotylenchidae.

Фауна нематод отмерших семян представлена преимущественно сапробиотическими видами родов *Panagrolaimus*, *Chiloplacus*, *Acrobeles*. В стволах угнетённых больных семян были выявлены микогельминты родов *Aphelenchus*, *Aphelenchoides*; сапробиотические виды рода *Eucephalobus*; фитогельминты *Ditylenchus dipsaci* и *Aglenchus agricola*. В стволах же внешне здоровых, нормально развитых семян ни одного вида фитонематод выявлено не было.

Установлено, что интенсивное накопление фитонематод в ризосфере находится в прямой зависимости с проявлением физиологических и функциональных изменений семян сосны обыкновенной. В ризосфере визуально здоровых, нормально развитых семян численность фитогельминтов СПЭ составляла в среднем 43 особи на 100 см³ почвы, фитогельминтов НПЭ – 77, микогельминтов – 73, сапробионтов – 839 ос./100 см³ почвы. В очагах, с задержкой роста семян, бледной или синей окраской хвои, отмечено относительное увеличение численности паразитических видов фитонематод. Прежде всего, видов *D. dipsaci*, *Pr. vulnus*, *A. agricola* и *C. costatus*. Численность фитогельминтов СПЭ была в пределе 33-101, фитогельминтов НПЭ – 195-264, микогельминтов – 32-46, сапробионтов – 1067-1342 ос./100 см³ почвы.

На участках, где наблюдалось значительно угнетение роста семян сосны, одиночное или массовое их отмирание, отмечено резкое изменение как численного, так и качественного состава обнаруженного комплекса фитонематод. Видовое разнообразие сократилось более чем в 5 раз, до 10-12 видов. Взамен суммарная численность всех без исключения экотрофических групп нематод резко возросла. Фитогельминтов СПЭ в среднем до 385, фитогельминтов НПЭ – 1322, микогельминтов – 146, сапробионтов – 2991 ос./100 см³ почвы. Среди выявленных паразитических фитонематод в ризосфере семян, с резким проявлением патологических изменений, численно доминировали виды *C. costatus* (до 2047 ос./100 см³ почвы), *A. agricola* (3376 ос./100 см³ почвы), *P. vulnus* (510 ос./100 см³ почвы), *D. dipsaci* (443 ос./100 см³ почвы). Среди микогельминтов – *Aph. asterocaudatus* и *Aph. limbery*. Сапробионтов – *Acr. buetschlii*, *C. insubricus*.

Для ризосферы отмерших семян характерным было полное отсутствие фитогельминтов и микогельминтов. Численность же сапробиотических видов, для которых свойственно питание в очагах растительных остатков, что разлагаются, возросла более, нежели в пять раз. Причем, абсолютно доминировал лишь один вид – *Panagrolaimus rigidus* (до 4492 ос./100 см³ почвы). Характерным есть то, что, в общем, частота встречаемости данного вида не превышала 4% в прикорневой почве и 5,6% в корнях семян.

На бедных песчаных почвах с глубоким залеганием грунтовых вод семена сосны, как правило, формируют тонкие удлинённые корни, в результате поражения которых образуются симптомы типа «оборванных корней». На более богатых, достаточно увлажнённых почвах, в результате паразитической деятельности нематод, образуется преимущественно мочковатая корневая система. Поврежденные боковые корни становятся темными, раздутыми, булабовидными. В местах отмирания образуется много маленьких боковых корешков. Внешне пораженные семена выглядят хлоротичными, отстают в росте, и, в большинстве случаев, уже в середине лета имеют бурю окраску хвои. Последнее говорит о катастрофичной нехватке фосфора, что вызвано сильной редукцией корней.

При этом ошибочно рассматривать фитогельминтов как единого паразита семян сосны. Не вызывает сомнения то, что они действуют комплексно. Но, под этим термином надо понимать не только общество нематод разных экотрофических групп, а и их тесную связь с другими микроорганизмами. Прежде всего, бактериями и грибами. Особую заинтересованность вызывает связь фитогельминтов с грибом *Cylindrocarpon destructans*. О специфике развития грибов данного рода в ризосфере семян древесных пород в отечественной литературе практически ничего не говорится. Тем не менее, он был обнаружен в пробных образцах во всех случаях массового поражения корней фитогельминтами, с наличием симптомов характерных для болезни «коркового корня».

Основная проблема в диагностике нематодозов заключается в том, что патологические изменения в семенах сопровождаются влиянием не отдельного определенного фактора, а целым их комплексом. В свою очередь, большинство абиотических, биотических и антропогенных факторов ведут к одинаковым функциональным изменениям в растении, а, соответственно, сопровождаются сходными визуальными эффектами. Это ведет к тому, что потери посадочного материала, вызванные вредоносным влиянием паразитических видов нематод, относят к влиянию других почвенных микроорганизмов, в первую очередь грибов. Проблемы диагностики нематодных заболеваний обусловлены еще и отсутствием надежных и не трудоемких методов учета численности и динамики популяций.

Особо важным этапом исследований есть видовая идентификация. Если же взять к вниманию оптическое разрешение доступного на данный момент оснащения, и разные вариативные изменения, которые происходят в процессе фиксации и изготовления микропрепаратов, определение видовой принадлежности требует значительных навыков и годов практического опыта. Постоянно возникают споры относительно количества и степени размежеваний, необходимых для того, чтобы различить видовую принадлежность фитонематод. А точная характеристика отдельных разновидностей часто требует затрат всего свободного времени. К тому же существует еще и острая нехватка информации относительно биологических особенностей большинства видов. Все это отрицательно отражается на попытках внедрения нематологии в производственный сектор.

Потенциально, предположение развития нематодозов базируется на знании динамики популяций паразитических видов и методике определения экономического порога вредоносности. Причем последнее, на данный момент, настолько не определено, что говорить о каких-либо конкретных цифрах довольно таки субъективно и порой ошибочно. Прогнозирование изменений в популяциях нематод усложняется их биологическими особенностями, большой зависимостью от внешних факторов. Динамика численности может зависеть от количества воспроизводства поколений, коэффициента размножения, погодных условий и тому подобное. Кроме этого популяции фитонематод лесных питомников характерна резкая сукцессия видов, что вносит значительные коррективы в элементы диагностики и прогноза. Во временных лесных питомниках основным лимитирующим фактором есть стойкость семян древесных пород к поражению паразитическими видами фитонематод, что зависит преимущественно от условий произрастания, а именно – богатства почвы.

Учитывая тот факт, что с имеющимися очагами нематодного поражения практически невозможно бороться, все усилия в прогнозе должны быть направлены на подбор такого участка или создания таких условий, которые будут максимально оптимальными для выращивания семян определенной древесной породы. Все это необходимо для поддержания их природной стойкости перед поражением паразитическими фитогельминтами или их комплекса с другими почвенными микроорганизмами.

НЕМАТОДЫ *BURSAPHELENCHUS MUCRONATUS* И СВЯЗАННЫЕ С НИМИ БАКТЕРИИ, КАК ВОЗМОЖНАЯ ПРИЧИНА ГИБЕЛИ СОСНОВЫХ НАСАЖДЕНИЙ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ

Кулинич О.А.^{1,2}, Арбузова Е.Н.², Козырева Н.И.¹, Мазурин Е.С.¹, Ромашова Н.Б.³,
Кольчихина М.С.², Рысс А.Ю.⁴

¹ Центр паразитологии ИПЭЭ РАН, Ленинский пр. 33, Москва, 119071, Россия;

E-mail: okulinich@mail.ru;

² Всероссийский центр карантина растений, Московская обл., Быково,
ул. Пограничная, 32; 140150;

³ Воронежский государственный биосферный заповедник;

⁴ Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, Университетская наб., 1.

ВВЕДЕНИЕ

«Вилт хвойных пород», возбудителем которого является сосновая стволовая нематода *Bursaphelenchus xylophilus*, относится к числу наиболее экономически значимых заболеваний хвойных пород в мире. В результате внедрения нематод в дерево, уже к концу летнего сезона дерево полностью увядает. Переносчиками нематод с дерева на дерево являются черные усачи рода *Monochamus*. Изучение этиологии этого явления в последние годы дало основание сделать вывод о том, что болезнь вызывает не один организм – нематода, а комплекс патогенов: нематода *B. xylophilus* и связанные с ней бактерио-симбионты, продуцирующие фитотоксины. По мнению китайских ученых, именно фитопатогенные бактерии, продуцирующие фитотоксины, вызывают гибель клеток в растении, что в итоге приводит к гибели дерева. В настоящее время вид *B. xylophilus* на территории России обнаружен не был, однако, широко распространен близкородственный ему вид *B. mucronatus*, который считается слабопатогенным. При этом в ряде опытов некоторые изоляты *B. mucronatus* показывают высокую степень патогенности. Какие факторы влияют на развитие «вилта хвойных пород», который заканчивается гибелью деревьев, и какова роль в данном заболевании нематод *B. mucronatus* и переносимых ими бактерий-симбионтов? Для ответа на данный вопрос была изучена микробиота различных изолятов нематод *B. mucronatus*, распространенных на территории РФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В 2010-2012 гг. были обследованы хвойные лесонасаждения и хранящиеся лесоматериалы на территории Воронежской области (Воронежский государственный биосферный заповедник), Московской области, Пермского, Красноярского, Забайкальского, Приморского, Хабаровского, Алтайского краёв и Республике Алтай. Выделено двадцать четыре изолята нематод *B. mucronatus* из древесины хвойных пород. Выделенных нематод *B. mucronatus* размножали в культурах *in vitro* на бесспорной линии гриба *Botrytis cinerea*.

Бактерий с нематод *B. mucronatus* выделяли на питательных средах Кинг Б или YDC. Методом серийных разведений получали единичные колонии, идентификацию которых проводили с использованием прямого секвенирования гена 16S rRNA. Культуры после посева хранили при -70°C в 15%-ном растворе глицерина. Для амплификации использовали универсальные праймеры: 8UA forward 5'-aga gtt tga tcm tgg ctc ag-3' и 519B reverse 5-gta-tta-ccg-cgg-ckg-ctg-3' (http://www.enotes.com/topic/16S_ribosomal_RNA), амплифицирующие участок гена 16S rRNA.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований показали отсутствие сосновой стволовой нематоды *B. xylophilus* в проанализированных пробах, собранных как в Воронежской области, так и в других регионах РФ. Однако почти повсеместно обнаружен близкородственный вид

B. mucronatus. Частота его встречаемости в целом по стране составляла 11,5 % и 5,6 %, соответственно в 2010 и 2011 гг.

При исследовании двадцати четырех географических изолятов нематод *B. mucronatus* из различных районов РФ выделено двадцать видов бактерий, относящихся к 5 классам (*Gammaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Flavobacteria*, *Bacillales*) и 9 семействам (*Enterobacteriaceae*, *Xanthomonadaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Burkholderiaceae*, *Rhizobiaceae*, *Nocardiaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Paenibacillaceae*). Наибольшим видовым разнообразием представлен класс гамма-протобактерии, включающий представителей трех семейств: *Enterobacteriaceae* (7 видов), *Xanthomonadaceae* (2 вида) и *Pseudomonadaceae* (5 видов). Наибольшее разнообразие бактерий обнаружено у иркутского изолята (Bmlr) - идентифицировано 8 видов бактерий.

Если рассматривать частоту встречаемости бактерий на нематодах по регионам, то наиболее часто встречались бактерии рода *Pseudomonas* (44%). Идентифицировано 5 видов бактерий данного рода: *P. lurida*, *P. brenneri*, *P. geniculata*, *P. fluorescens*, *Pseudomonas* sp. Фактически все обнаруженные виды бактерий считаются сапрофитными. Бактерии *Pseudomonas fluorescens* обнаружены у девяти изолятов нематод из Воронежской области, Алтайского, Забайкальского, Пермского, Приморского, Хабаровского краев. Именно этот вид бактерии выделялся китайскими исследователями с нематод *B. xylophilus*, и именно с ним связывают высокую патогенность нематодо-бактериального комплекса на соснах в Китае (Zhao, 2008).

На бактериальную биоту изучены также трансмиссивные личинки нематод 4-й стадии (dauerlarva), выделенные из большого черного елового усача *Monochamus urussovi* Fisch. из Воронежской области. Бактерии были представлены четырьмя видами: *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Serratia* sp. Таким образом, данный факт подтверждает тесную симбиотическую связь нематод *B. mucronatus* и бактерий *Pseudomonas fluorescens*.

В результате исследований бактерий-симбионтов нематод *Bursaphelenchus xylophilus*, проведенных в Японии, Китае, Южной Корее и Португалии в последние годы (Proenca et al., 2010; Wu X.Q. et al., 2013; Zhao, 2008; Zhao et al., 2009) выявлено, что заболевание «вилт хвойных пород» вызывается комплексом патогенов: нематодами и бактериями. Разные исследователи выделяют разные виды патогенных бактерий, которые, по их мнению, являются доминантными в проявлении вилта сосны: *Pseudomonas fluorescens* в Китае, *Burkholderia arboris* – в Южной Корее (Kwon Hyeok Ran, 2010), *Bacillus* spp. в Японии. Дальнейшие исследования показали высокую степень фитотоксичности бактерий *P. fluorescens* и *B. arboris*.

Бактерии *P. fluorescens* у нематод *B. mucronatus* нами обнаружены впервые. Ранее этот вид бактерий регистрировался только на нематодах вида *B. xylophilus* в Китае и Португалии (Proenca et al., 2010; Zhao, 2008; Zhao et al., 2009). Китайские ученые считают данный вид бактерий основным возбудителем «вилта хвойных пород» в КНР. В связи с этим особенно интересен факт обнаружения бактерий *P. fluorescens* в девяти выделенных нами географических изолятах *B. mucronatus*, распространенных на территории России. Можно предположить, что если данные изоляты *B. mucronatus*, содержащие бактерии *P. fluorescens*, перенести в условия, благоприятствующие развитию вилта (подходящие климатические условия – высокая температура воздуха и дефицит влаги; восприимчивые растения-хозяева), то мы также сможем наблюдать «вилт хвойных пород».

Согласно анализу фитосанитарного риска, значительная часть территории России благоприятна для акклиматизации сосновой стволовой нематоды *B. xylophilus* и проявления увядания хвойных пород, вызываемого этим патогеном. Считается, что увядание хвойных деревьев, заселенных нематодами *B. xylophilus*, происходит интенсивно, если

среднемесячная температура воздуха самого жаркого месяца лета составляет 25⁰С и выше. При температуре 20⁰С заболевание растягивается на два года. На территории России самый жаркий месяц – июль. Анализ фитосанитарного риска показал, что в случае заноса нематоды *B. xylophilus*, увядание хвойных насаждений может наблюдаться на значительной части европейской территории РФ (весь регион южнее широты Воронежской области, включая данную территорию), а также на юге Сахалинской обл., Приморского и Хабаровского краев (Kulinich & Orlinski, 1998).

Сосна обыкновенная *Pinus sylvestris* L., широко произрастающая на территории Российской Федерации, в частности в Воронежской области, относится к числу наиболее восприимчивых растений-хозяев нематоды *B. xylophilus* и *B. mucronatus*. При анализе фитосанитарного риска использовались среднестатистические климатические данные. Среднемесячная температура в Воронежской области в 2010 г. составляла 26,4⁰С в июле и 25,5⁰С в августе. Таким образом, можно сделать предположение о том, что массовая гибель сосновых насаждений, наблюдаемая после крайне жаркого лета 2010 г. на территории России, могла быть связана с воздействием нематодо-бактериального комплекса.

Исследования поддержаны грантом РФФИ № 10-04-01644а.

ЛИТЕРАТУРА

- Kulinich O.A., Orlinskii P.D. Distribution of conifer beetles (Scolytidae, Curculionidae, Cerambycidae) and wood nematodes (*Bursaphelenchus* spp.) in European and Asian Russia // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 1998, vol.28, N ½. P. 39-53.
- Kwon Hyeok Ran, Gyung Ja Choi, Yong Ho Choi, Kyoung Soo Jang, Nack-Do Sung, Mun Seong Kang, Yilseong Moon, Seung Kyu Lee and Jin-Cheol Kim. Suppression of pine wilt disease by an antibacterial agent, oxolinic acid // Pest Manag. Sci. 2010, 66, 6. P. 634-639.
- Mamiya Y. Review on the pathogenicity of *Bursaphelenchus mucronatus* // In «Proceedings of International Symposium, Tokyo, 27-28, Oct. 1998 Sustainability of Pine Forests in Relation to Pine Wilt and Decline». Tokyo. 1999. P. 57-64.
- Proenca D.N., R. Francisco, C.V. Santos, A. Lopes, L. Fonseca, I.M.O. Abrantes, P.V. Morais. Diversity of bacteria associated with *Bursaphelenchus xylophilus* and other nematodes isolated from *Pinus pinaster* trees with pine wilt disease. PlosOne, 2010, 5, 12, e15191.
- Wu X.Q., Yuan W.M., Tian X.J., Fan B., Fang X., Ye J.R., Ding X.L. Specific and Functional Diversity of Endophytic Bacteria from Pine Wood Nematode *Bursaphelenchus Xylophilus* with Different Virulence.//Int. J Biol Sci. 2013, 9,1. P. 34-44.
- Zhao B.G. Bacteria carried by the pine wood nematode and their symbiotic relationship with nematode // In: Zhao B.G., Futai K., Sutherland J.R., Takeuchi Y. (eds.), "Pine Wilt Disease", Tokyo. Springer. 2008. P. 264-274.
- Zhao B.G., Lin F., Guo D., Li R.G., Li S.N., Kulinich O., Ryss A. Pathogenic roles the bacteria carried by *Bursaphelenchus mucronatus* // Journal of Nematology. 2009, 41, 1. P. 11-16.

ТЕМПЕРАТУРНЫЙ ПРАЙМИНГ – ОСНОВА ПОВЫШЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ЗАРАЖЕНИЮ ФИТОНЕМАТОДОЙ

Лаврова В.В., Сыроева М.И., Матвеева Е.М.

Федеральное государственное учреждение науки, Институт биологии Карельского научно центра Российской академии наук, ул. Пушкинская, д. 11, Петрозаводск, 185910, Россия; E-mail: VVLavrova@mail.ru

Картофельная цистообразующая нематода (*Globodera rostochiensis* Woll.) относится к наиболее вредоносным и опасным фитопаразитам картофеля. Одним из способов повышения устойчивости растений к заражению является обработка низкими

концентрациями синтетических или природных соединений (например, β -аминобутириловая кислота, бензо-1,2,3-тиодиазол, хитозан), вызывающая в условиях стресса быстрое системное развитие защитных реакций, обеспечивая тем самым защиту всего растения. Предварительная обработка растений, подготавливающая их к последующим стрессовым условиям, называется праймингом (от англ. priming). В настоящее время исследования по защите растений от фитопатогенов направлены на изучение естественных, экологически безопасных способов повышения устойчивости, позволяющих растениям выживать в естественных условиях при воздействии стресс факторов абиотической и биотической природы. Особый интерес могут представлять температурные обработки, поскольку известно, что температура способна изменять иммунный ответ растений на заражение, но молекулярные и физиологические механизмы остаются пока мало изученными. В связи с этим целью исследования было изучение влияния предобработки растений кратковременными ежесуточными снижениями температуры (ДРОП) на физиолого-биохимические показатели картофеля и заражение нематодой.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на мини-клубнях и клубнях элита восприимчивого к *Globodera rostochiensis* Woll. картофеля сорта Невский, приобретенных в ГНУ «Карельская государственная сельскохозяйственная опытная станция Россельхозакадемии».

Мини-клубни проращивали стандартным способом на свету, высаживали в пластиковые сосуды с песком при поливе питательным раствором Кнопа с добавлением микроэлементов (рН 5,5-5,6) и выставляли в камеру искусственного климата при температуре 23°C, фотопериоде (день/ночь) 16/8 ч и освещенности 10 клк. По достижении фазы 3-х листьев часть растений оставляли при 23°C (вариант контроль), а остальные подвергали в течение 6 суток ежесуточным снижениям температуры (с 23 до 5°C) на 2 ч в конце ночного периода (вариант ДРОП). На следующий день после завершения температурных обработок растения заражали нематодой путем внесения цист в прикорневую зону (10 цист/раст.) и выращивали в течение 1,5 месяцев.

Клубни элита проращивали стандартным способом на свету, после чего часть из них оставляли при температуре 23°C (вариант контроль), а остальные подвергали в течение 6 сут ежесуточным снижениям температуры (с 23 до 5°C) на 2 ч (вариант ДРОП). На следующий день после завершения температурных обработок клубни всех вариантов высаживали в почву на опытных участках Агробиологической станции ИБ КарНЦ РАН. Естественный фон заражения почвы нематодой составлял 21 циста/ 100 г почвы.

Зараженность растений нематодой оценивали по численности самок нового поколения, выделенных из песчаной культуры методом Сейнхорста (Seinhorst, 1964). Флуоресценцию хлорофилла изучали с помощью портативного флуориметра с импульсно-модулированным освещением MINI-PAM (Walz, Германия). Содержание пигментов определяли на спектрофотометре СФ-2000 (Спектр, Россия) в спиртовом экстракте при величине оптической плотности 665, 649, 440,5 нм (Бернштейн, Каминский, 1986). Определение содержания и состава жирных кислот общих липидов проводили методом газожидкостной хроматографии (Цыдендамбаев, Верещагин, 1980). Уровень экспрессии генов устойчивости к нематоды *H1* и *Gro1-4* в листьях анализировали методом ПЦР в режиме реального времени.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ заражения растений нематодой в камерах искусственного климата и в полевых условиях показал, что предобработка кратковременными ежесуточными снижениями температуры приводит к 3-кратному снижению количества цист на корнях, что свидетельствует о повышении устойчивости к заражению.

Изучение ряда физиологических показателей позволило установить, что ДРОП-обработка сохраняет ростовые процессы и соотношение биомасс надземных и подземных органов на уровне контроля в условиях заражения, а также способствует поддержанию высокой активности фотосинтетического аппарата. Такой результат, с нашей точки зрения, обусловлен высоким метаболическим статусом растений при действии ДРОП, связанным с повышением уровня гексоз (Марковская и др., 2010), участвующих в качестве сигнальных молекул в развитии защитных реакций при заражении.

Анализ жирнокислотного состава липидов показал повышение содержания полиеновых кислот при действии кратковременных снижений температуры, что, согласно современным исследованиям (Kachroo et al., 2004) способствует активации генов устойчивости и формированию системной приобретенной устойчивости за счет активации салицил-зависимых защитных PR генов.

При изучении молекулярного механизма действия ДРОП на растения было установлено, что кратковременная низкотемпературная обработка повышает уровень экспрессии гена устойчивости *H1* почти в 2 раза. В то же время экспрессия гена *Gro1-4* не изменяется.

Таким образом, обработка картофеля кратковременными снижениями температуры в суточном цикле (ДРОП) на ранних этапах онтогенеза, вызывает повышение устойчивости к заражению нематодой за счет мобилизации защитных функций растительного организма. Это дает основание утверждать, что ДРОП-обработка выполняет роль прайминга для растений и делает их более устойчивыми к последующему заражению фитопаразитом. Согласно одной из гипотез о молекулярном механизме прайминга в основе иммунных откликов у растений картофеля в ответ на заражение нематодой, сгенерированные температурными перепадами (ДРОП-обработкой), лежат структурные изменения (ремоделирование) хроматина, а именно замена гистона H2A на вариацию H2A.Z (Bruce et al., 2007)

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (соглашение № 8050).

ЛИТЕРАТУРА

- Бернштейн И.Я., Каминский Ю.Л. Спектрофотометрический анализ в органической химии / Л.: Химия, 1986. 199 с.
- Марковская Е.Ф., Шерудило Е.Г., Галибина Н.А., Сысоева М.И. Роль углеводов в реакции теплолюбивых растений на кратковременные и длительные низкотемпературные воздействия // Физиол. раст. 2010. Т. 57. № 5. С. 687-694.
- Цыдендамбаев В.Д., Верещагин А.Г. Исследование липидов корня сахарной свеклы в связи с функцией сахаронакопления // Физиология растений. 1980. Т. 27. С. 778-784.
- Seinhorst J.W. Methods for the extraction of *Heterodera* cysts from not previously dried soil samples // Nematologica. 1964. V. 10. P. 87-94.
- Bruce T.J.A, Pickett J.A. Plant defence signaling induced by biotic attacks // Current Opinion in Plant Biology. 2007. V. 10. P. 387–392.
- Kachroo A., Venugopal S.C., Lapchuk L., Falcone D., Hildebrand D., Kachroo P. Oleic acid levels regulated by glycerolipid metabolism modulate defense gene expression in *Arabidopsis* // PNAS. 2004. V. 101. N. 14. P. 5152-5157.

СООБЩЕСТВА ПОЧВЕННЫХ НЕМАТОД ПОД ПРОПАШНЫМИ КУЛЬТУРАМИ И МНОГОЛЕТНИМИ ТРАВАМИ (НА ПРИМЕРЕ ЮЖНОЙ КАРЕЛИИ)

Матвеева Е.М., Сущук А.А., Диева Д.С.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, ул. Пушкинская, д.11, г. Петрозаводск, 185910, Россия, E-mail: matveeva@krc.karelia.ru

Исследована фауна почвенных нематод сельскохозяйственных полей Республики Карелия. Влияние выращиваемой культуры, севооборота и внедрения окультуренных растений на сообщества нематод было оценено на основе нематодрофауны картофельного, морковного, капустного и свеклольного полей из одного агрокомплекса; сеяных лугов с посевами тимофеевки луговой *Phleum pratense* L. Фауна нематод в местах произрастания борщевика Сосновского *Heracleum sosnowskyi* Manden. была проанализирована как пример самопроизвольного установления чужеродного вида в растительном сообществе в отличие от искусственно создаваемых монодоминантных ценозов. В республике Карелия этот вид был интродуцирован в начале 60-х годов как кормовая культура с целью получения силоса для кормления сельскохозяйственных животных. Характеристики сообществ почвенных нематод оценивались на основе эколого-трофического группирования нематод (Yeates et al., 1993), таксономо-трофической классификации (Sohlenius, 2002), распределения таксонов по *s-p* шкале с учетом экологической специализации и предпочтений нематод (Bongers, 1990), функциональных комплексов и вычисления эколого-популяционных индексов (Ferris et al., 2001).

Таксономическое разнообразие и численность нематод в почвах сельскохозяйственных полей значительно варьируют в зависимости от типа агроценоза и выращиваемой культуры. Более высокие значения этих показателей отмечены в почвах лугов с посевами тимофеевки и при интродукции борщевика (27 родов, 1241-5125 экз./100 г почвы). Под пропашными культурами в почве морковного и свеклольного полей обнаружена минимальная численность (250 экз./100 г почвы) и самое низкое разнообразие фауны нематод (16 родов).

Анализ эколого-популяционных индексов сообществ нематод, обитающих в почве под пропашными культурами, показал, что регулярно применяемые агротехнические мероприятия приводят к упрощению структуры сообществ нематод и доминированию в фауне нематод-бактериотрофов, в частности, неспециализированных видов со значениями 1-2 по *s-p*-шкале. На это указывают низкие значения индекса зрелости сообществ *MI* (2,15), индекса пути разложения органического вещества *CI* (14,6), индекса структурирования *SI* (30,3) и высокие значения индекса обогащения *EI* (74,3). Полученные показатели указывают на упрощенную почвенную экосистему, находящуюся в состоянии стресса.

Представители 11-12 родов были общими и составляли постоянную основу фауны нематод для всех исследованных сельскохозяйственных полей. По таксономо-трофической классификации они относятся к нескольким группам: бактериотрофы отр. Rhabditida с *r*-стратегиями (3 рода) и *k*-стратегиями (3 рода), бактериотрофы из группы Adenophorea (1), микотрофы отр. Tylenchida (3) and политрофы из отр. Dorylaimida (2 рода).

Эколого-популяционные индексы сообществ нематод в почвах сеяных лугов и при интродукции растений отличаются от таковых сельскохозяйственных полей с выращиванием пропашных культур. Сообщества нематод характеризуются увеличением значений индексов *MI*, *CI* и снижением индекса *EI*, свидетельствующими в совокупности об отсутствии внесения большого количества органического вещества в экосистему; участии в равной степени бактерий и почвенных грибов в его разложении.

Интродукция чужеродного вида *H. sosnowskyi* на сельскохозяйственные поля и установление его в растительном сообществе (в границах картофельного поля) в течение первых 10 лет не имели негативных последствий для почвенных нематод. По характеристикам сообщества нематод территория, занимая борщевиком, еще имеет сходство с картофельным полем по спектру общих видов, характерных для сельскохозяйственных земель (бактериотрофы из отр. Rhabditida с *r*- и *k*-стратегиями), но отличается более высоким таксономическим разнообразием, в основном за счет появления редких для агроценозов нематод родов *Plectus*, *Anaplectus*, *Prodesmodora*, *Prismatolaimus*, *Metateratocephalus*. Обращает на себя внимание низкие значения индекса структурирования почвенной трофической сети *SI*, показывающего на упрощение и дестабилизацию почвенной экосистемы. Учитывая агрессивность борщевика в отношении других видов растений, необходимо дальнейшее изучение нематологической ситуации в таких ценозах.

Исследования были частично поддержаны Программой фундаментальных исследований ОБН РАН «Биологические ресурсы России: динамика в условиях глобальных климатических и антропогенных воздействий» (№ 01201262102).

ЛИТЕРАТУРА

- Bongers T. The maturity index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition // *Oecologia*. 1990. V. 83. P. 14-19.
- Ferris H., Bongers T., de Goede R. G. M. A framework for soil food web diagnostics: extension of the nematode faunal analysis concept // *Applied Soil Ecology*. 2001. V. 18. P. 13-29.
- Sohlenius B. Influence of clear-cutting and forest age on the nematode fauna in a Swedish pine forest soil // *Applied Soil Ecology*. 2002. V. 10. P. 261-277.
- Yeates G. W., Bongers T., de Goede R. G. M., Freckman D. W. & Georgieva S. S. Feeding habits in soil nematode families and genera: An outline for soil ecologists // *J. of Nematology*. 1993. V. 25. № 3. P. 315-331.

ВЫЖИВАЕМОСТЬ ПАТОТИПА RO1 GLOBODERA ROSTOSCHIENSIS НА ЧАСТИЧНО УСТОЙЧИВЫХ ГИБРИДАХ КАРТОФЕЛЯ

Мироненко Н.В.¹, Рогозина Е.В.², Лиманцева Л.А.¹, Афанасенко О.С.¹

¹ ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений
Россельхозакадемии, Пушкин-Санкт-Петербург, шоссе Подбельского, 3, 196608, Россия;
E-mail: nina2601mir@mail.ru

² ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства
им. Н.И. Вавилова, ул. Большая Морская, 42-44, Санкт-Петербург, 190000, Россия;

ВВЕДЕНИЕ

Фундаментальной проблемой фитопатологии является преодоление паразитом устойчивости растения-хозяина и отбор новых вирулентных рас и патотипов. Целью нашей работы было изучить возможность адаптации золотистой нематоды к клонам межвидовых гибридов картофеля проявивших слабую устойчивость (по шкале И. Я. Понина, 1968). Слабоустойчивые клоны картофеля гибридного происхождения представляют, на наш взгляд, особый интерес для исследования проблемы адаптации патогена, так как существует возможность повторного заражения (пассирования) растения популяцией паразита (Мироненко и др., 2012).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Межвидовые гибриды были получены в ГНУ Всероссийского института растениеводства Россельхозакадемии им. Н. И. Вавилова от скрещиваний дигаметоидных клонов культурного картофеля (восприимчивых к патотипу Ro1 золотистой нематоды) с

образцами южноамериканских диких видов картофеля (Рогозина, 2005). Для изучения механизмов взаимодействия золотистой нематоды с частично устойчивыми клонами межвидовых гибридов картофеля, были выбраны 12 клонов различной генетической природы. Восприимчивым контролем служил сорт Невский.

В качестве исходного инокулюма использовали популяцию цистообразующей нематоды *Globodera rostochiensis* патотип Ro1, выделенную из зараженной почвы в Пушкинском районе Санкт-Петербурга. Первичную инокуляцию гибридов картофеля личинками золотистой картофельной нематоды проводили в лабораторных условиях путем внесения инокулюма (1500 личинок/100 г почвы) в почву, в которой выращивали клубни. Растения выращивали в пластиковых сосудах объемом 500 мл, учет проводили через 2 месяца после инокуляции.

Получение цист золотистой нематоды второй генерации проводили путем повторных заражений растений межвидовых гибридов цистами, собранными с корней растений этих же генотипов. Подсчет числа личинок\яиц на цисту проводили после отмывки и раздавливания отдельных цист на предметном стекле под бинокулярной лупой. Индекс размножения считали как отношение новых цист к числу использованных для инокуляции в каждой генерации цист.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучали влияние процесса пассирования нематоды на 12 предварительно отобранных слабоустойчивых клонов картофеля, на ее репродуктивную способность, которую оценивали по индексу размножения в первой и второй генерации паразита. Индекс размножения в первой генерации (G1) на всех 12 гибридных клонов был значительно ниже (0,07-0,44), чем на восприимчивом сорте Невский (3,4). В результате двух пассажей паразита на 6 гибридных клонов индекс размножения во второй генерации (G2) был равен нулю (на сорте Невский 10,33), т.е. на этих клонов отсутствовало размножение нематоды. Обнаруженные в почве и на корнях этих растений цисты являются, по всей вероятности, старыми. В них наблюдали минимальное среднее количество личинок\яиц на цисту – 18, 16, 3, 22, 9 и 25 у 6 генотипов картофеля, соответственно. Полученные результаты свидетельствуют об «очищающем» эффекте генов устойчивости данных клонов на популяцию нематоды. Иными словами, корневые выделения этих растений стимулируют вылупление личинок из яиц и их выход из цист. Такой же механизм очищения почвы от нематоды описан для клонов диких видов картофеля *Solanum sanctae-rosae* Hawkes, *Solanum sparsipilum* (Bitt.) Juz. et Buk., *Solanum gourlayi* Hawkes, *Solanum acaule* Bitt. и *Solanum oplocense* Hawkes (Turner et al., 2009).

Во второй группе гибридных клонов наблюдали иную картину: во второй генерации индекс размножения был выше нуля (0,5-4,69 по сравнению с 10,33 на Невском). Наполненность цист составила в среднем 27, 38, 23, 38, 57 и 25 личинок\яиц на цисту у 6 генотипов, соответственно. Для сравнения: на корнях растений сорта Невский среднее число личинок на цисту составило 67.

Сравнили характер распределения цист второй генерации, размножившихся на гибридных клонов картофеля второй группы, сорте Невский и в почвенной популяции, использованной для первичного заражения, по наполненности личинками\яйцами. Очевидно, что почвенная популяция отличается разнообразием цист по содержанию в них личинок\яиц. Популяция цист, размножившихся на гибридных клонов, отличается от популяции с восприимчивого сорта большим содержанием мелких цист меньшей наполненности: доля цист с малым содержанием личинок\яиц (до 30) почти в 3 раза превышает долю цист такой же наполненности в популяции с сорта Невский. В то же время, более крупные цисты с содержанием личинок на цисту в количестве 80-100 и 100-160

встречаются среди новых цист второй генерации, образовавшихся на гибридных клонах, с частотой 5% и 1%, а на сорте Невский – 22% и 17%, соответственно.

Такое же явление наблюдали при заражении патотипом Ro2 золотистой нематоды образца 205624 *S. tuberosum* ssp. *andigena* Hawkes, на корнях которого цисты содержали в 2 раза меньше яиц, чем на восприимчивом сорте (Nunziata et al., 2010). Авторы объясняют этот факт супрессирующим влиянием на паразита генов устойчивости картофеля, обуславливающих уровень видовой горизонтальной устойчивости.

Полученные нами результаты показывают, что исходная почвенная популяция *G. rostochiensis* гетерогенна по признакам репродуктивной способности. В процессе пассирования нематоды (2 генерации паразита) на слабо устойчивых гибридах разного происхождения происходит либо гибель личинок после выхода из цист, либо отбор особей с пониженной фитностью (низкий индекс размножения и малая наполненность цист личинками), в зависимости от генотипа гибрида.

Поскольку существует корреляция числа личинок от размера цисты ($r=0,52$), то можно предположить, что в результате 2-х пассажей на слабоустойчивых гибридах произошло снижение инфекционного запаса нематоды. Нами выявлены единичные крупные цисты с количеством личинок 80-160 на одну цисту у гибридов, в родословную которых включены виды *S. doddii* и *S. incamayoense*. На данном этапе исследований можно предположить начало адаптации паразита к слабоустойчивым генотипам картофеля.

Работа поддержана грантом РФФИ № 11-04-01105-а.

ЛИТЕРАТУРА

- Gebhardt C., Valkonen J.P.T. (2001) Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Ann. Rev. Phytopathol.* 39:79–102.
- Nunziata A., Ruggieri V., Greco N., Frusciante L., Barone A. (2010) Genetic diversity within wild potato species (*Solanum* spp.) revealed by AFLP and SCAR markers. *Am. J. Pl. Sciences* 1: 95-103.
- Turner S. J., C. C. Fleming, B. P. Moreland, and T. J.G. Martin (2009) Variation in hatch among pathotypes of the potato cyst nematodes, *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*, in response to potato root diffusate from *Solanum* spp. I. Preliminary assessments to establish optimal testing conditions. *Nematology* 11: 749-756.
- Whitehead A. G. (1991) Selection for virulence in the potato cyst-nematode, *Globodera pallida*. *Ann. appl. Biol.* 118: 395-402.
- Мироненко. Н.В., Л.А. Лиманцева, Е.В. Рогозина. Клоны межвидовых гибридов как тестовая система для изучения взаимодействия картофеля с золотистой нематодой. Тезисы на III Вавиловской международной конференции «Идеи Н.И.Вавилова в современном мире», 6-9 ноября 2012 г., с.101.
- Рогозина Е. В. (2005) Южноамериканские дикорастущие виды картофеля: особенности онтогенеза и перспективы использования в селекции. С.-х. биология 5: С.33-41.
- Понин И.Я. Исходный материал и его использование при выведении сортов картофеля, устойчивых к картофельной нематодой. Канд. дис. Л, 1968.

ПРОЕКТ МНТЦ ПО ИЗУЧЕНИЮ БИОРАЗНООБРАЗИЯ НЕМАТОД РОССИИ КАК ОСНОВА МЕЖДУНАРОДНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ФИТОПАРАЗИТИЧЕСКИХ НЕМАТОД ЕВРАЗИИ

Приданников М.В.^{1,2}, Петелина Г.Г.¹

¹ *Всероссийский НИИ фитопатологии, Московская область, Одинцовский р-н, Большие Вязёмы, ул. Институт, вл. 5, ВНИИФ, 143050, Россия*

² *Центр паразитологии, Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Ленинский пр., 33, Москва, 199071; E-mail: mikhail.pridannikov@yahoo.com*

Изучение фитопаразитических нематод в России имеет большую и интересную историю и связано с такими всемирно известными именами как А.А. Парамонов, И.Н. Филипьев, Е.С. Кирьянова, Е.Л. Кралль, О.З. Метлицкий и многие другие. Нематологические лаборатории были организованы в таких крупных научных центрах как Зоологический институт в Санкт-Петербурге, Центр паразитологии (ранее ГЕЛАН или Институт паразитологии) и Всероссийский институт гельминтологии (ВИГИС) в Москве и другие.

Изучение фитопаразитических нематод во ВНИИ фитопатологии начиналось с самого основания института. С 1955 по 1958 года в Больших Вязёмах, на базе Московской СтаЗР под руководством Н.М. Свешниковой проводилась разработка агротехнических и химических методов подавления численности нематод овощных и зерновых культур. Далее, лаборатория энтомологии, акарологии и нематологии ВНИИФ, которую до 1960 года возглавлял Г.В. Гусев, проводила работы по изучению биологии и вредоносности галловых нематод овощных культур и стеблевой нематоды лука и чеснока. Разрабатывались мероприятия по снижению их вредоносности как химическими и агротехническими средствами, так и биологическими средствами с помощью различных микроорганизмов.

С 1960 по 1969 год лабораторию возглавляла Л.В. Тихонова. В это время во ВНИИФ проводилось изучение вредных фитогельминтов злаковых, бобовых и зернобобовых культур, а так же разрабатывались защитные мероприятия против этих видов нематод (Тихонова, 1964, 1965). Совместно с Л.В. Тихоновой, проблемой фауны фитопаразитических нематод злаковых нематод занималась С.И. Кмузова (Кмузова, 1966) и Н.А. Костюк, которая совместно с сотрудниками Гельминтологической лаборатории АН СССР (ГЕЛАН) начала исследования по изучению распространения и вредоносности пшеничной нематоды *Anguina tritici* (Костюк, 1965). История изучения паразитических нематод во ВНИИ Фитопатологии связана так же с такими именами как З.И. Петрова, Е.И. Кондакова И.Н., Жилиева (Тихонова и др., 1967).

С 1970 года, вплоть до 2000 года изучение паразитических нематод растений во ВНИИФ было приостановлено. Начиная с 2001 года работы по изучению нематод, как фитопатогенов, причиняющих большой ущерб сельскохозяйственному производству были возобновлены на базе лаборатории молекулярной биологии ВНИИФ в сотрудничестве со Службой сельскохозяйственных исследований Министерства сельского хозяйства США (USDA ARS) при поддержке Международного Научно-Технического Центра (МНТЦ). Научная работа с фитонематодами велась по следующим направлениям: поиск биологически активных молекул природного происхождения для защиты растений от фитопаразитических нематод и изучение физиологии нематод с целью поиска уязвимых фаз развития для контроля их численности и вредоносности (Pridannikov *et al.*, 2007).

В настоящее время большое внимание уделяется созданию новых и эффективному использованию уже существующих коллекций различных микроорганизмов, в том числе и патогенных (Захаренко, 2007). Учитывая результаты, полученные в ходе выполнения проекта по изучению нематод, и необходимость дальнейших исследований в 2007 году стартовал

проект по созданию Коллекции Паразитических Нематод Растений на базе Государственной Коллекции Фитопатогенных Организмов ВНИИФ. И здесь огромную поддержку оказал МНТЦ. При его финансировании удалось сформировать научную группу, занимающуюся сбором образцов из различных регионов России, выделением паразитических нематод и пополнением коллекции нематод ВНИИФ. В настоящее время группа преобразована в Лабораторию диагностики патогенных организмов ВНИИФ и оснащена всем необходимым современным оборудованием для проведения морфологических и молекулярных исследований в области нематологии.

При поддержке МНТЦ удалось совершить более 20 полевых выездов и экспедиций для сбора материала почвообитающих растительноядных нематод и микогельминтов. Наиболее обследованными регионами стали Центральный регион России, Северо-Западный, Северный Кавказ, Поволжье и Урал, всего около 20 областей и краев.

Основной целевой группой нематод были выбраны наиболее важные для сельского хозяйства нематоды семейства Heteroderidae (цистообразующие и галловые нематоды). Среди них картофельные цистообразующие нематоды (*Globodera* sp.), комплекс злаковых цистообразующих нематод (*Heterodera avenae*, *H. filipjevi*, *H. latipons*), а так же вредители сои (*H. glycines*), сахарной свеклы (*H. schachtii*), люцерны (*H. medicaginis*), овощных культур (*Meloidogyne* sp.) и др. Отдельное место в исследованиях заняли группа нематоды-вирусоносители (род *Xiphinema*) и целый комплекс мигрирующих эктопаразитических нематод.

Первостепенной задачей, стоящей перед Лабораторией диагностики патогенных организмов, является сбор материала и составление коллекционного фонда постоянных препаратов фиксированных особей нематод. В настоящее время коллекция насчитывает более 600 постоянных слайдов, информация о которых собрана в электронной базе данных. Ведется межколлекционный обмен материалами с другими коллекциями и научными институтами.

Кроме коллекции постоянных препаратов нематод, на базе современных теплиц ВНИИФ организована коллекция живых нематод, культивируемых на растениях-хозяевах. Данная коллекция экономически значимых и потенциально опасных видов нематод позволяет постоянно иметь материал для исследования биологии и физиологии нематод, а так же служит основой создания искусственных инфекционных фонов для изучения устойчивости растений к нематодам и различных веществ в качестве потенциальных нематотоксиков. В настоящее время в коллекции живых нематод насчитывается 14 видов цистообразующих и три вида галловых нематод.

Одно из направлений работы Лаборатории, это разработка и внедрение в практику современных методов диагностики патогенных организмов на основании различий в строении отдельных участков ДНК. Разработаны простые и эффективные наборы для идентификации основных видов цистообразующих и галловых нематод. Ведется разработка методов диагностики мигрирующих эктопаразитических видов.

Лаборатория диагностики патогенных организмов ВНИИ Фитопатологии сотрудничает с такими ведущими научными учреждениями, занимающимися проблемами фитогельминтологии, как Центр паразитологии ИПЭЭ им. А.Н.Северцова РАН, Институт Гельминтологии им. К.И.Скрябина, Зоологический институт РАН и многими сельскохозяйственными институтами и фирмами. Имея длительные научные связи с ведущими научными центрами в Европе и США, удалось организовать обучение молодых сотрудников современным методам молекулярной идентификации различных видов паразитических организмов, в том числе и нематод. Кроме того молодые нематологи обмениваются своими достижениями и делятся опытом научной работы в ходе проведения

различных встреч, рабочих совещаний, и конференций, организуемых на базе ВНИИФ и в других научных учреждениях России и за рубежом.

В настоящий момент Лаборатория диагностики патогенных организмов ВНИИФ оказывает помощь сельскохозяйственным предприятиям различных форм собственности в определении видового состава нематодой фауны в Европейской части России. Создаются карты с ареалами распространения отдельных видов нематод на основе актуальных на текущий момент данных, даются рекомендации по снижению вредоносности этих видов в полевых условиях.

ЛИТЕРАТУРА

- Захаренко, В.А. (2007) Повысить отдачу от использования коллекций микроорганизмов и фитофагов. Защита и карантин растений, № 10, с.4-7.
- Кмузова, С.И. (1966) Сравнительно-экологический анализ фауны фитонематод зерновых культур в различных зонах Башкирской АССР. Автореферат к.б.н., 16 л.
- Костюк, Н.А. (1965) Морфо-физиологические закономерности онтогенеза пшеничной нематоды *Anguina tritici* (Steinbuch, 1799) Chitwood, 1935. Автореферат к.б.н., Москва, Всесоюзный научно-исследовательский институт фитопатологии и Гельминтологическая лаборатория АН СССР.
- Тихонова, Л.В. (1964) Изучение вредных фитогельминтов хлебных злаков, зернобобовых, бобовых культур и разработка защитных мероприятий. Отчет по тематике ВНИИФ, Тема 3, 77 л. (6 л. илл.)
- Тихонова, Л.В. (1965) Изучение вредных фитогельминтов хлебных злаков и разработка защитных мероприятий. Отчет по тематике ВНИИФ, Тема 3, 80 л. (3 л. илл.)
- Тихонова, Л.В. (1966) Изучение вредных фитогельминтов хлебных злаков и разработка защитных мероприятий. Отчет по тематике ВНИИФ, Тема 3, 70 л.
- Pridannikov, M.V., Petelina, G.G., Palchuk, M.V., Masler, E.P. and Dzhavakhiya, V.G. (2007) Influence of *Globodera rostochiensis* cyst components on *G. rostochiensis* egg hatching in vitro. *Nematology*, Vol. 9(6), 837-844.

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ И ХОЗЯЙСТВЕННОЙ АКТИВНОСТИ ГРИБОВ И БАКТЕРИЙ - АНТАГОНИСТОВ И ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ

Романенко Н.Д., Перевертин К.А., Метлицкая К.В., Заец В.Г., Таболин С.Б., Попова Е.Н.,
Попов И.О., Петруня И.В.

Центр паразитологии Института проблем экологии и эволюции РАН, Москва, Ленинский
проспект 33, 117071, Россия; E-mail: cenologypathlab@mail.ru

В период с 2004 по 2011 годы в условиях лабораторных, вегетационных и полевых экспериментов с целью оценки биологической и хозяйственной эффективности были исследованы штаммы антагонистов: грибов (*Trichoderma viride*, штаммы R и MS-10) и 9 различных штаммов бактерий родов *Pseudomonas* и *Bacillus*, а также 1 штамм хищного гриба *Arthrobotrys oligospora*. По данным ряда отечественных и зарубежных исследователей (Борисов, 1999; Stirling, 1991; Tian et al., 2007) отдельные штаммы этих грибов и бактерий способны вызывать гибель и значительное снижение численности фитопаразитических нематод, возбудителей грибных и вирусных инфекций, включая грибы, вызывающие корневые гнили, и оомицетов - возбудителей трахиомикозных увяданий, а также комплекс вирусов непо- и тобра- групп, переносимых нематодами (Романенко и др., 2008а).

При проведении вегетационных и полевых опытов на землянике садовой, черной смородине и картофеле против комплекса вредных организмов (нематод, клещей, вирусов, грибов и оомицетов - возбудителей корневых и трахиомикозных гнилей и др.) впервые в РФ

были выделены штаммы бактерий из родов *Pseudomonas* и *Bacillus*, обладающие не только фунгицидным и бактерицидным, но нематодцидным и акарицидным действием. Кроме того, отмечено их высокое стимулирующее действие на вегетативную активность тест-растений - усообразование земляники, побегообразование и рост побегов черной смородины, повышение урожайности картофеля. Впервые в РФ были выделены штаммы бактерий-антагонистов, обладающие полифункциональной активностью: 4 штамма *B. thuringiensis*, 2 штамма *B. polymyxa*, 2 штамма *Pseudomonas fluorescens* и 1 штамм *P. aureofaciens*. Наибольшая нематодцидная активность проявлялась у штаммов *B. thuringiensis* – продуцентов термостабильного бета - экзотоксина, которые вызывали массовую гибель и резкое снижение численности нематод в ризосфере культурных растений, в том числе нематод – переносчиков опасных непо-вирусов AMV и RRSV плодовых и ягодных культур (*L. elongatus*, *X. diversicaudatum*) и тобра-вирусов TRV на картофеле (*Trichodorus sp.*). При использовании биоактивных штаммов грибов и бактерий - антагонистов на картофеле наблюдали резкое снижение численности комплекса патогенов (грибных инфекций, корневых нематод и вирусных инфекций, в том числе переносимых нематодами, включая TRV, TBRV и др.). При этом также наблюдали повышение побегообразовательной способности, роста растений и урожайности. Высокой полифункциональной активностью на садовых культурах обладал штамм *P. fluorescens* — AP-33. Разработан высокотехнологичный способ наращивания его биомассы и использования его на ряде с.х. культур (Романенко, и др., 1998; Романенко и др., 2008а). Высокая нематодцидная активность (биологическая эффективность) варьировала от 67 до 100% против ряда опасных видов, в том числе и карантинного объекта - картофельной нематоды (*Globodera rostochiensis*). Была получена высокая биологическая эффективность (79-83 %) при использовании препарата Алирин-Б, (СП), полученного на основе ряда штаммов *Bacillus subtilis*, а также при использовании 1 % и 2 %-ных водных суспензий смесей штаммов бактерий: *Enterobacter spp.*, *B. thuringiensis*-132, *B. subtilis*-В-2, *P. fluorescens*-AP-33, *B. subtilis* - штаммы В-1, В-2, *P. aureofaciens* - штамм -А-2. Высокая фунгицидная активность отмечена у препарата Алирин-Б, (СП), а также при использовании 1 % водных суспензий смесей штаммов бактерий-антагонистов: *B. subtilis*-В-2 + *P. fluorescens* - AP-33, *Enterobacter sp.* + *B. thuringiensis*-132. Высокая антивирусная активность отмечена при использовании 1 % водной суспензии смеси штаммов *B. putida* и *B. thuringiensis*-132.

Таким образом, в последние семь лет нами установлена высокая полифункциональная активность для 12 штаммов грибов и бактерий, а также разработана технология их культивирования и наращивания их биомассы для малотоннажного производства (Романенко и др., 2004, Романенко и др. 2008 а, б). Установлено, что ряд испытанных биоагентов и их штаммов, а также препаратов на их основе и их смеси обладают высокой не только биологической, но и хозяйственной эффективностью. Установлена их высокая рост - стимулирующая активность и положительное влияние на приживаемость и укоренение черенков чёрной смородины (до 100%). В условиях лабораторного опыта было установлено, что комплексная обработка биоагентами *Pseudomonas fluorescens* AP-33 и *Bacillus thuringiensis* - 132 приводила к резкому снижению заражённости черенков чёрной смородины возбудителями корневой гнили и экто- и эндо- паразитическими корневыми нематодами (биологическая эффективность свыше 80%). Выявленные высокоактивные штаммы значительно повышали вегетативную активность тест – растений ягодных культур и урожая клубней картофеля (в 1,3 - 6,4 раз) (Романенко, и др. 2008 а, б).

В целом, приведенные данные показывают высокую эффективность использования различных биологических средств и способов защиты ягодных культур и картофеля против комплекса наиболее опасных вредных организмов (нематод, грибов, оомицетов, вирусов, клещей и других вредных организмов). Продемонстрировано, что комплекс выявленных

полифункциональных штаммов грибов и бактерий - антагонистов различного спектра действия, их смеси и полученные биопрепараты на их основе (Алирин-Б СП, Планриз и др.) не только эффективно подавляют комплекс наиболее опасных вредных организмов, но и заметно увеличивают продуктивность ягодных культур и урожай картофеля. В результате проведенных лабораторных и полевых опытов выявлены следующие штаммы бактерий и грибов- антагонистов: 9 штаммов бактерий (4 штамма *B. thuringiensis*, 2 штамма *B. polymyxa*, 2 штамма *Pseudomonas fluorescens*, 1 штамм *P. aureofaciens*); 2 штамма гриба - антагониста *Trichoderma viride* и 1 штамм хищного гриба - *Arthrobotrys oligospora*. Биологическая эффективность выделенных штаммов варьировала от 60 до 93 % при высоком уровне хозяйственной эффективности. Они в 1,3-6,4 раза повышали вегетативную активность растений-хозяев, их приживаемость и укореняемость после предпосадочной обработки по сравнению с необработанным контролем. Впервые в результате полевых, лабораторных и вегетационных исследований установлена высокая полифункциональная (нематцидная, фунгицидная и антивирусная) активность штаммов грибов и бактерий, биологическая эффективность которых варьировала от 80 до 100 %.

ЛИТЕРАТУРА

- Борисов Б.А. Экологически безопасная защита тепличных растений от галловых нематод. Аграрная Россия. Научно-производственный бюллетень, 1999. № 3. С. 35-42.
- Романенко Н.Д., Рябченко Н.Ф., и др. Основные достижения в изучении комплекса фитопаразитов (нематоды – вирусы – грибы - бактерии) и проблемы их биоконтроля в фитоценозах России. В кн.: Теоретические и прикладные проблемы гельминтологии. М. 1998, С. 198-209
- Романенко Н.Д., Стародубцев В.В., Авдиенко И.Д., Корсак И.В. К вопросу изучения нематцидной активности бактерий антагонистов и их механизма действия. В. кн.: Успехи общей паразитологии. М. Наука. 2004. С. 318-338.
- Романенко Н.Д., Заец В.Г., Козырева Н.И., Попов И.О., Таболин С.Б. Биологические средства защиты растений в борьбе с фитопаразитическими нематодами, другими патогенами и перспективы их использования в XXI-ом веке. Вестник Российского университета дружбы народов. М. 2008(а), № 2.
- Романенко Н.Д. и др. Перспективы использования бактерий – антагонистов против фитопатогенных видов нематод, вирусов и грибов. Ж. Агро XXI. М. 2008 (b), №1-3. С. 23-26.
- Stirling G.R. Biological control of plant parasitic nematodes. 1991, 304 pp.
- Tian B., Yang J., Zhang K.Q. Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects. FEMS Microbiol. Ecol. 2007; 61, P. 197-213.

К ВОПРОСУ ВЫЯВЛЕНИЯ КОМПЛЕКСНЫХ (СМЕШАННЫХ) ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ И ОЦЕНКА ИХ ВЛИЯНИЯ НА УРОЖАЙ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ.

Романенко Н.Д.¹, Перевертин К.А.¹, Попов И.О.¹, Попова Е.Н.², Петруня И.В.¹

¹ Центр паразитологии Института проблем экологии и эволюции РАН, Москва, Ленинский проспект 33, 117071, Россия; E-mail: cenologypathlab@mail.ru

² Институт географии РАН, 119017 Москва, Старомонетный переулок, д. 29

Выявление комплекса вирусных инфекций, переносимых нематодами, невозможно без выделения из почвы нематод - переносчиков непо- и тобра- групп вирусов (1-3).. С целью оценки эффективности извлечения нематод-вирусоносителей и закладки лабораторных, вегетационных и полевых опытов оценивали эффективность двух методов извлечения нематод-вирусоносителей из почвы: вороночный – стандартный метод, широко

используемый в РФ, и метод Флегга - специально применяемый в нематологической практике за рубежом для извлечения нематод-вирусоносителей - лонгидорид и триходорид. В качестве материала для исследований использовали нематод-вирусоносителей семейства Longidoridae (лонгидорид) из ранее выявленного очага в совхозе 8 марта Тульской области, где был выявлен комплекс нематод-лонгидорид - *Longidorus elongatus*, *Xiphinema brevicolle* и *Xiphinema sp.* Два первых вида являются переносчиками полиэдрических неповирусов – мозаики резухи (AMV) и вируса кольцевой пятнистости малины (RRSV). Суммарные результаты оценки эффективности извлечения нематод-вирусоносителей семейства Longidoridae двумя методами представлены на рис. 1.

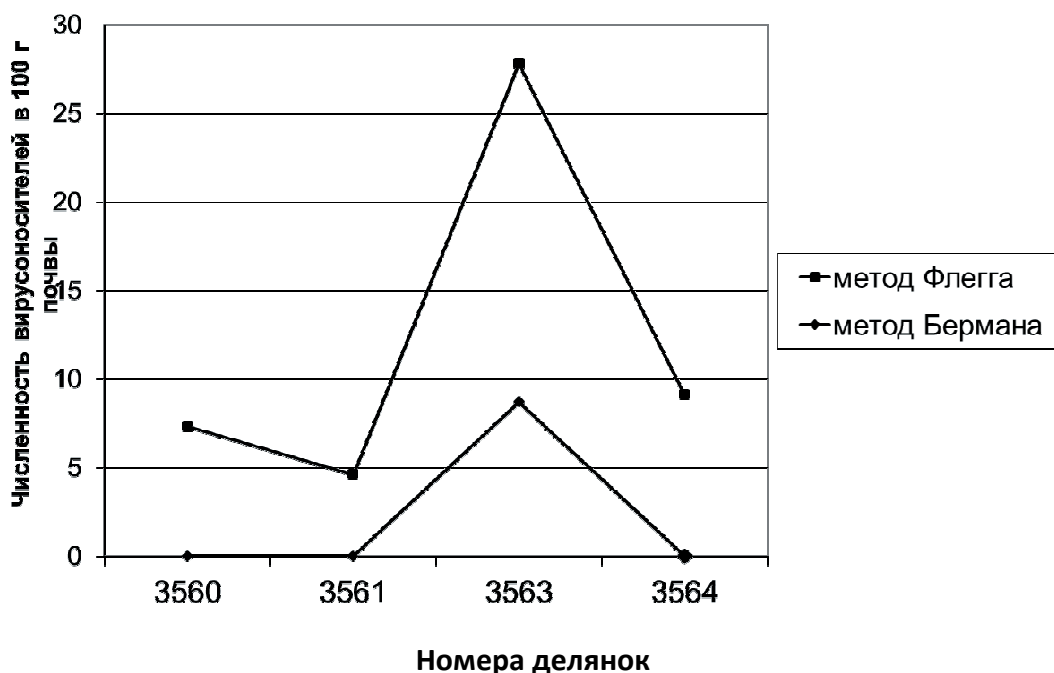


Рис. 1. Средняя численность нематод семейства Longidoridae -*Longidorus elongatus*, *Xiphinema brevicolle* и *Xiphinema sp.* (лонгидорид), выделенных двумя методами из одних и тех же смешанных образцов, отобранных в очаге лонгидорид в совхозе 8 марта Тульской области.

Из представленного графика следует, что количество нематод-лонгидорид, выделенных с помощью вороночного метода, значительно ниже (в несколько раз), чем при выделении их из тех же образцов по методу Флегга. Присутствие единичных экземпляров лонгидорид в почвенных образцах (до 10 особей в 100 г почвы) вороночным методом обнаружить не удастся, в то время как методом Флегга нематоды - вирусоносители (лонгидориды) выделяются из почвенных образцов даже при наличии единичных особей. Таким образом, при использовании вороночного метода существенно искажается объективная картина как количественного, так и качественного (видового) состава нематод-лонгидорид и соответственно переносимых ими неповирусов (1). Ранее было установлено, что не все виды лонгидорид являются переносчиками (2). Переносят вирусы лишь определенные виды нематод-лонгидорид. Нематоды-вирусоносители в большинстве своем являются узко специализированными (на генетическом уровне) векторами строго определенных видов вирусов. Выявленные нами различия в выделении нематод-вирусоносителей указывают на необходимость их извлечения методом Флегга и на неэффективность вороночного метода.

Вторым важным результатом наших исследований является оценка вредоносности, как отдельных видов вирусов, так и их комплексов – смешанных типов инфекции, и их влияние на урожай клубней картофеля. При фитопаразитологическом (нематологическом и вирусологическом) обследовании в Волгоградской области в ООО «Новоанненский» были отобраны почвенные и растительные образцы в очагах угнетенного роста культур томатов и картофеля в условиях открытого грунта с целью выявления карантинного объекта – картофельной цистообразующей нематоды – *Globodera rostochiensis*, нематод-вирусоносителей, корневых экто- и эндо- паразитических нематод и вирусов непотобра- групп. В результате проведенных анализов установлено наличие цист картофельной нематоды (карантинного объекта) в почве из-под картофеля - 98 цист на 100 мл почвы и 133 цисты на 100 мл почвы под томатами (в среднем из пяти повторностей).

Были проведены выделение РНК, обратная транскрипция и ПЦР-анализ наличия кДНК вирусов поти- и потекс-групп в образцах растений картофеля и томата с участка открытого грунта (ООО «Новоанненский» Волгоградской области), демонстрирующих симптомы нитчатости листовых пластинок. Праймеры к группе потивирусов комплементарны участку гена белка оболочки, к группе потексвирусов - участку гена TGBp1. Праймеры универсальные, синтезированные специально.

Последовательности используемых праймеров:

потигруппа:

Ad1 (5'-GGCAACCAGTACAAACG-3');

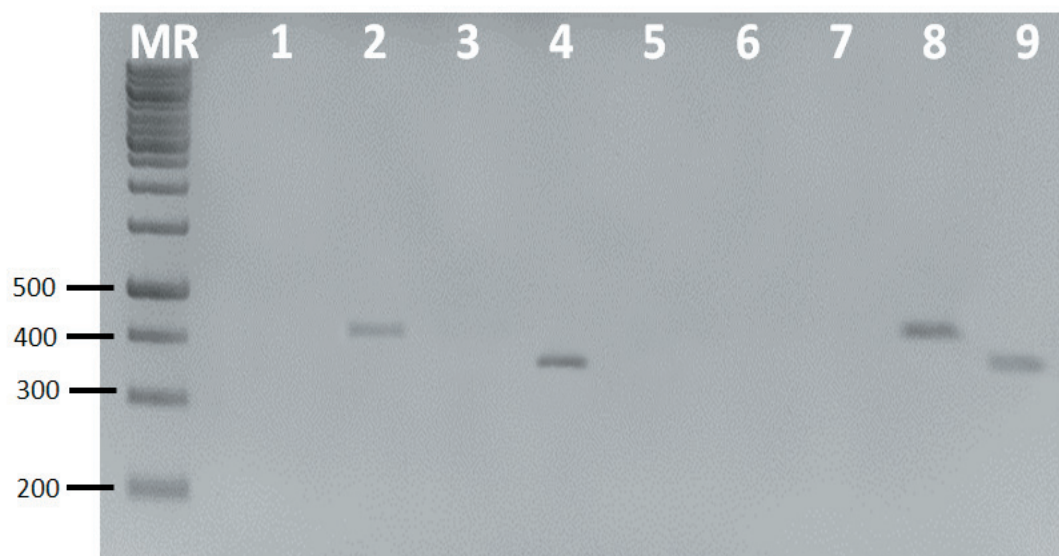
Ad2 (5'-TGGGAGATGAAAACCT-3').

потексгруппа:

P1 (5'-TAAAGAACAAGAGAATT-3');

P2 (5'-TAACAGGAGATAGCAGA-3').

Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР проводилось в 1,5%-ом агарозном геле. Фореграмма приведена на рис 2. Наблюдается присутствие продуктов амплификации участков кДНК обеих групп вирусов в образцах растений томата и их отсутствие в образцах растений картофеля, из чего можно сделать вывод о наличии вирусной инфекции в образцах томата и ее отсутствии в образцах картофеля.



MR – маркеры молекулярного веса (п.н.); Трек № 1 – праймеры к потекс-группе вирусов, картофель; Трек № 2 – праймеры к потекс-группе вирусов, томат; Трек № 3 – праймеры к поти-группе, картофель; Трек № 4 – праймеры к поти-группе, томат; Треки № 5-6 – отрицательный контроль; Трек № 7 – пустой слот; Трек № 8 – положительный контроль к потекс-группе вирусов; Трек № 9 – положительный контроль к поти-группе вирусов.

Рис. 2. Фореграмма продуктов ПЦР кДНК из образцов вегетативных органов томата и картофеля с участков ООО «Новоанненский» Волгоградской области.

В условиях лабораторно-вегетационного опыта оценивали зависимость урожая клубней картофеля от состава вирусных инфекций. На лабораторном участке (опытное поле) ЦПИПЭЭРАН были высажены клубни картофеля как с моноинфекцией – вирусы X, M, S, так и со смешанным типом инфекции - комплексы вирусов – X+S; X+S+M; X+S+M+L в сравнении с безвирусным контролем – K. В начале вегетации проводили вирусологический анализ, подтверждающий присутствие как моноинфекции, так и комплексной (смешанной) инфекции. В конце вегетации проводили учеты урожая клубней картофеля по вариантам опыта. Усредненные результаты проведенных исследований представлены на графике (рис. 3).

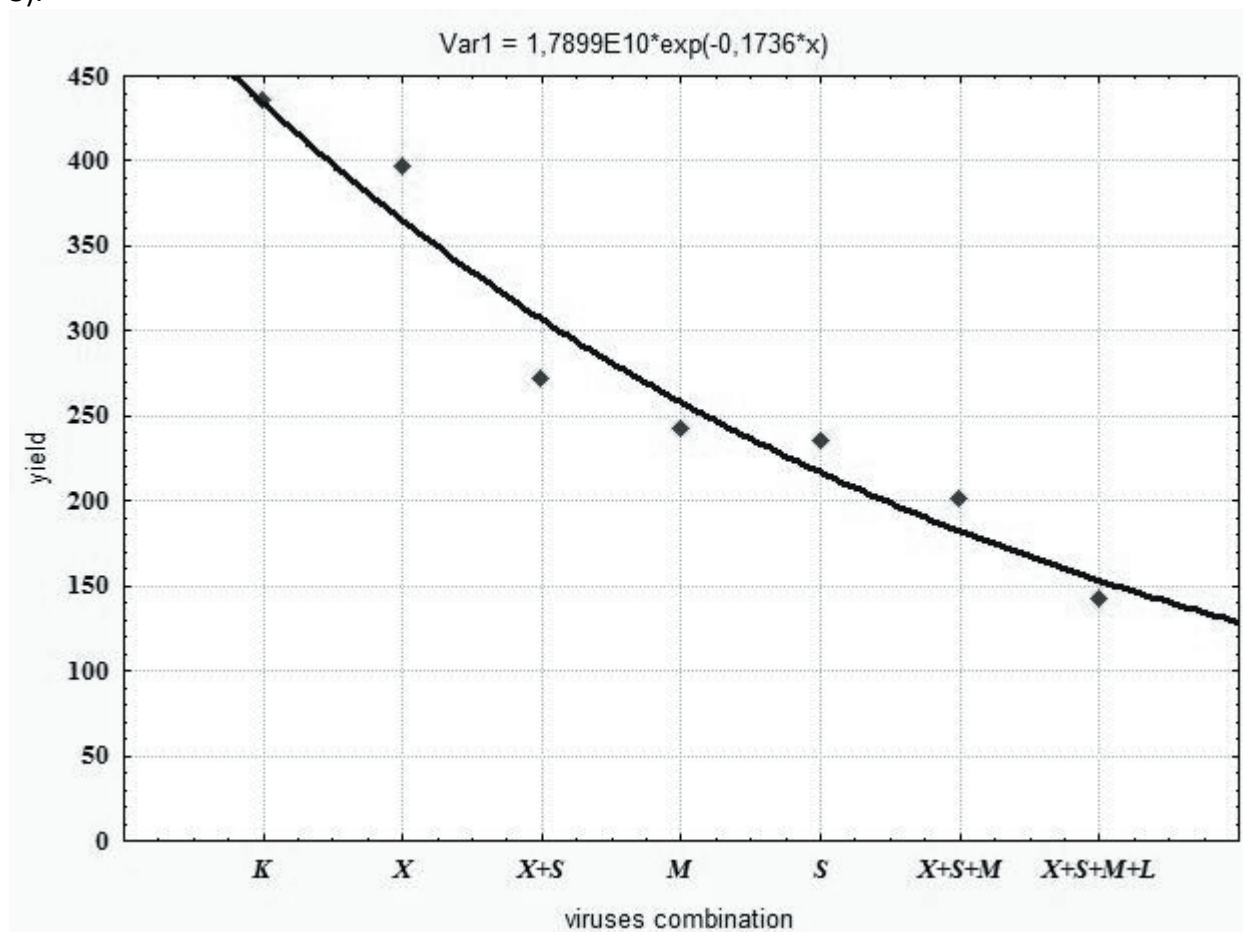


Рис. 3. Зависимость урожая картофеля от состава вирусных инфекций, выявленных в клубнях (моноинфекция – вирусы X, M, S; смешанный тип инфекции - комплексы вирусов – X+S, X+S+M, X+S+M+L в сравнении с безвирусным контролем - K)

Из выше представленного графика видно, что урожай клубней картофеля резко снижается (в 2,5 - 3 раза) в случае смешанной вирусной инфекции при наличии 3 и более компонентов (X+S+M, X+S+M+L) по сравнению с безвирусным контролем. В условиях моноинфекции вирусы X, M и S также снижали урожай клубней картофеля по сравнению с контролем (в 1,5 – 2 раза), причем по сравнению с вирусом X вирусы M и S вызывали более значительное снижение урожая клубней картофеля по сравнению с безвирусным контролем (рис. 3).

Полученные данные свидетельствуют как о неблагоприятной фитосанитарной обстановке в ООО «Новоанненский» Волгоградской области (наличие карантинной картофельной цистообразующей нематоды, заражение картофеля и томатов вирусами X и Y). Кроме того, в результате полевого мелкоделяночного опыта было продемонстрировано

негативное влияние на урожай клубней картофеля группы картофельных вирусов, как в случае моноинфекции (X, M, S), так и в случае комплексной инфекции смешанного типа (X+S, X+S+M, X+S+M+L). Показано, что при моноинфекции урожай картофеля снижается в 1,5-2 раза, а при комплексной вирусной инфекции в 2-3 раза по сравнению с безвирусными растениями. Кроме того, показана методическая нецелесообразность и необъективность оценки зараженности почвы нематодами-вирусоносителями при использовании вороночного метода Бермана, который тем не менее все ещё широко используется в российских научно-исследовательских учреждениях и карантинной службе РФ.

ЛИТЕРАТУРА

- Метлицкий О.З, Романенко Н.Д. Сравнительная эффективность трех методов извлечения нематод из почвы. Сборник научных трудов НИЗИСНП. т. 4, М. 1972.
- Романенко Н.Д. Фитогельминты - вирусоносители семейства Longidoridae. Монография, М. Издат. Наука, 1993, 284 с.
- Романенко Н.Д., Попова Е.Н., Попов И.О. Изучение биоэкологии и вредоносности *Globodera rostochiensis* и разработка современных методов ее контроля в России. Тезисы Шестого международного симпозиума Российского общества нематологов М., 13-17.06.05. М. 2005. 64-65.

О ПРИЛОЖИМОСТИ КОНЦЕПЦИИ ТРАНСМИССИВНЫХ ИНФЕКЦИЙ К НЕМАТОДОЗАМ РАСТЕНИЙ И ЖИВОТНЫХ

Рысс А.Ю.

Зоологический институт РАН, Университетская набережная, 1, Санкт-Петербург, 199034, Россия

В концепции трансмиссивных инфекций (ТИ, природной очаговости) по Е.Н. Павловскому главным признаком этого явления служит возбудитель, одинаково хорошо размножающийся в организмах филогенетически отделенных хозяев, а также наличие переносчика возбудителя, природного очага и случайного для экосистемы хозяина-реципиента, человека или организма хозяйственного значения. Концепция хорошо разработана на паразитических членистоногих, клещах и насекомых. К нематодозам растений и животных приложимо понятие трансмиссивных инфекций. В новейшей нематологии накапливаются сведения о ключевой роли симбионтов паразитических нематод в вредоносности комплексных нематодно-бактериально-грибковых заболеваний растений и насекомых. Возбудителями ТИ могут служить как сами нематоды, так и их симбионты – бактерии и грибы. Переносчиками возбудителей служат как нематоды, так и насекомые, переносящие нематод. Резервуарными хозяевами могут служить млекопитающие, членистоногие, сами нематоды. Возбудителем ТИ в случае вилта растений может быть комплекс патогенов включающих как киллеров растения, так и впоследствии разрушителей мертвой органики. Это нематодно-бактериально-грибковые инфекции, вероятно, наследие комплекса разрушителей мертвой органики в детритных пищевых сетях. В рамках концепции ТИ рассматриваются нематодозы с участием сем. Filariidae, Steinerneematidae, Aphelenchoididae.

НЕМАТОДЫ АНТАРКТИДЫ

Рысс А.Ю.,¹ Андреев М.П.,² Курбатова Л.Е.²

¹ Зоологический институт РАН, Университетская наб., 1, С-Петербург, 199034, Россия;
E-mail: nema@zin.ru

² Ботанический институт РАН, улица профессора Попова 2, С-Петербург, 197376, Россия;

В 2007 – 2012 гг. исследованы пробы почв, мхов и лишайников Антарктиды из 8 районов сбора (15 станций) по периметру континента. Нематоды обнаружены в 180 пробах, 85% проб из мхов и в 30% проб из лишайников, что обусловлено большей гидрофильностью мхов и обитанием нематод в водной пленке. Для коллекции ЗИН идентифицировано 58 видов Nematoda + 3 вида Tardigrada. Обнаружены нематоды семейств Plectidae, Quitsinematidae, Monhysteridae, Aphelenchoididae, Aphelenchidae, Panagrolaimidae, Cephalobidae (мхи и лишайники, доминанты Plectidae, Cephalobidae). В пробах морского грунта идентифицированы нематоды семейств Axonolaimidae, Comesomatidae, Leptosomatidae, Oncholaimidae, Desmodoridae, Anticomidae, Enoplidae.

Наблюдается обеднение фауны по круговой оси (по часовой стрелке) удаления от Южных Шетландских островов. Выявлено 3 стадии сукцессии наземных нематодных сообществ Антарктиды. 1) политрофы отр. Plectida питающихся мелкими микроорганизмами и детритом (самые бедные каменистые субстраты с накипными лишайниками), 2) в микростациях с листоватыми пластинчатыми лишайниками добавляются олиготрофы (омниворы) отр. Dorylaimida, питающиеся крупными организмами – водорослями, тканями мхов и беспозвоночными; 3) на третьей стадии сукцессии в богатых органикой грунтах и кустистых лишайниках и зеленых мхах, к нематодам стадий 1 и 2 добавляются нематоды с дифференцированной трофикой отр. Rhabditida (включая Tylenchina) и Monhysterida: микотрофы, бактериотрофы и фитотрофы. Из-за слабой трофической специализации нематод отр. Rhabditida и Monhysterida должны получить высокие MI сообществ Антарктиды. Составлен веб-атлас оцифрованной (3D, JPEG и GIF Animated) коллекции антарктических нематод ЗИН РАН. Поддержка: ФЦП «Мировой океан», проект № 4 «Определение состояния Антарктических экосистем, оценка окружающей среды в районе работ Российской Антарктической экспедиции».

ИСТОРИЧЕСКИЕ ЭТАПЫ ИЗУЧЕНИЯ НЕМАТОД В РОССИИ НА ПРИМЕРЕ КОЛЛЕКЦИИ ЗООЛОГИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА РАН

Рысс А.Ю.

Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, Россия; E-mail: nema@zin.ru

Историю нематологии в России можно проследить по Коллекции нематод Зоологического института РАН (ЗИН), с поэтапными изменениями целей и состава единиц хранения. Этапы включают 1) создание (И.Н. Филипьев 1912-1933) первой в России систематической коллекции препаратов и влажных фиксаций, справочной коллекции фитопаразитических и энтомопаразитических нематод; разработка И.Н. Филипьевым общей классификации нематод, определителей патогенных нематод и сводок фауны; 2) развитие системы академических центров в странах бывш. СССР с коллекциями нематод и лабораториями для фундаментальных исследований по морфологии, таксономии, биогеографии, экологии и эмбриологии, также обучения специалистов по биоразнообразию, защите растений и биоконтролю сорняков и вредителей растений (1930е-1980-е); 3) технологическая революция (с 1990х): новые объекты коллекций и инструменты

исследований; глобальный мониторинг биоразнообразия на основе e-технологий, генные библиотеки вирулентности и резистентности: цифровые, молекулярные, живые коллекции, для решения фундаментальных задач (филогения, сопряженная эволюция, паразит-хозяинные взаимоотношения, фитоиммунитет, патогенез, эндемичные трансмиссивные инфекции) и прикладных разработок (выведение устойчивых сортов, биопрепаратов, использование нематод в качестве живых моделей генетических и фармакологических исследований, и биоиндикаторов экомониторинга). Сейчас актуально создание глобальной сети виртуальных коллекций 3D изображений. На каждом этапе внедрялись новые методы и качественно обогащался состав коллекций, как инструментария исследований, завершался этап важными обобщениями и прикладными разработками. Результаты исследований коллекционных материалов ЗИН и дочерних региональных коллекций опубликованы в сериях книг «Фауны» и «Определителей по фауне», статьях в ведущих журналах. В связи с развитием международных исследований по сохранению глобального биоразнообразия и мониторинга окружающей среды роль коллекции ЗИН: образовательная, справочная, фундаментальная – возрастает, как части глобальной коллекционной сети.

НУКЛЕОТИДНЫЕ РАЗЛИЧИЯ ПО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМ *Coxb* mtDNA МЕЖДУ ВИДАМИ РОДА *TRICHINELLA* ИЗ РОССИЙСКИХ АРКТИЧЕСКИХ РЕГИОНОВ

Спиридонов С.Э.¹, Одоевская И.М.^{1,2}, Букина Л.А.³, Хилюта Н.В.²

¹ Центр паразитологии, Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Ленинский пр., 33, Москва, 199071; E-mail: s_e_spiridonov@rambler.ru

² Всероссийский Институт гельминтологии им. К.И. Скрябина, Москва

³ Вятская государственная сельскохозяйственная академия, Киров.

Таксономический состав нематод рода *Trichinella* в российских арктических регионах изучен значительно менее детально, чем в сходных областях Северной Америки. Исследования в Гренландии и на арктических побережьях Канады и Аляски выявили высокую экстенсивность распространения трихинелл, и присутствие нескольких, четко отличающихся друг от друга по нуклеотидным последовательностям участков ДНК форм, представляющих, скорее всего, обособленные биологические виды. В соответствии с современными представлениями, в роде *Trichinella* Railliet, 1895 насчитывается не менее 12 видов (Pozio et al., 2009). Впрочем, некоторые виды, выявленные по результатам филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей, так и остаются неописанными в морфологическом отношении и обозначаются как отдельные «генотипы» (Т6, Т12 и др.). Особый интерес представляет разграничение двух обычных в Арктике видов: *T. nativa* и *Trichinella* sp. Т6, встречающихся симпатрически в различных участках Арктики (Dunams-Morel et al., 2012)

В нашем распоряжении оказались пробы личинок трихинелл, полученные фильтрованием переваренной ткани лабораторных животных, на которых культивировались выделенные в природе штаммы. Сбор первичного материала проводили в полевых условиях, на территории различных административных единиц Российской Федерации: Чукотки, Саха-Якутии, Кировской и Архангельской областей. Пробы состояли из мышечной ткани животных, добытых местными охотниками, или погибших от неизвестных причин. Пробы мышечной ткани были получены от белого медведя, дикого песца, ездовой собаки, нерпы, бурого медведя, а также от песцов клеточного содержания и одичавшей кошки, отстрелянной работниками зверофермы (клеточное содержание песцов) в ходе санитарных мероприятий.

Выделение ДНК проводили с помощью колонок Wizard® SV Genomic DNA Purification System по протоколу фирмы «Promega». Амплификацию последовательности *Coxb* митохондриальной ДНК проводили с использованием праймеров Tricob F1 CAA TCC ATT AGG TAC ACA CTC AC и Tricob R3 TAA GTA AGA TTT CAA TGG CG (Rosenthal *et al.* 2008). Проводили прямое секвенирование с праймерами, использовавшимися для первичной ПЦР. Для получения полной последовательности, нуклеотидные данные, полученные с каждым из праймеров (прямым и обратным) собирали с помощью программы Chromas 1.45 и обычного текстового редактора. С помощью программы BLAST проводили поиск сходных последовательностей в ГенБанке NCBI (Altschul *et al.*, 1990). Собственные данные и депонированные последовательности использовали для получения выравниваний в программе Clustal X, после чего с помощью программы GeneDoc (Nicholas, 1999) обрезали не совпадающие по длинам участки «на флангах» и получали, в результате, прямоугольную матрицу нуклеотидных данных. Данные анализировали в программах PAUP 4b10 (Swofford, 1998) и MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011).

Результаты молекулярно-филогенетического анализа показали, что большинство исследованных нами штаммов трихинелл из российских арктических и субарктических территорий попадают в единый кластер форм вместе с видом *T. nativa* и неописанным видом *Trichinella* sp. Т6. При этом, в пределах этой группы наблюдаются определенные нуклеотидные различия (Таблица 1). Если по исследованному участку *Coxb* митохондриальной ДНК канадские и гренландские штаммы трихинелл *T. nativa* и *Trichinella* sp. Т6 отличаются всего на один нуклеотид или не отличаются вовсе, то относящиеся к этому же комплексу штаммы с Российского Севера показывают значительно более заметную дистанцию от северо-американских штаммов. Так трихинеллы, выделенные из ездовой собаки на Чукотке отличались от канадских и гренландских штаммов на 2-3 нуклеотида. При этом этот штамм отличался на 9 нуклеотидов от штамма трихинелл, выделенного от белого медведя на севере Саха-Якутии, и на такое же количество нуклеотидов от трихинелл, полученных от куницы в Кировской области и от нерпы на Чукотке. При этом последовательность трихинелл от куницы в Кировской области отличалась на 13 нуклеотидов от последовательности трихинелл чукотской нерпы. Последняя отличалась от всех северо-американских штаммов на 8-9 нуклеотидов. Самая необычная последовательность была получена для трихинелл выделенных из одичавшей кошки, жившей на территории зверофермы. Эта последовательность вообще не относилась к кластеру *T. nativa* и *Trichinella* sp. Т6, а объединялась при среднем уровне поддержки (80%) с *T. spiralis* и *T. nelsoni*, отличаясь от них на 47-67 нуклеотидов.

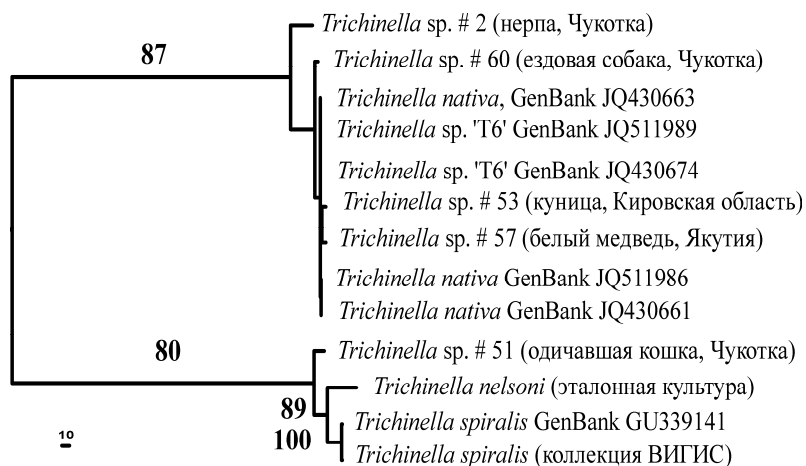


Рис. 1. Филогенетические отношения между изученными штаммами и видами трихинелл (анализ методов максимальной экономии, из 988: 493 признака постоянны, информативных признаков - 433). Шкала – число нуклеотидных замен. Значение «bootstrap» указано на соответствующих ветвях.

Таблица 1. Нуклеотидные различия между штаммами *Trichinella* из российских арктических регионов и последовательностями депонированными в ГенБанке NCBI.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	–												
2	9	–											
3	67	71	–										
4	68	72	2	–									
5	71	75	56	56	–								
6	32	36	47	48	67	–							
7	9	10	73	73	76	35	–						
8	2	7	66	66	69	30	7	–					
9	3	6	66	67	70	31	8	1	–				
10	2	7	65	66	69	30	7	0	1	–			
11	2	7	66	66	69	30	7	0	1	0	–		
12	3	6	67	67	70	31	8	1	0	1	1	–	
13	9	14	74	74	77	35	13	8	9	8	8	0	–

Виды и штаммы: 1 – *Trichinella* sp. # 60 (ездовая собаки, Чукотка); 2 – *Trichinella* sp. # 53 (куница, Кировская область); 3 – *Trichinella spiralis*, GenBank GU339141 4 – *Trichinella spiralis* (коллекция ВИГИС) 5 – *Trichinella nelsoni* (эталонная культура); 6 – *Trichinella* sp. # 51 (одичавшая кошка, Чукотка); 7 – *Trichinella* sp. # 57 (белый медведь, Якутия); 8 – *Trichinella nativa*, GenBank JQ430663.; 9 – *Trichinella nativa*, GenBank JQ511986 .; 10 – *Trichinella* sp. 'Т6' JQ511989 .; 11 – *Trichinella* sp. 'Т6' GenBank JQ430674 ; 12 – *Trichinella nativa* JQ430661 13 – *Trichinella* sp. # 2 (нерпа, Чукотка).

Полученные данные показывают, что по нуклеотидным последовательностям охв митохондриальной ДНК штаммы трихинелл из российских арктических и субполярных регионов достаточно разнообразны. Большая часть их относится к комплексу «*T. nativa*+*Trichinella* sp. Т6», но имеются и *T. spiralis*, а также штаммы близкие к *T. spiralis*, но показывающие существенный уровень нуклеотидных отличий.

ЛИТЕРАТУРА:

- Altschul S. F., Gish W., Miller W. *et al.* Basic local alignment search tool. // Journal of Molecular Biology. 1990. V. 215. P. 403–410.
- Dunams-Morel D.B., Reichard M.V., Torretti L., Zarlenga D.S., Rosenthal B.M. Discernible but limited introgression has occurred where *Trichinella nativa* and the T6 genotype occur in sympatry. // Infection, Genetics and Evolution, 2012, V. 12, P. :530-538.
- Nicholas K. B. GeneDoc. Multiple sequence alignment editor & shading utility version 2. 5. 000. 1999. URL: www. cris. com.
- Page R. M. TREEVIEW: an application to view phylogenetic trees on personal computer // Cabios. 1996. V.12. P. 357–358.
- Pozio E., Hoberg E., La Rosa G., Zarlenga D.S. Molecular taxonomy, phylogeny and biogeography of nematodes belonging to the *Trichinella* genus Infection, Genetics and Evolution. 2009. V. 9. P. 606–616.
- Rosenthal B.M., LaRosa, G, Zarlenga, D, Dunams D, Chunyu Y., Mingyuan, L, Pozio, E. Human dispersal of *Trichinella spiralis* in domesticated pigs. Infection, Genetics and Evolution, 2008. Vol. 8. P. 799-805.
- Swofford D. L. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony. Version 4. 1998. Sinauer, Sunderland, MA.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S.. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution. 2011. V. 28. P. 2731-2739.

СООБЩЕСТВА ПОЧВЕННЫХ НЕМАТОД СЕВЕРНЫХ ОСТРОВНЫХ БИОЦЕНОЗОВ

Сущук А.А., Матвеева Е.М.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии
Карельского научного центра Российской академии наук, ул. Пушкинская, д. 11, г.
Петрозаводск, 185910, Россия; E-mail: anna_sushchuk@mail.ru*

Территории Северного Приладожья и Заонежья на фоне Восточной Фенноскандии отличаются высоким уровнем разнообразия биоты, обусловленным как природными условиями, так и антропогенной трансформацией природных комплексов. Регионы характеризуются уникальными природными факторами: геологическим происхождением, климатом, почвой, флорой и фауной (Громцев, Крутов, 2000).

Острова, расположенные в разных климатических зонах, имеющие разный возраст, размер и тип растительности, представляют интерес для изучения закономерностей формирования островной фауны. К примеру, близость островов к материку и друг к другу позволяют внедряться новым видам и увеличивать сходство фауны. В то же время малые размеры островов создают конкретную экологическую среду для обитания животных, их межвидовых и популяционных взаимоотношений.

При сравнительно полной изученности видового состава флоры и фауны островов, животное население почвы остается практически не исследованным. Отсутствуют сведения о фауне нематод, играющих в северных биоценозах большую роль в процессах трансформации органического вещества и являющихся непременным звеном пищевых цепей почвенных организмов. Нет данных о паразитических нематодах, питающихся за счет живых тканей и влияющих на рост и развитие растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследована фауна нематод островных биоценозов Ладожского и Онежского озер, различающихся типом растительного покрова и степенью трансформации. В Ладожском озере обследовано 10 островов: Тулолансари, Порместарантасари, Маркатсимансари, Тамханка, Путсари, Самматсари, Пеллотсари, Хавус, Мякисало, Валаам. В Онежском озере – 16 островов: Большой Климецкий, Грыз, Ивановский, Северный Олений, Южный Олений, Голый, Становой, Лесной, Ламбинский, Сосновец, Еловец, Березовец, Куйвохта, Сато, Яблонь, Долгий. Всего исследовано 35 биотопов: 14 – лесных (сосняки, ельники, липняки, смешанные леса), 15 – луговых, 3 – трансформированных, 3 – скальных.

Выделение нематод из почвы, фиксацию и изготовление временных глицериновых препаратов осуществляли по общепринятой методике в лабораторных условиях. Анализ нематологического материала проводился по следующим параметрам: плотность популяций нематод в почве (экз./100 г), эколого-трофическая структура (Yeates et al., 1993), индекс зрелости сообществ (Maturity index, ΣMI). Для оценки условий почвенной экосистемы на основе соотношения функциональных групп нематод были использованы: индекс обогащения (Enrichment index, EI), индекс структурирования (Structure index, SI) трофической сети и индекс преобладающего пути разложения органического вещества – с участием бактерий или почвенных грибов (Channel index, CI) (Ferris et al., 2001). Под термином «фитотрофы» объединены две трофические группы: нематоды, ассоциированные с растениями (факультативные фитотрофы) и паразиты растений (облигатные фитотрофы).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Фауна нематод островов Онежского и Ладожского озер характеризуется высоким разнообразием: выявлено 67 и 68 родов соответственно. Только 2 рода отмечены для всех биотопов Ладожского озера (*Plectus*, *Eudorylaimus*), 3 рода – для Онежского (*Acrobeloides*,

Plectus, *Eudorylaimus*). Островная нематодофауна двух озер различается. 10 таксонов выявлены только на Онежском озере. Эта группа включает роды с высокими значениями по с-р шкале, например, редкие для Карелии политрофы и хищники (*Aporcelaimus*, *Labronema*, *Prodorylaimium*, *Coomansus*, *Discolaimus*). 11 таксонов обнаружены только на Ладожском озере: бактериотрофы родов *Aphanolaimus*, *Oncholaimus*, *Koerneria*, *Mesodiplogaster*, *Protorhabditis* и фитопаразиты *Cephalenchus*, *Gracilancea* и некоторые другие.

Луга – не типичный биотоп для островов изученных озер, как и для всей Карелии в целом. Луга являются вторичными, образованными в результате хозяйственной деятельности человека (вырубка лесов, строительство, сельскохозяйственное использование земель). Проанализированные травянистые сообщества как правило имеют небольшую площадь, и представляют собой промежуточные сукцессионные стадии. Сообщества почвенных нематод имеют структуру, отличную от выявляемой на материковых лугах: во всех биотопах доминирует трофическая группа бактериотрофов, субдоминантами выступают микотрофы или нематоды, ассоциированные с растениями, что, по-видимому, связано со значительным влиянием хвойных и смешанных лесов, окружающих биотопы. Доминирующей трофической группой в лесах не зависимо от типа биотопа являются бактериотрофы, субдоминирующей – микотрофы, 3 позицию в структуре сообщества занимают политрофы. Паразиты растений отсутствуют в 43 % исследованных лесных биотопов.

Типичное луговое сообщество выявлено на острове Самматсари: крупнозлаково-разнотравный луг занимал большую площадь. Наибольшую численность имели нематоды родов *Helicotylenchus* и *Rhabditis*, в трофической структуре сообщества доминировали паразиты растений и бактериотрофы, что более характерно для лугов материковой части Карелии.

На долю фитотрофов в целом приходится 15% в лесах и 21,7% - на лугах. Однако выявлены различия между островными лугами двух озер: в силу географического положения вклад фитотрофов в нематодофауну лугов Ладожского озера выше, чем на островах Онежского озера (25,8% против 13,5%).

Факультативные и облигатные фитотрофы в островных биоценозах представлены по-разному: встречаемость нематод, ассоциированных с растениями, в почвенных пробах указывают на их широкое распространение в биоценозах различных типов. Комплекс фитопаразитов лугов характеризуется высоким разнообразием и численностью нематод. В лесных биотопах выявлены только 5 таксонов нематод-паразитов растений из 9: *Paratylenchus*, *Helicotylenchus*, *Heterodera*, *Tylenchorhynchus*, сем. *Criconematidae*. Наибольшая встречаемость в лесах отмечена у нематод рода *Paratylenchus*, таксон был обнаружен в 30% всех проб. Выявленная закономерность согласуется с результатами, полученными ранее по фауне почвенных нематод материковой территории Республики Карелия.

Роды фитопаразитических нематод *Cephalenchus*, *Gracilancea*, *Pratylenchoides*, *Longidorella*, выявленные на островах, являются редкими для почв северной зоны; за многолетний период исследований фауны нематод материковой зоны Карелии они отмечены ранее как единично встречающиеся.

Эколого-популяционные индексы, рассчитанные для лесных и луговых биоценозов островов мало различаются: отмечен высокий индекс зрелости сообществ нематод ($MI=2,6$), разложение органического вещества идет с преимущественным участием бактерий ($CI=25,6$ на лугах, $37,3$ – в лесах), трофическая сеть почв характеризуется сложностью и высоким уровнем структурирования ($SI=70,2$ на лугах, $74,7$ – в лесах); уровень обогащения почв органикой имеет средние значения ($EI=50,5$ и $43,7$ соответственно) (рисунок 1).

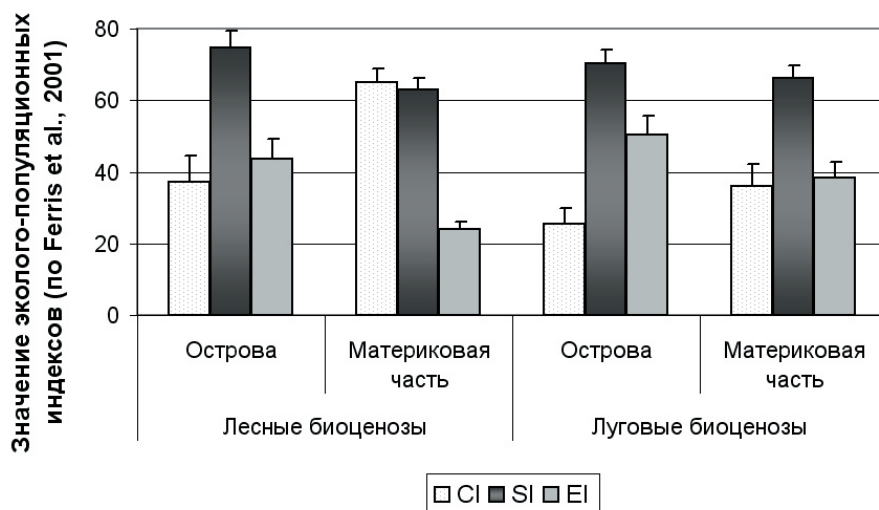


Рисунок 1. Эколого-популяционные индексы, рассчитанные для сообществ почвенных нематод островных биоценозов и материковой части Карелии

Сравнение экологических индексов исследованных островных сообществ со средними значениями для материковой части Карелии показало, что в разложении органического вещества островных почв большую роль играет бактериальный компонент (особенно велико различие значений индекса CI в лесных биоценозах); почвы островов характеризуются более высоким уровнем обогащения трофических сетей (т.е. индекс EI на островах выше, чем на материковой территории) (рисунок 1).

ВЫВОДЫ

1. Фауна нематод островных биоценозов Онежского и Ладожского озер характеризуется высоким разнообразием. Выявлены таксоны нематод – редкие для территории Карелии (например, *Prodorylaimium*, *Coomansus*, *Discolaimus*, *Cephalenchus*, *Gracilancea*).

2. Структура и эколого-популяционные индексы сообществ почвенных нематод сходны в лесных и луговых ценозах островов. Отмеченная тенденция, по-видимому, связана с повсеместно наблюдаемым в настоящее время зарастанием лугов древесной растительностью, особенно на мелкоконтурных угодьях.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение № 8101.

ЛИТЕРАТУРА

- Громцев А.Н., Крутов В.И. Введение // Инвентаризация и изучение биологического разнообразия на территории Заонежского полуострова и Северного Приладожья. Петрозаводск, 2000. С. 6-7.
- Ferris H., Bongers T., de Goede R. G. M. A framework for soil food web diagnostics: extension of the nematode faunal analysis concept // Applied Soil Ecology. 2001. V. 18. P. 13-29.
- Yeates G. W., Bongers T., de Goede R. G. M., Freckman D. W. & Georgieva S. S. Feeding habits in soil nematode families and genera: An outline for soil ecologists // J. of Nematology. 1993. V. 25. № 3. P. 315-331.

К ВОПРОСУ О ФАУНЕ НЕМАТОД В ПОЧВЕ ПАРКОВ Г. МОСКВЫ

Таболин С.Б.

Центр паразитологии ИПЭЭ РАН, 119071, г. Москва, Ленинский проспект 33, комн.128,
E-mail: stabolin@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Исторически на территории города Москвы изучение фауны нематод проводилось в основном на территории Главного Ботанического Сада РАН и на полях МСХА им. К.А.Тимирязева, в то время как большая часть трансформированных природных ценозов оставалась необследованной. Фауна почвенных нематод парков г. Москвы, как отдельный вопрос, никогда не изучалась.

Цель работы. Изучение комплекса почвенных нематод на территориях городских парков (главным образом Нескучного сада и парка Покровское-Стрешнево).

Задачи: 1) выявление видового разнообразия почвенных нематод в ризосфере растений на данных территориях, 2) установление трофической принадлежности выявленных видов, 3) выявление паразито-хозяйинных взаимоотношений между конкретными изучаемыми видами нематод и растений.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Отбор образцов проводили осенью 2011 и осенью 2012 гг. с территории Нескучного сада и парка Покровское-Стрешнево г. Москвы. Всего было отобрано 130 почвенных проб. Почвы в местах отбора образцов преимущественно лёгкие, с кислой реакцией среды. Нематод извлекали двумя методами: методом Бермана (в трёхкратной повторности) и методом Флэгга (в двукратной повторности). Препараты массового анализа из отловленных особей готовили по методу Сайнхорста. Идентификацию проводили по морфометрическим признакам под световым микроскопом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обследованные парки, несмотря на различие флоры, имеют сходную фауну почвенных нематод. Наиболее распространённые виды, отмеченные нами в обоих парках, могут быть разделены согласно трофической классификации (Yeates et al., 1993) на следующие группы:

1) фитопаразиты (*Criconema annuliferum*, *Mesocriconema xenoplax*, *Ogma octangularis*, *Helicotylenchus digonicus*, *H. vulgaris*, *Rotylenchus robustus*, *Longidorus elongatus*, *Trichodorus primitivus*, *Paratrichodorus pachydermus*, др.);

2) микофитогельминты (*Tylenchus elegans*, *Filenchus vulgaris*, др.);

3) бактериотрофы (*Acrobeles cylindricus*, *Acrobeles ciliatus*, *Eucephalobus oxyuroides*, *Eucephalobus striatus*, *Cephalobus persegnis*, *Rhabditis terricola*, *Plectus parietinus*, *P.parvus*, *P.longicaudatus*, др.);

4) хищники (*Aporcelaimus pachydermus*, *Anatonchus tridentatus*, *Mononchus truncatus*, *M.aquaticus*, *Clarkus papillatus*, *Coomansus parvus*, *Mylonchulus brachyuris*, *M. sigmaturus*, *M. sexcristatus*, *Prionchulus muscorum*, *Tigronchoides ginglymodontus*, *Discolaimus major*, *Tripyla affinis*);

5) многоядные (*Eudorylaimus acuticauda*, *E. carteri*, др.);

6) хищники-миксотрофы, способные питаться как многоядные (*Aporcelaimellus obtusicaudatus*, *Aporcelaimellus papillatus*, *Paraxonchium laetificans*, др.).

При этом выявленные фитопаразиты могут быть разделены следующим образом: эктопаразиты (*Mesocriconema xenoplax*, *Criconema annuliferum*, *Ogma octangularis*, *Hemicycliophora macrithmus*, *Paratylenchus spp.*, *Trichodorus primitivus*, *T. similis*, *Tylenchorhynchus spp.*, *Longidorus elongatus*, *Xiphinema diversicaudatum*), мигрирующие

полупогружённые эктопаразиты (*Rotylenchus robustus*, *Helicotylenchus digonicus*, *H.vulgaris*), нематоды, паразитирующие на корневых волосках и эпидермальных клетках (*Tylenchus elegans* и *Filenchus vulgaris*).

На территории парков наиболее широко распространены кольчатые нематоды. Эктопаразитическая нематода *Mesocriconema xenoplax* присутствует и образует высокие плотности популяций в прикорневой почве вяза, клёна, тополя, ясеня, кизильника, сосны, гравилата; *Criconema annuliferum* паразитирует на корнях гравилата и сосны. Вид *Ogma octangularis* отмечен нами на территории Нескучного сада у корней гравилата, а на территории парка Покровское-Стрешнево у корней сосны. Данный вид фитопаразитической нематоды регистрируется на территории Европейской части РФ впервые. Вид *Hemicycliophora macristhmus* (вероятный синоним *Hemicycliophora aquatica*) обнаружен нами лишь на территории Нескучного сада - рядом с Андреевским прудом, у корней мать-и-мачехи. При этом вид отмечен на территории России впервые.

На территории парков также широко распространены нематоды- вирусоносители, образующие высокие плотности популяций: *Longidorus elongatus*– на корнях тополя, ивы, рябины обыкновенной, рябины тюрингской, ясеня, дуба, репейника, гравилата, галинсоги, в ризосфере разнотравья газонов; *Trichodorus primitivus* совместно с *Paratrichodorus pachydermus*- в ризосфере клёна, ивы, вяза, сныти и папоротника (страусника обыкновенного). Виды *Xiphinema diversicaudatum* и *Trichodorus similis* встречаются намного реже.

Среди представителей рода *Helicotylenchus* на территории московских парков наибольшее распространение имеют два вида: *H.digonicus* и *H.vulgaris*, тяготеющие к растениям с хорошо развитой корневой системой мочковатого типа.

Виды рода *Tylenchorhynchus* распространены главным образом в ризосфере газонных трав, однако высоких плотностей их популяций мы не наблюдали.

Другие представители группы эктопаразитов, например, *Paratylenchus straeleni* и *Gracilacus goodeyi* встречаются лишь на немногих участках территории парка Покровское-Стрешнево, *Paratylenchus nanus*- на территории Нескучного сада.

Род *Pratylenchus*, в отличие от агроценозов, имеет очень ограниченное распространение на обследованных территориях и представлен в основном видом *P.neglectus*. Возможно, редкое обнаружение представителей данного рода связано с использованными нами в работе методиками.

Среди облигатных хищников- представителей отряда Mononchida, способных контролировать численность фитопаразитических нематод, в парках выявлены следующие виды: *Clarkus papillatus*, *Coomansus parvus*, *Mononchus aquaticus*, *M. truncatus*, *Mylonchulus brachyurus*, *M. sigmaturus*, *M. sexcristatus*, *Anatonchus tridentatus*, *Prionchulus muscorum* и *Tigronchoides ginglymodontus*. При этом виды *Mononchus aquaticus* и *M. truncatus* предпочитают увлажнённые почвы, а виды *Prionchulus muscorum* и *Tigronchoides ginglymodontus* чувствительны к воздействию внешней среды. Последний из упомянутых видов регистрируется на территории РФ впервые.

Также на обследованных территориях широкое распространение имеют хищники, способные питаться как многоядные: *Aporcelaimellus obtusicaudatus* (отмеченный нами в большинстве образцов и по всей видимости являющийся сборным видом), *Aporcelaimellus papillatus*, *Discolaimus major*, др.

К ВОПРОСУ РАЗРАБОТКИ ЭКОЛОГИЧЕСКИ БЕЗОПАСНЫХ ЗАЩИТНЫХ МЕРОПРИЯТИЙ ОТ КОМПЛЕКСА ВРЕДНЫХ ОРГАНИЗМОВ НА ЗЕМЛЯНИКЕ САДОВОЙ

Таболин С.Б., Романенко Н.Д., Титова А.С.

*Центр паразитологии Института проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова
РАН, 119651, Москва, Ленинский проспект, 33, тел. 8-495- 952-31-45;*

E-mail: cenologypathlab@mail.ru

В последние годы 20-го и начала 21 века был проведен комплекс исследований по разработке экологически безопасной технологии защиты растений земляники садовой (1-5). При комплексном заражении растений земляники садовой фитопаразитическими нематодами, вирусами, грибами, оомицетами, паутинным и земляничным клещами нами была разработана новая технология защитных мероприятий от этих паразитов. Данная технология сочетает в себе экологически безопасные меры по обеззараживанию исходных маточных растений земляники садовой от комплексной инфекции и использование ряда профилактических и экологически безопасных приёмов, направленных на предотвращение повторного заражения (5). Комплекс по обеззараживанию исходного посадочного материала земляники садовой и ее сортимента состоит в разработке новой усовершенствованной технологии обеззараживания в горячей воде с применением новейшего оборудования (термованн - для прогрева растений в горячей воде с автоматическим подогревом и поддержанием температуры горячей воды на уровне с точностью измерения до 0,1° С, а также высокоточных термометров для измерения температуры и др.). На первом этапе получения оздоровленных клонов нами был усовершенствован метод термического обеззараживания от комплекса вредных организмов в горячей воде. Повышен допустимый предел эффективной температуры, сохраняющий жизнеспособность растениям при максимально допустимой температуре при прогреве растений земляники садовой в горячей воде. По новой технологии используется новый режим прогрева растений - вместо 48° С, 15 минут - рекомендуемой согласно ранее разработанной технологии (6) рекомендуются режимы - 48,2 или 48,4 градуса, 15 минут, (5). Рекомендуемые новые режимы позволили полностью избавить растения от стеблевой, земляничной и других паразитических нематод, не только в надземных органах, но и в корневой системе, подавить комплекс оомицетов – возбудителей трахиомикозов, а также комплекс вирусных, грибных, бактериальных инфекций и избавиться от комплекса паразитических клещей. Вторым этапом, рекомендуемой нами экологически безопасной технологии является комплекс профилактических мероприятий при доращивании оздоровленных растений (1-5). В защищенном грунте доращивание растений проводили в обеззараженной от комплекса вредных организмов почве, в стерильных условиях и полной изоляции от окружающей среды или в пробирочной культуре *in vitro* - из клеток от первично оздоровленных растений в стерильных боксах с регулируемым режимом температуры, влажности и освещенности (3-5). В полевых условиях растения высаживали в открытый грунт, проверенный на отсутствие (наличие) нематод переносчиков вирусов, других опасных групп вредных организмов, передающихся через почву и воздух. Растения высаживали в пленочных теплицах или под марлевые изоляторы (1-6). При этом для повышения укоренения и предотвращения повторного заражения растения погружали в 2% - ные суспензии бактерий - антагонистов (*Pseudomonas fluorescens* или *P. aureofaciens*) или грибов – антагонистов (*Trichoderma virida*, штамм R или штамм MC-10) при экспозиции - 3 часа. В дальнейшем, с целью профилактики от комплекса вредных организмов, но уже при размножении в открытом грунте, растения погружали в 2% - ные суспензии бактерий - антагонистов (*Pseudomonas fluorescens* или *P. aureofaciens*) или грибов – антагонистов

(*Trichoderma virida*, штамм R или штамм МС-10) с добавлением ИМК при экспозиции - 3 часа. Укорененные и размноженные растения высаживали в открытый грунт для дальнейшего размножения на изолированном от плодоносящих плантаций участке. Для повышения укоренения и жизнеспособности, растения также погружали в 2 % - ные водные суспензии ризобактерий - антагонистов (*Pseudomonas fluorescens* или *P. aureofaciens*) или грибов – антагонистов (*Trichoderma virida*, штамм R или штамм МС-10) с добавлением ИМК при экспозиции - 2 часа. На протяжении выращивания растения и почву вокруг них обрабатывали комплексом бактерий антагонистов с целью предотвращения заражения паразитическими грибами, оомицетами, клещами, вирусами и нематодами. Биологическая эффективность предлагаемых новых мероприятий варьировала от 82 % до 92 %. На протяжении всей вегетации осуществляли постоянный контроль за фитосанитарным состоянием высаженных растений земляники. Осуществляли регулярные обследования растений и почвы и проводили контрольные анализы на наличие или отсутствие наиболее опасных вредных организмов, включая нематод, вирусы, грибы и оомицеты не только в почве, но и в самих растениях. Установлено, что при размножении растений в открытом грунте наиболее вероятными вредными организмами являются клещи, тли и белокрылки – переносчики вирусных инфекций осуществляющих распространение воздушным путем, численность которых обычно регулировали путем периодических обработок акарином. Однако, в процессе проведенных исследований была установлена низкая эффективность ранее рекомендованного и широко применяемого при выращивании земляники антиклещевого препарата – «акарин», полученного на основе 8 биоактивных штаммов *Streptomyces avermitilis* против комплексного заражения растений земляники паутиными и земляничным клещами. Установлено, что применение на землянике садовой препарата «акарин» в рекомендованных концентрациях - 0,1-0,3 % обладает недостаточным акарицидным действием и даже при более высокой концентрации (0,4%) биологическая эффективность (БЭ) составляет всего лишь 46%. Такие же результаты получены и от обработки растений препаратом иммунологического действия - «олигофуростанозид» (в обычно рекомендованной концентрации - 0,0001%) (БЭ=52%). В процессе проведенных лабораторных и полевых исследований нами был предложен новый способ борьбы с этими опасными видами клещей. В основе предлагаемого способа положен принцип сочетания полезного иммуногенного действия олигофуростанозиды и акарицидного действия препарата - «акарин». В результате комплексной обработки обоими препаратами, включая однократную обработку олигофуростанозидом и две – три обработки акарином с интервалом 14 дней наблюдали заметное, почти двукратное повышение биологической эффективности, как в случае снижения численности паутиных клещей (БЭ=93%), так и в случае снижения численности земляничного клеща (БЭ=92%). Эти результаты были получены при выращивании земляники, как в открытом, так и защищенном грунте на промышленных маточниках, в питомниках и на плодоносящих плантациях. Однако, не смотря на высокую эффективность (БЭ = 93 %), полного искоренения от комплекса паутиных и земляничного клещей этот способ не дает, что, по-видимому, происходит за счет отсутствия ощутимого ооцидного эффекта у данных препаратов. Оба препарата и их комбинированный способ применения, уступали термическому обеззараживанию растений в горячей воде при 48,2°С и 48,4° С, с помощью которого достигается полное искоренение данных паразитов. Поэтому грибы и бактерии – антагонисты целесообразнее использовать с целью профилактики повторного заражения после предварительного термического обеззараживания растений и последующем выращивании их, как в открытом, так и защищенном грунте.

ЛИТЕРАТУРА

Романенко Н.Д., Метлицкая К.В., Титова А.С., Алхасов Э.Б., Таболин С.Б. К вопросу изучения нематодовирусного комплекса при закладке маточных насаждений плодовых культур в

ООО «Сады Чечни». Плодоводство и ягодоводство России. Сб. научных работ . Том XXIV, часть 2. М. 2010. С. 91-97.

Романенко Н.Д., Таболин С.Б. К вопросу изучения биологической и хозяйственной эффективности биоактивных штаммов грибов и бактерий антагонистов в борьбе с нематодами - микозными инфекциями ризосферы растений черной смородины. Плодоводство и ягодоводство России. М. 2011. Т. 26. С. 186-193.

Романенко Н.Д., Титова А.С., Таболин С.Б. К вопросу изучения немато-микозного комплекса ризосферы земляники садовой в условиях Московской области. Ж. Плодоводство и ягодоводство России. Сб. научных работ. Том XXIV, часть 2. М. 2010. С. 98-106.

Романенко Н.Д. , Толстогузова В.Г., Метлицкая К.В., Титова А.С. , Суркова Т.А., Таболин С.Т. Оценка зараженности новых, перспективных и районированных сортов земляники садовой комплексом вредных организмов. Плодоводство и ягодоводство России. Сб. научных работ. Том XXII , ч. 2, Издательский Дом МСП ГНУ ВСТИСП. М. 2009. С. 224-231.

Романенко Н.Д. , Толстогузова В.Г., Метлицкая К.В., Титова А.С. , Суркова Т.А., Таболин С.Т. Разработка экологически безопасных методов защиты растений земляники садовой от комплекса вредных организмов. Плодоводство и ягодоводство России. Сб. научных работ. Том XXII , ч.2, Издательский Дом МСП ГНУ ВСТИСП. М. 2009. С. 232-238.

Трушечкин В.Г., Метлицкий О.З., Романенко Н.Д. , Поликарпова Ф.Я. и др. Технология обеззараживания почвенных субстратов при выращивании безвирусного посадочного материала плодовых и ягодных культур в питомниках и маточных насаждениях. Рекомендации. Росагропромиздат, 1988, 37 с.

МНОГОКЛЕТОЧНАЯ МЕЙОФАУНА И ОСОБЕННОСТИ НЕМАТОЦЕНОВ СЕВЕРО-ЗАПАДНОГО КОНТИНЕНТАЛЬНОГО СКЛОНА ЯПОНСКОГО МОРЯ

Фадеева Н.П., Мордухович В.В.

Дальневосточный Федеральный Университет, ул. Октябрьская, 27, к. 430а, Владивосток, 690600, Россия; E-mail: nfadeeva2006@yandex.ru

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия по всему миру велось активное изучение экологии глубоководной мейофауны (Vanreusel et al., 2010). Однако Японское море долгое время оставалось не охваченным исследованиями. Предварительные данные о составе и распределении мейобентоса в нижней части континентального япономорского склона были представлены Требуховой с соавторами (Trebuchova et al., 2012). Целью данной работы было рассмотрение особенностей распределения многоклеточной мейофауны и исследование структуры нематоценов континентального склона северо-западной части Японского моря.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Пробы отобраны в Японском море в августе 2010 г. в ходе российско-немецкой экспедиции SoJaBio на НИС «Академик. Лаврентьев». Станции располагались на глубинах от 515 до 3367 м. Образцы грунта отбирали мультикоррером. Верхние 5 см осадка фиксировали 10 % забуференным формалином. В лаборатории пробы окрашивали 1 % раствором бенгальской розы и промывали через сито с ячейей 32 μm . Всего изучено 22 пробы с 4 станций. Организмы мейофауны идентифицировали до таксонов высокого ранга. Из каждой пробы выбирали не менее 100 нематод для последующей идентификации. Все нематоды были идентифицированы до уровня видов, ряд видов оказались новыми для науки.

Для статистического анализа использовали программы PRIMERV6 и STATISTICA 6.1. При анализе различий плотности поселения мейобентоса и отдельных таксономических

групп между станциями использовали критерий Крускала-Уоллиса. Непараметрическое многомерное шкалирование применяли для ординации проб. В качестве метрик использовали евклидово расстояние и индекс Брея-Кертиса для трансформированных (корень квадратный) данных по обилию мейобентосных групп и видов нематод соответственно. Статистическую значимость группировки оценивали с помощью анализа сходства (ANOSIM).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Обнаружено 17 таксономических групп мейобентоса. Средняя плотность поселения мейобентоса составила 619.9 ± 468.6 (среднее \pm среднее квадратическое отклонение) экз./10 см². Ведущей по численности группой были Nematoda (508.2 ± 430.3 экз./10 см²) и Harpacticoida (65 ± 49 экз./10 см²).

Согласно тесту Крускала-Уоллиса плотность поселения мейобентоса, нематод и гарпактикоидных копепод значимо ($p = 0.036$, $p = 0.0031$, $p = 0.009$ соответственно) различались между станциями, для наиболее глубоководной станции А7 обилие мейобентоса, нематод и гарпактицид было наименьшим

По данным анализа сходства станции значимо различались по структуре мейобентосных сообществ ($R = 0.482$, $p = 0.001$). Рисунок 1 иллюстрирует полученные результаты. Станция А7 значимо отличается от станций А2 и А3 ($R = 0.792$ и 0.776 соответственно; $p = 0.001$ и 0.001 соответственно). Для станций А2, А3, А6 значимых различий не выявлено.

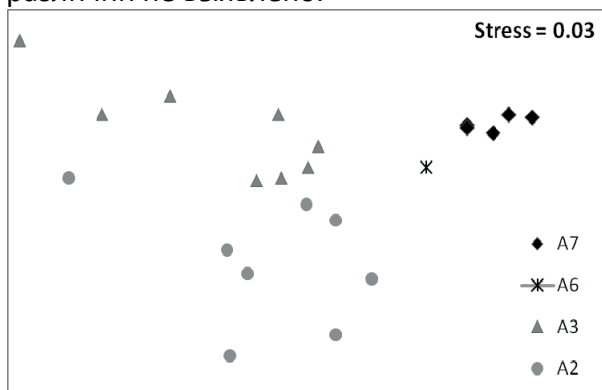


Рис. 1. Результаты ординации проб по обилию мейобентосных групп методом многомерного шкалирования (Евклидово расстояние)

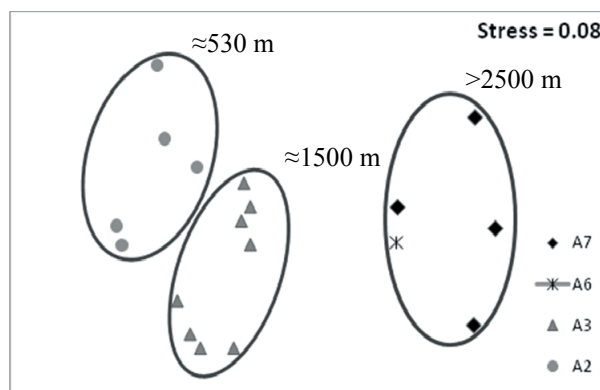


Рис. 2. Результаты ординации проб по обилию видов нематод методом многомерного шкалирования (индекс Брея-Кертиса)

Доля нематод в общей численности мейобентоса изменялась по станциям незначительно - от 71.7 % на ст. А2 до 86.5 % на ст. А7. Всего было обнаружено 125 видов нематод 35 семейств. Число видов на пробу варьировало от 14 до 22. До глубины 550 м было отмечено 59 видов, из которых 14 встречались и глубже, до нижнего уровня континентального склона (виды родов *Aponema*, *Terschellingia*, *Sabatieria*, *Campylaimus*, *Diplopeltula*, *Diplopeltoides*, *Halalaimus*, *Cervonema*, *Halomonhystera*, *Alaimella* и *Leptolaimus*). В целом, видовое разнообразие нематод снижалось с увеличением глубины. Глубоководная фауна характеризовалась небольшим числом родов и высоким доминированием. Рода *Acantholaimus*, *Daptonema*, *Desmoscolex*, *Trefusia* и *Thalassomonhystera* были самыми многочисленными в диапазоне глубин 2500-3367 м. (табл. 1). Рода *Acantholaimus*, *Desmoscolex*, *Pselionema*, *Quadricoma* были впервые зарегистрированы для Японского моря, а два вида (*Diplopeltula tchesunovi* Fadeeva & Mordukhovich, 2013 и *Diplopeltoides holovachovi* Fadeeva & Mordukhovich, 2013) описаны как новые.

Таблица 1. Видовой состав нематоценов станций (10 наиболее массовых видов, %)

A2(530 м)		A3 (1500 м)		A6 (2500 м)		A3 (3300 м)	
<i>Cervonema minutus</i>	7	<i>Neochromadora</i> sp.	7,6	<i>Trefusia</i> sp. 2	25,2	<i>Trefusia</i> sp. 2	15,9
<i>Daptonema</i> sp.1	6	<i>Desmodorella</i> sp.	6,1	<i>Acantholaimus</i> sp. 2	20,4	<i>Acantholaimus</i> sp. 2	14,1
<i>Daptonema</i> sp.2	4,2	<i>Sabathieria</i> sp. 1 aff <i>finitima</i>	5,5	<i>Desmoscolex</i> sp. 2	11,7	<i>Acantholaimus</i> sp. 3	14,1
<i>Neochromadora</i> sp.	3,6	<i>Pselionema</i> sp.	3,9	<i>Acantholaimus</i> sp. 5	8,7	<i>Desmoscolex</i> sp. 2	13,4
<i>Halalaimus</i> sp.1	3,5	<i>Quadricoma</i> 1	3,8	<i>Actinonema</i> sp.	5,8	<i>Daptonema</i> sp.	11
<i>Halalaimus</i> sp. 4	3,5	<i>Actinonema</i> sp.	3,4	<i>Pselionema</i> sp.	5,8	<i>Thalassomonhystera</i> sp.4	4,2
<i>Desmodorella</i> sp.	3,4	<i>Quadricoma</i> sp. 4	3,3	<i>Halomonhystera</i> sp.	3,9	<i>Theristus acer</i>	3,8
<i>Aegialoalaimus elegans</i>	3,4	<i>Oxystomina</i> sp1	3,3	<i>Desmoscolex</i> sp. 3	2,9	<i>Acantholaimus</i> sp. 5	2,9
<i>Anticoma</i> sp.	3,3	<i>Cervonema minutus</i>	3,2	<i>Greeffiella</i> sp.	2,9	<i>Prochromadorella</i> sp.	2,1
<i>Elzalia</i> sp.	3,1	<i>Acantholaimus</i> sp. 4	3	<i>Acantholaimus</i> sp. 3	1,9	<i>Desmoscolex</i> sp. 3	1,7

Результаты ординации проб методом многомерного шкалирования по обилию видов нематод представлены на рисунке 2. Четко выделяются три группы: A2 (около 530 м), A3 (около 1500 м) и A6+A7 (> 2500 м). Согласно анализу сходства подобная группировка статистически значима ($R = 0.862$, $p = 0.001$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Плотность поселения и состав многоклеточного мейобентоса в северо-западной части Японского моря оказались типичными для сходных глубин Мирового океана (Itoh et al., 2011; Shirayama, Kojima, 1994; Soltwedel, 2000; Vanaverbeke et al., 1997). Доминирующей мейобентосной группой были нематоды (от 71.7 % на глубине 515 м до 86.5 % на глубине 3300 м). На глубинах более 2500 м преобладали представители семейств *Hyalidae*, *Chromadoridae* и *Trefusiidae*, которые включают самых общих и обильных глубоководных нематод. Глубоководные виды были представлены преимущественно мелкими (<500 μ m) формами. По данным предыдущих исследователей этого района Японского моря, также основанным на анализе материалов SoJaBio, многоклеточный мейобентос характеризуется низкими плотностями поселения и низким же видовым разнообразием нематод, а также отсутствием оригинальной глубоководной нематофауны (Trebuchova et al., 2012). Полученные нами результаты опровергают этот вывод. По нашим данным состав нематоценов на уровне родов был подобен описаниям из глубоководных грунтов различных акваторий Мирового океана (например, Vanreusel et al., 2010; Miljutin et al., 2012). Ряд родов впервые был отмечен в Японском море. Также зарегистрировано довольно большое число новых видов, описания которых готовятся к публикации.

ЛИТЕРАТУРА

- Fadeeva N.P., Mordukhovich V.V. Some new and poorly known nematode species from the Sea of Japan // *Deep-Sea Research Part II*, 2013. Vol. 86-87. P. 119-123.
- Itoh M., Kawamura K., Kitahashi T., Kojima S., Katagiri H., Shimanaga M. Bathymetric patterns of meiofaunal abundance and biomass associated with the Kuril and Ryukyu trenches, western North Pacific Ocean // *Deep-Sea Research I*. 2011. Vol. 58. P. 86–97.

- Miljutin D.M., Miljutina M.A., Mokievsky V.O., Tchesunov A.V. Benthic meiofaunal density and community composition in the deep White Sea and their temporal variations // *Polar Biol.* 2012. Vol. 35. P. 1837–1850.
- Mokievskii V.O., Udalov, A.A., Azovskii A.I., Quantitative distribution of meiobenthos in deep-water zones of the World Ocean // *Oceanology.* 2007. Vol 47(6). P. 797–813.
- Shirayama Y., Kojima S. Abundance of deep-sea meiobenthos off Sanriku, Northeastern Japan // *Jpn J Oceanogr.* 1994. Vol. 50. P. 109–117.
- Soltwedel T. Metazoan meiobenthos along continental margins: a review // *Progress Oceanogr.* 2000. Vol. 46. P. 59–84.
- Trebukhova Yu.A., Miljutin D.M., Pavlyuk O.N., Mar'yash A.A., Brenke N. Changes in deep-sea metazoan meiobenthic communities and nematode assemblages along a depth gradient (North-western Sea of Japan, Pacific) // *Deep-Sea Research II.* 2013. Vol. 86–87. P. 56–65.
- Vanaverbeke J., Soetaert K., Heip C., Vanreusel A. The metazoan meiobenthos along the continental slope of the Goban Spur (NE Atlantic) // *Journal of Sea Research.* 1997. Vol. 38. P. 93–107.
- Vanreusel A., Fonseca G., Danovaro R., Da Silva S., Esteves A.M., Ferrero T.G.G., Galtsova V., Gambi C., da Fonseca Genevois V., Ingels J., Ingole B., Lampadariou N., Merckx B., Miljutin D., Miljutina M., Muthumbi A., Netto S., Portnova D., Radziejewska T., Raes M., Tchesunov A., Vanaverbeke J., Van Gaever S., Venekey V., Bezerra T.N., Flint H., Copley J., Pape E., Zeppilli D., Arbizu Martinez P., Galeron J. The contribution of deep-sea macrohabitat heterogeneity to global nematode diversity // *Mar. Ecol.* 2010. Vol. 31. P. 6–20.

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДА FLASH-PCR ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ НЕМАТОД *GLOBODERA ROSTOCHIENSIS* (WOLL.) BEHRENS

Худякова Е.А., Сударикова С.В.

Всероссийский центр карантина растений ФГБУ «ВНИИКР», 140150, Московская область,
п. Быково, Россия; E-mail: vniikr@mail.ru

Золотистая картофельная нематода *Globodera rostochiensis* является типичным представителем цистообразующих паразитических нематод и широко распространена по странам мира. Она поражает многие виды растений из семейства *Solanaceae*. Основная повреждаемая сельскохозяйственная культура – картофель. С 1948 года и по настоящее время является карантинным видом для Российской Федерации, поэтому методы выявления и идентификации золотистой картофельной нематоды имеют большое значение для лабораторной карантинной экспертизы.

В лаборатории гельминтологии ФГБУ «ВНИИКР» для идентификации нематод *Globodera rostochiensis* (Woll.) Behrens используют морфологический и морфометрический методы, определение жизнеспособности с помощью микроскопа и метод ПЦР согласно диагностическим протоколам ЕОКЗР и стандарту организации (Diagnostic protocol for regulated pests *Globodera rostochiensis* *Globodera pallida* № РМ 7/ 40 (1), 2003-09; СТО ВНИИКР 6.001-2010 «Картофельные цистообразующие нематоды *Globodera rostochiensis* (Woll.) Behrens и *Globodera pallida* (Stone) Behrens. Методы выявления и идентификации»). В качестве альтернативы классической ПЦР в лаборатории пользуются методом FLASH-PCR (Fluorescent Amplification-based Specific Hybridization). Это флуоресцентная ПЦР по конечной точке (end-point fluorescent PCR). В основе метода «FLASH» лежат три явления: эффект гашения флуоресценции, 5'-экзонуклеазная активность Taq-полимеразы и взаимодействие комплементарных фрагментов ДНК. Ключевым элементом технологии FLASH-PCR является использование гибридационных олигонуклеотидных зондов, меченных молекулами флуорофора и гасителя флуоресценции. Для повышения эффективности ПЦР используется

«горячий старт», уменьшающий риск образования неспецифических продуктов амплификации. Он обеспечивается разделением компонентов ПЦР-смеси слоем парафина, который предотвращает их смешивание до начала реакции.

На этапе детекции используется ПЦР-детектор «Джин». Приборы различных модификаций могут иметь 2 или 4 канала детекции, что позволяет использовать внутренний контроль или проводить мультиплексную реакцию. Программное обеспечение позволяет быстро оценить результаты исследований, которые выдаются в табличной и графической формах. Программа основана на сравнении уровня флуоресценции образца с уровнем флуоресценции фона и выдает результат в относительных единицах (как частное значения флуоресценции образца к значению фона). В качестве фона используется реакционная смесь без полимеразы (Рязанцев Д.Ю. и др., 2009). Аккредитованная лаборатория должна использовать только те тесты, которые прошли валидацию (признаны надежными и достоверными). Тест считается полностью прошедшим валидацию, когда предоставляются данные о следующих рабочих критериях: аналитическая чувствительность, аналитическая специфичность, воспроизводимость и повторяемость. Валидацию проводили согласно Стандартам РМ 7/84 «Основные требования к управлению качеством в лабораториях по диагностике вредных организмов растений» и РМ 7/98 «Специфические требования к лабораториям, ведущим подготовку к аккредитации деятельности в сфере диагностики вредных организмов растений». Диагностические наборы для детекции фитопатогенов методом ПЦР в формате FLASH производятся фирмой «Агродиагностика» (Москва). Они адаптированы к оборудованию фирмы «ДНК-Технология» (Россия). Используемая методика FLASH-PCR разработана фирмой «Агродиагностика» (agrodiagnostica@bk.ru).

Схема проведения валидации

При проведении валидации метода FLASH-PCR к *Globodera rostochiensis* (Woll.) Behrens исследовались следующие параметры:

- 1) аналитическая чувствительность;
- 2) аналитическая специфичность;
- 3) повторяемость;
- 4) воспроизводимость.

1. Аналитическая чувствительность

Исследования проводили на образцах цист, содержащих жизнеспособные и нежизнеспособные яйца и личинки. В качестве одного образца брали две цисты нематоды известного вида, который был заранее определен морфологическим и морфометрическим методами и проверен на жизнеспособность. В среднем на одну цисту приходилось 250 яиц и личинок. Образец растирали в 80 мкл дистиллированной воды согласно инструкции. Такую концентрацию в дальнейшем использовали как исходную (без разведения) и проводили серийные 10-кратные разведения каждого образца (до 10^{-8}) с жизнеспособными яйцами и личинками для определения порога чувствительности метода FLASH-PCR. Достоверные результаты для цист с жизнеспособными яйцами и личинками получили при разведении исходного образца до концентрации 1:100. Это говорит о высокой чувствительности метода. Достоверные результаты для цист с нежизнеспособными яйцами и личинками получили при разведении исходного образца до концентрации 1:10. Поэтому во всех последующих опытах исследования проводили в двух вариантах: 1 – без разведения, 2 – разведение 1:10.

Таким образом, предел чувствительности метода для цист с жизнеспособными яйцами и личинками составил не менее пяти личинок или яиц в образце, тогда как для цист с нежизнеспособными яйцами и личинками – не менее 50 личинок или яиц в образце.

2. Аналитическая специфичность

Аналитическую специфичность метода FLASH-PCR оценивали по реакции к *Globodera rostochiensis*, *Globodera pallida*, *Heterodera* sp., которые являются близкородственными

видами.

Опыт с *Heterodera* sp. и *Globodera rostochiensis* дублировали в лаборатории молекулярных методов классическим методом ПЦР с использованием электрофореза. Образцы делили на две одинаковые части для исследования двумя методами (цисты разрезались пополам).

В результате проведенного эксперимента не отмечено неспецифической реакции используемых праймеров с *Globodera pallida* и *Heterodera* sp. Наряду с этим наблюдалась специфическая реакция с *Globodera rostochiensis*. Проведенный эксперимент выявил высокую специфичность набора для FLASH-PCR к *Globodera rostochiensis*. Аналогичные результаты получены классическим методом ПЦР. Однако, по сравнению с методом FLASH-PCR, классический метод занимает гораздо больше времени, более трудоемкий.

3. Повторяемость

Исследование проводилось в один день одним оператором на одном оборудовании. Цисты одной популяции, выделенные из одного образца почвы (16 шт.) и определенные морфологически как *Globodera rostochiensis*, растирали в одной пробирке с дистиллированной водой (320 мкл). Затем полученную суспензию делили на 8 частей и проводили исследование согласно методике. Проведенный эксперимент показал достоверную повторяемость 100%.

4. Воспроизводимость

Воспроизводимость была определена по методике изучения повторяемости, только все эксперименты были проведены в разное время разными людьми. Результаты данного эксперимента также позволили идентифицировать *Globodera rostochiensis* во всех образцах, что свидетельствует о высокой воспроизводимости результатов. Воспроизводимость составила 100%.

Оценка результатов валидации

Молекулярный метод FLASH-PCR подходит для идентификации цистообразующей нематоды *Globodera rostochiensis* (Woll.) Behrens в диагностических карантинных лабораториях.

ЛИТЕРАТУРА:

- Рязанцев Д.Ю., Абрамов Д.Д., Завриев С.К. (2009). Диагностика карантинных фитопатогенов методом ПЦР в формате FLASH. Сельскохозяйственная биология (3), 114–117
- СТО ВНИИКР 6.001-2010 «Картофельные цистообразующие нематоды *Globodera rostochiensis* (Woll.) Behrens и *Globodera pallida* (Stone) Behrens. Методы выявления и идентификации
- Стандарт ЕОКЗР РМ 7/84 «Основные требования к управлению качеством в лабораториях по диагностике вредных организмов растений»
- Стандарт ЕОКЗР РМ 7/98 «Специфические требования к лабораториям, ведущим подготовку к аккредитации деятельности в сфере диагностики вредных организмов растений»
- Diagnostic protocol for regulated pests *Globodera rostochiensis* *Globodera pallida* № РМ 7/ 40 (1), 2003-09

ФАУНА И ЭКОЛОГИЯ НЕМАТОД-КСИЛОБИОНТОВ ИВЫ ЛОМКОЙ (*SALIX FRAGILIS*) НА ТЕРРИТОРИИ ЦЕНТРАЛЬНО-ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ

Хусаинов Р.В.

Центр Паразитологии ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН, Ленинский пр., 33, Москва, 119071, Россия; E-mail: ren_khusainov@yahoo.com

Основная часть работ по нематодам ствольной части деревьев посвящена изучению паразитических видов насекомых-ксилофагов (Блинова, 1982; Korner, 1952; Ruhm, 1956; Massey, 1977). Основные исследования нематод древесины в настоящее время сосредоточены на видах рода *Bursaphelenchus*. На данный момент существует ограниченное

число научных работ, посвященных фауне нематод-ксилобионтов России, однако они касаются только погибших деревьев (Гагарин, 1999; Круглик, 2003). Видовой состав нематод, обитающих на поверхности коры и древесины здоровых деревьев, ранее не был изучен.

Пробы древесины отбирали в период с 2010 по 2012 гг. в различных субъектах Центрально-Европейской части РФ (Тверская, Ярославская, Смоленская, Московская, Калужская и Владимирская области). Пробы подразделяли на 6 типов по трем параметрам: поверхностная структура коры, санитарное состояние дерева, наличие простых и сложных эпифитных организмов. Было отобрано по 10 проб каждого из 6 типов с ивы ломкой (*Salix fragilis*) в 4-х кратной повторности (всего 220 древесных проб). Нематод выделяли вороночным методом по Бермана без использования ваты при экспозиции 40 часов. Нематод нагревали и фиксировали 4% раствором ТАФ. Проводили подсчет общей численности всех нематод с каждой пробы; таксономическое определение проводили только до рода.

В результате были выявлены представители 32 родов из 18 семейств, принадлежащих к 8 отрядам. Показано, что на коре здоровых деревьев доминировали флеобионты (альгофаги и бактериофаги), на коре деревьев со сложными эпифитами – бактериофаги и хищники, а на упавших гниющих деревьях – сапробионты и эдафобионты (бактериофаги и мицетофаги).

Кора молодых деревьев без механических повреждений, имеющая гладкую структуру и отсутствие на поверхности лишайников и мхов (тип А), но с наличием простейших эпифитов (бактерии и водоросли), характеризуется относительно бедной фауной нематод. На таких деревьях постоянно встречались представители лишь 2 родов – *Laimaphelenchus* (отряд Aphelenchida) и *Panagrolaimus* (отряд Rhabditida).

По мере увеличения возраста дерева структура его коры становится более грубой и выщербленной, в ее углублениях начинают появляться участки, которые подвергаются длительному увлажнению (тип В), что создает благоприятные условия для обитания нематод. Число родов нематод в таком случае возрастает до 5, где насчитываются представители уже 3 отрядов. Иногда на такой коре (вследствие пассивного заноса дождем, ветром и т.п.) присутствуют нематоды из родов *Aphelenchoides* и *Nothotylenchus*. Повышение разнообразия родов нематод можно также наблюдать при наличии на поверхности коры более сложных эпифитов (тип С) – лишайников (*Cladonia* spp., *Haematomma* spp., *Parmelia* spp., *Xantoria parietina*) и мхов (*Orthotrichum* spp., *Sanionia* spp., *Sphagnum* spp.). Лишайники и мхи используются многими беспозвоночными как место обитания и способ укрытия от хищников, что, соответственно, увеличивает состав микро- и мезофауны. Данный субстрат активно заселяется коловратками (Rotifera: Bdelloidea), тихоходками (Tardigrada: Heterotardigrada), а также различными клещами. В этом случае на коре начинают появляться нематоды-хищники – дорилаймиды и мононхиды (рода *Eudorylaimus* и *Prionchulus*), которые используют вышеупомянутых беспозвоночных и других нематод в качестве пищи. Также обильно встречаются представители рода *Plectus*.

При механических повреждениях структуры коры, особенно в тех случаях, когда возможно оголение древесины (тип D), начинают интенсивно протекать процессы гниения, сопровождающиеся возрастанием микробиоты (микромикеты и бактерии). В этом случае на фоне нематод-альгофагов, бактериофагов и хищников начинают преобладать мицетофаги из родов *Aphelenchoides*, *Ditylenchus* и *Nothotylenchus*. При ослаблении дерева под корой и в древесине увеличивается количество насекомых-ксилофагов, которые приносят трофически связанных с ними нематод, некоторые из них используют насекомых для расселения (род *Bursaphelenchus*), часть меняет паразитическую стадию на мицетофаговую (рода *Cryptaphelenchus*, *Deladenus*), а остальные просто переходят на новых хозяев (род *Parasitorhabditis*).

После гибели дерева резко возрастают процессы разложения древесины (тип E), при этом число родов нематод возрастает в среднем до 10-15. Кроме того, если поврежденное или здоровое дерево падает на землю (тип F), то на его поверхности также появляются и типичные почвообитающие нематоды из родов *Filenchus*, *Tylencholaimus*, *Wilsonema* и др. На данной стадии жизненного цикла дерева может присутствовать максимальное число родов нематод. При этом замечено, что чем больше разлагается поверхность дерева, тем меньше на нем обитает нематод, ассоциированных с водорослями, лишайниками и мхами, а развивается главным образом спектр сапробиотических видов. Таким образом, фауна нематод напрямую зависит от состояния поверхности дерева.

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСА КОРНЕВЫХ ПАЗАРИТИЧЕСКИХ НЕМАТОД НА ПРОДУКТИВНОСТЬ (*FESTUCA PRATENSIS HUDS.*) И (*PHLEUM PRATENSE L.*) В ЦЕНТРАЛЬНОМ РАЙОНЕ РФ.

Чижов В.Н., Буторина Н.Н., Перевертин К.А.

Центр паразитологии ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН, Ленинский пр., д.33., Москва, 119071, Россия; E-mail: chizhov@list.ru

Проведенные в течение трех лет учеты численности комплекса видов корневых паразитических нематод на посевах тимофеевки луговой (*Ph. pratense L.*) и овсяницы луговой (*F. pratensis Huds.*), на среднесуглинистых почвах Центрального района Нечерноземной Зоны РФ показали, что параллельно с общей оценкой снижения продуктивности злаков можно сделать вывод о существовании статистически значимой зависимости продуктивности растений от плотности популяций паразитических нематод. Чтобы уменьшить коэффициент вариации вороночного метода выделения нематод численность нематод учитывали в почвенной фракции с диаметром частиц до 1 мм. Максимальный естественный инвазионный фон в конце второго года вегетации приближался для овсяницы луговой – к 1900 экз/100 мл прикорневой почвы, а для тимофеевки луговой – к 1100 экз /100 мл соответственно, что определяет неприемлемые (до 50%) потери урожайной продукции.

Для снятия инвазионной нагрузки на пике численности приходящейся на август для данной почвенно-климатической зоны использовали гранулированный системный нематодцид карбофурановой группы Темик в дозе 4 г/пог.м.

Наиболее выраженная зависимость была отмечена при оценке связи плотности популяции корневых паразитических нематод в конце II-го вегетационного сезона - Р, особей/100 мл почвы и продуктивности растений на III-й год вегетации. –У, воздушно-сухая масса сена или семян г/пог.м.

В качестве прогностической модели использована классическая экспоненциальная модель Сейнхорста (Seinhorst J.W., 1965) в форме:

$$Y=Y_k \text{ (контроль); } P < T$$

$$Y=Y_k(m+(1-m)Z^{(P-T)}); P > T,$$

где параметры модели:

Y_k – урожайность в контроле в повторностях свободных от нематод; m – «минимальный» урожай- выраженное в долях от контроля значение выхода урожайной продукции при предельно возможных инвазионных нагрузках; Z – параметр меньше 1, характеризующий агрессивность/устойчивость во взаимоотношениях паразит/хозяин; T – порог толерантности (tolerance limit) – плотность нематод ниже которой потерь урожая не происходит.

Особо отметим, что аргумент функции – интегральная оценка зараженности почвы без родо-видовой дифференциации в наблюдаемом комплексе фитопаразитических нематод.

При расчете параметров апробирован новый логичный подход с предварительной оценкой T статистическими методами. Действительно при плотностях выше и ниже T мы имеем дело по сути с разными биологическими процессами – от классического паразитизма до контринтуитивного явления гормезиса (стимуляции продуктивности хозяина сверхмалыми инвазионными нагрузками). Адекватность модельных оценок практическим полевым наблюдениям характеризует коэффициент детерминации R^2 . Рассчитанные параметры модели сведены в таблицу.

Таблица 1 Параметры экспоненциальной модели Сейнхорста – зависимости выхода урожая многолетних трав от комплексной плотности паразитических нематод.

параметры	Y_k	m	Z	T	R^2
Тимофеевка Сено	240	0,5	0.99865	400	0,75
Тимофеевка семена	12	0.3	0.99763	320	0.81
Овсяница сено	106	0.4	0.99835	500	0.48
Овсяница семена	17	0.2	0.99781	250	0.62

Особенностью данного представления является единый формат – совместимость всех данных в едином масштабе выхода урожая. Обращает на себя внимание значительное – на порядок – различие оценки порога толерантности для семян и сена, т.е. продуктивность по семенам на порядок более уязвима для нематодной инвазии нежели общая биомасса. Это важное наблюдение подтверждается для обеих культур. То что максимальная скорость снижения продуктивности у тимофеевки луговой наступает при меньшей численности паразитических корневых нематод, чем у овсяницы луговой может объясняться как различной выносливостью растений-хозяев к комплексу корневых нематод так и различиями в качественном составе комплекса паразитов. У обоих хозяев в ризосфере доминировал вид *Helicotylenchus digonicus*. Суб-доминирующими в ризосфере тимофеевки луговой были виды *Paratylenchus microdorus*, *Pratylenchus pratensis*, *Macropostonia sp.* фрагментарно отмечен вид *Pratylenchus penetrans*. Суб-доминирующими в ризосфере овсяницы луговой были только *Paratylenchus microdorus* и *Macropostonia sp.*

Таким образом природный комплекс корневых паразитических нематод оказывает влияние на снижение семенной продуктивности тимофеевки при относительно меньшей численности паразитов, чем на снижение семенной продуктивности овсяницы. При оценке вредоносности нематод на массу семян злаков, максимальная скорость снижения продуктивности наступает при меньших значениях численности нематод, чем при той же оценке по массе сена. Это видно и по разнице в оценке параметра Z всегда меньшим для семян по сравнению с общей урожайной массой. Таким образом, можно говорить о большем воздействии популяции паразитических нематод на закладку и формирование репродуктивных органов, чем вегетативных органов данных многолетних злаков.

1. Доказана практическая приемлемость применения классической модели Сейнхорста для оценки потерь урожая многолетних трав от популяционной плотности комплекса свободноживущих фитопаразитических нематод без родо-видовой *дифференциации.

2. Обоснованной представляется идентификация аргумента $Pi-1$ в максимуме улавливаемых нематод с оценкой Y_i , т.е. например, урожай трав третьего года

детерминируется летним максимумом нематод второго года, в отличие от принятой для однолетних культур допосевной плотности P_i .

3. Предложен новый, логичный алгоритм расчета параметров critical point model с предварительным вычислением T (tolerance limit) статистическими методами, через НСР.

4. Феномен гормезиса (стимуляция урожая над контролем при меньших T популяционных плотностях) отмечен во всех случаях, что важно для цельности модели, но вряд ли может иметь практическое значение.

МОРФОЛОГИЯ СУППЛЕМЕНТАРНЫХ ОРГАНОВ НЕМАТОД СЕМЕЙСТВА TOBRILIDAE

Шошин А.В.¹, Шошина Е.А.²

¹ Зоологический институт РАН, С.-Петербург, 198342, Университетская наб.1,
E-mail: marineta@zin.ru

² Санкт-Петербургский государственный университет, С.-Петербург, 198342,
Университетская наб.7/9

Строению супплементарных органов наряду со строением стомы придаётся центральное значение в системе тобрилид. На основании этого признака выделяются отдельные роды, разбиение на подсемейства и трибы идёт на основании строения стомы, супплементарные органы остаются очень удобным объектом для выдвижения предположений об общей эволюционной "продвинутости", апоморфии того или иного таксона тобрилид.

На основании строения супплементов у тобрилид следует различать четыре основных типа настоящих супплементов. I — **простой погруженный** (погруженный по терминологии С.Я.Цалолихина), ежевидные супплементы разделяются на: II — **простой выпуклый**, III — **сложный с нижним положением луковички** и IV — **сложный с верхним положением луковички**.

Тип I — характерен для представителей рода *Tobrilus* (Цалолихин, 1981, 1983), *Lamuania* и *Semitobrilus*. Отличается небольшими размерами, наружные части супплементов слабо или совсем не выдаются над кутикулой, высота наружной части заметно меньше глубины ампулы супплементов, луковичка находится в основании ампулы. Имеются две вариации строения супплементов.

Вариация «amabilis», морфологически наружная часть супплементов сходна с обычной соматической щетинкой, отличаясь только большим диаметром (Рис. 1).

Вариация «gracilis», наружная часть супплементов приобретает все характерные черты «настоящего» супплементов, т.е. в основании лежат плечики, покрытые многочисленными микрошипиками, сверху расположен короткий центральный шипик основание которого слегка раздуто, что можно трактовать как будущую шапочку супплементов (Рис. 2).

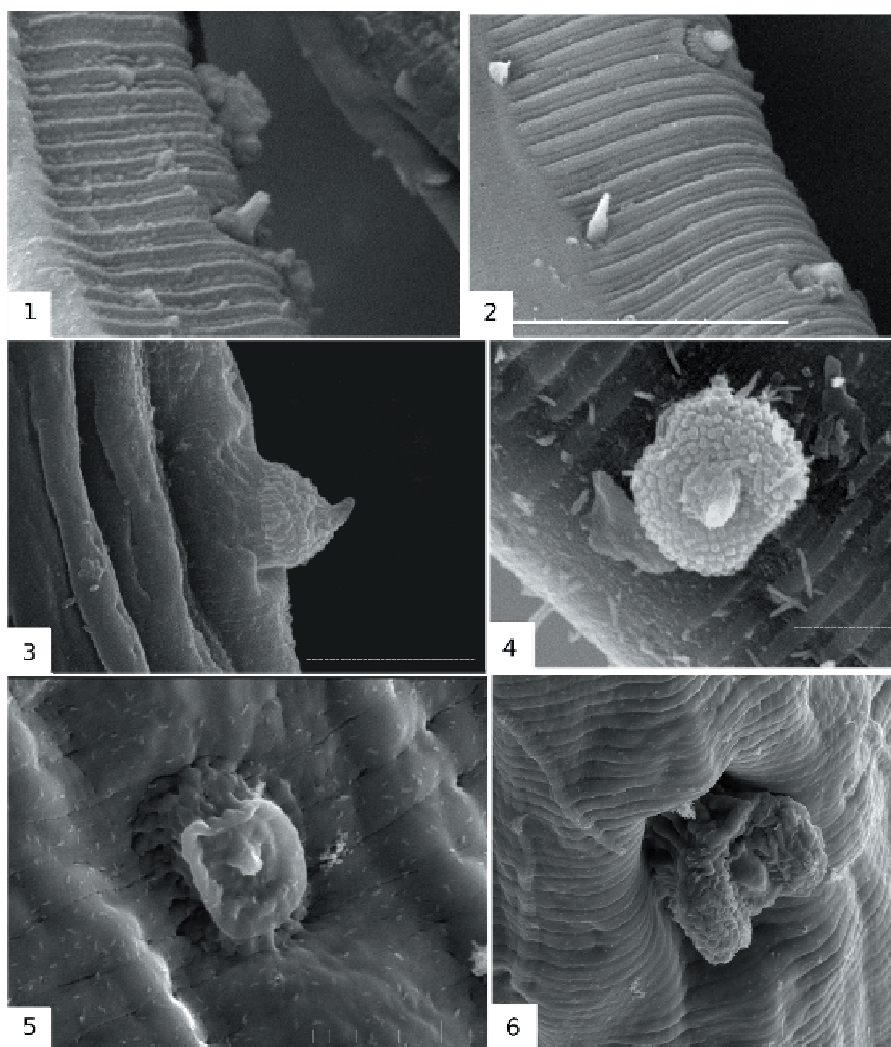
Тип II — характерен для некоторых представителей рода *Eutobrilus* (*E. peregrinator*, *E. prodigiosus*, *E. strenuus*, *E. nothus*). Эти супплементы очень похожи на супплементарные органы I типа от которых отличаются выпуклыми плечиками, высоко поднимающимися над кутикулой, плечики покрыты большим количеством микрошипиков. Луковица супплементов расположена в основании ампулы, сам супплемент несмотря на то, что может быть очень крупным, неподвижен и не может втягиваться внутрь тела. От супплементов III и IV типа отличается отсутствием ясно выраженной шапочки (Рис. 3).

Тип III. Супплементы этого типа отличаются появлением шапочки, покрытой микрошипиками, которая отделяется четко выраженной кольцевой складкой от расположенных ниже плечиков. Луковица супплементов расположена в основании ампулы, шапочка приобретает некоторую подвижность, т.е. может втягиваться до некоторой степени

внутри супплементы. Характерен для незначительной части видов рода *Eutobrilus* (триба Tobrilini) — *E. graciliformes*, *E. papilicaudatus*, *E. differtus*, *E. arcticus* (?), *E. angarensis* (?) и для рода *Mesotobrilus* (триба Paratrilobini) (Рис. 4).

Тип IV — отличается от предыдущего тем, что луковичка супплементы расположена прямо в шапочке, шапочка имеет большую подвижность и может втягиваться вместе с плечиками целиком внутрь, супплементы могут достигать гигантских размеров. Супплементы IV типа заметно различаются в своем строении среди видов тобрилид подсемейств Tobrilinae и Neotobrilinae. У самцов рода *Neotobrilus* супплементарные органы представлены в виде двух модификаций — первые три от клоаки очень маленькие, последующие три без преувеличения можно назвать гигантскими, способны втягиваться вовнутрь (Рис. 5, 6).

По мнению В.В.Малахова (1986) органы чувств нематод происходят от неспециализированных сенсорно-железистых органов в виде соматических щетинок или пор в кутикуле отдалённых предков нематод. Происхождение и эволюция сложно устроенных супплементарных органов тобрилид может служить очень хорошей иллюстрацией этого процесса.



Морфология супплементарных органов тобрилид:

1 – *Tobrilus amabilis*, супплемент тип I вариация “amabilis”; 2 – *Tobrilus gracilis*, супплемент тип I вариация “gracilis”; 3 – *Eutobrilus* sp., супплемент тип II; 4 – *Mesotobrilus delicatus*, супплемент тип III; 5,6 – *Neotobrilus filipjevi*, супплемент тип IV, малый и гигантский супплементы.

МОРФОЛОГИЯ И ЭВОЛЮЦИЯ ГУБНОЙ ОБЛАСТИ НЕМАТОД СЕМЕЙСТВА TOBRILIDAE

Шошин А.В.¹, Шошина Е.А.²

¹ Зоологический институт РАН, С.-Петербург, 198342, Университетская наб.1, E-mail: marineta@zin.ru

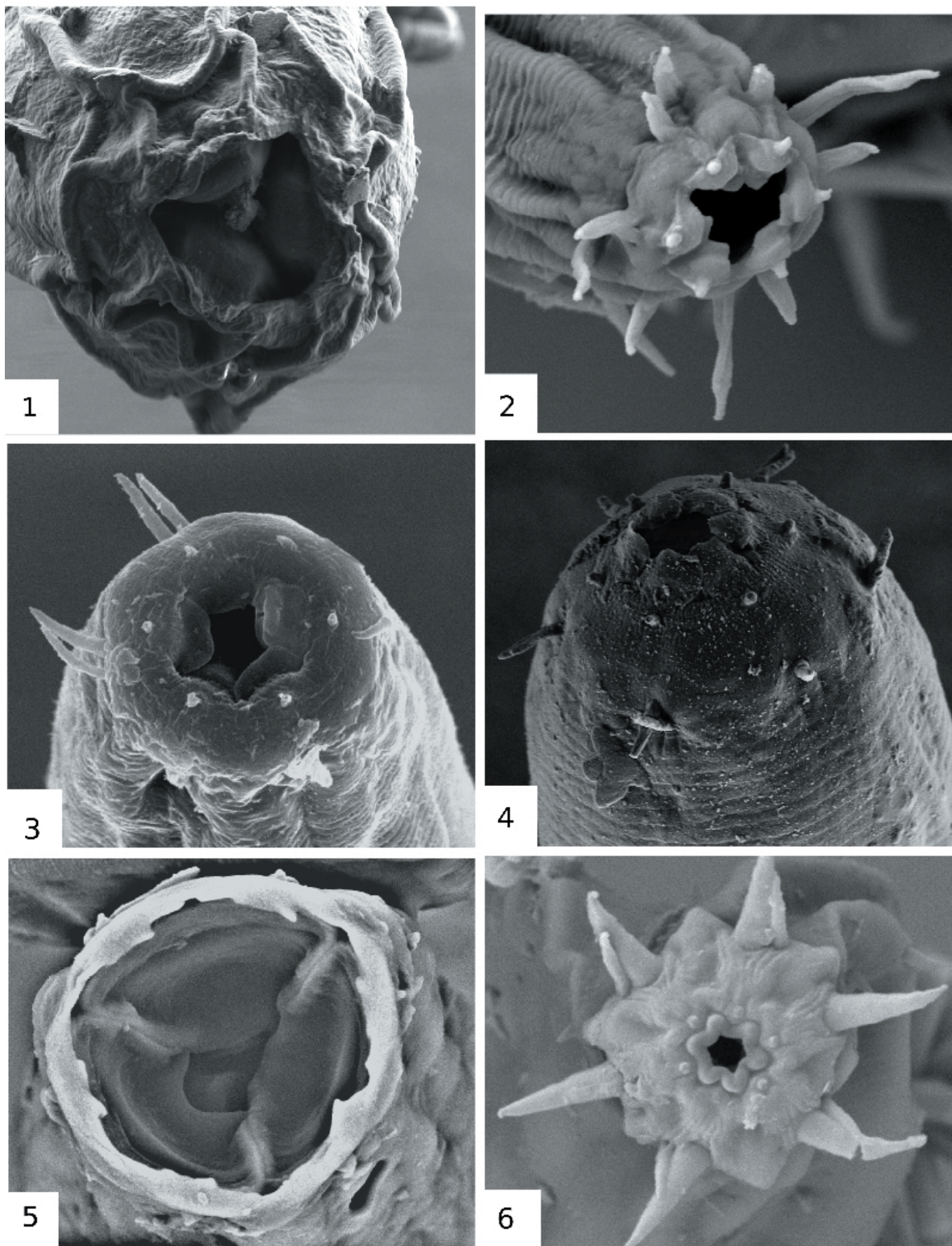
² Санкт-Петербургский государственный университет, С.-Петербург, 198342, Университетская наб.7/9, E-mail: midsummer92@mail.ru

Строение губной области является новым признаком, который ранее не использовался при описании тобрилид из-за сложности наблюдения. В результате данного исследования было описано строение губной области 14 видов из 7 родов трех подсемейств семейства Tobrilidae *Asperotobrilus holophagus*, *Asperotobrilus aculeatus*, *Tobrilus gracilis*, *Setsalia magnifica*, *Eutobrilus fortis*, *Eutobrilus sp.1*, *Eutobrilus sp.2*, *Eutobrilus grandipapillatus*, *Eutobrilus delamarei*, *Lamuania orientalis*, *Kurikania tsalolikhini*, *Paratrilobus sp.*, *Mesotobrilus delicatus*, *Neotobrilis filipjevi* и *Tripyla sp.* из семейства Tripilidae.

Обнаруженные варианты строения можно разделить в зависимости от типа симметрии: трехлучевая, шестилучевая. Либо в зависимости от особенностей строения губ: отдельные или сросшиеся эластичные. Самым примитивным в пределах тобрилид является трехлучевая симметрия губной области, характерная для вида *Asperotobrilus aculeatus* (Рис. 2). Базовым состоянием губной области для тобрилин и неотобрилин следует считать шестилучевую симметрию с относительно большими, закрывающие полностью ротовое отверстие, губами, расположенными симметрично (Рис. 3, 4). В данных случаях строение ротового аппарата не показывает никаких черт специализации, или специализация не значительна.

Но также были выявлены общие черты специализации ротового аппарата тобрилид с известным типом питания. Для диатомоядных тобрилид характерны: стома коническая, складчатая, с выраженными подщечными буграми, вооружение стомы редуцировано либо отсутствует. Губы срослены в кольцо (Рис. 6). Для тобрилид макрохищников выявлены следующие черты: стома с склеротизованными стенками и мощным вооружением, ротовое отверстие широкое, губы редуцированы (Рис. 5).

Рассматривая вопрос происхождения губ следует обратиться к, предположительно, сестринской группе, сем. Tripylidae, обладающей трехлучевой симметрией губной области (Рис. 1) и примерно сходное состояние можно обнаружить у представителя, по видимому, самого примитивного среди тобрилид рода *Asperotobrilus*.



Морфология губной области нематод семейств Tobrilidae и Tripylidae:

1 – *Tripyla* sp.; 2 – *Asperotobrilus aculeatus*; 3 – *Mesotobrilus delicatus*; 4 – *Lamuania orientalis*; 5 – *Setsalia magnifica*; 6 – *Eutobrilus* sp.

**РАЗМНОЖЕНИЕ МИКОГЕЛЬМИНТОВ *APHELENCHUS AVENAE*, *PARAPHELENCHUS TRITICI*,
APHELENCHOIDES SAPROPHILLUS НА МИЦЕЛИИ ГРИБА *MICRODOCHIUM NIVALE*,
ВОЗБУДИТЕЛЯ РОЗОВОЙ СНЕЖНОЙ ПЛЕСЕНИ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ**

Щуковская А.Г., Ткаченко О.Б., Шестепёров А.А.
ФГБУН Главный Ботанический Сад им. Н.В. Цицина РАН, г. Москва, 127276 ул.
Ботаническая, 4. Россия; E-mail: otkach@postman.ru

В Нечерноземной зоне РФ озимые культуры на больших площадях поражаются розовой снежной плесенью (возбудитель гриб *Microdochium (Fusarium) nivale* (Fr.) & I.C. Hallet), что приводит к значительному ослаблению растений, к уменьшению кустистости растений и продуктивности колоса, что в свою очередь влияет на недобор урожая (Щуковская, 2004). *M. nivale* относят к низкотемпературным грибам – возбудителю снежной плесени, который способен развиваться под снеговым покровом. Низкотемпературные грибы способны развиваться и заражать растения при низких положительных температурах от 0⁰С до +7⁰С (Ткаченко, 2012).

В развитии этого грибного заболевания немаловажную роль играют фитонематоды различных экологических групп (Щуковская, 2004). Взаимоотношения между грибами и нематодами могут быть самыми разнообразными. В зависимости от этого возрастает, убывает или остаётся неизменной биомасса одного вида в присутствии другого. В зимний период в растениях озимой пшеницы, поражённой розовой снежной плесенью, были обнаружены микогельминты (*Aphelenchoides saprophillus* Franklin 1957, *Paraphelenchus tritici* Baranowskaja 1958, *Aphelenchu savana* eBastian, 1865). В местообитаниях нематод температура прямо влияет на процессы развития, роста, питания, размножения, движения и на другие проявления их жизнедеятельности. Прямое воздействие температуры особенно заметно проявляется на скорости роста популяции (Шестепёров, Савотиков, 1995).

Целью наших исследований было изучение размножения нематод-микогельминтов на мицелии гриба *M.nivale* при температурах +5⁰С, +15⁰С и +27⁰С.

Материалом для наших исследований служили сборы поражённых розовой снежной плесенью растений озимой пшеницы. Для извлечения нематод из различных органов растений и почвы применяли модифицированный вороночный метод Бермана. Из выделенных видов нематод отбирали микогельминтов (в кол-ве 3-10 экз.) и помещали их в пробирки (20×200 мм) с мицелием гриба *Alternaria tenuis* Nees, выращенных по стандартной методике, при температуре +15-20⁰С. После того, как в пробирках с *A.tenuis* мицелий гриба был уничтожен, выделяли нематод вороночным методом и подсчитывали их количество. Из суспензии нематод отбирали по 100 экз. (±20 экз.) и пересаживали их в пробирки с мицелием гриба *M. nivale*. Когда мицелий гриба был съеден, нематод смывали с поверхности пробирки, а потом выделяли из питательной среды вороночным методом нематод и подсчитывали их количество.

Размножение нематод-микогельминтов на мицелии гриба *M.nivale* наблюдали при трех температурах: +5⁰С, +15⁰С и +27⁰С. Для этого отбирали пробирки с равномерно развитым мицелием. Засеянные пробирки были инвазированы водной суспензией микогельминтов, в количестве 100 (±20 экз.) на одну пробирку, после чего их поместили в климокамеру Sanyo MPR-311D(H) при температурах +5⁰С и +15⁰С и в термостат ТВ3-25 при +27⁰С. Каждую серию опыта анализировали, когда в большинстве пробирок мицелий гриба был съеден микогельминтами. После того как мицелий полностью исчез с поверхности питательной среды, нематод выделяли и подсчитывали их количество.

Исследования проводили по следующей схеме:

1. Гриб *M. nivale* + микогельминт *A. saprophillus* - 100 (± 20) экз.
 2. Гриб *M. nivale* + микогельминт *A. avenae* 100 - (± 20) экз.
 3. Гриб *M. nivale* + микогельминт *P. tritici* 100 - (± 20) экз.
- Повторность опыта 6-ти кратная (1 повторность – 1 пробирка).

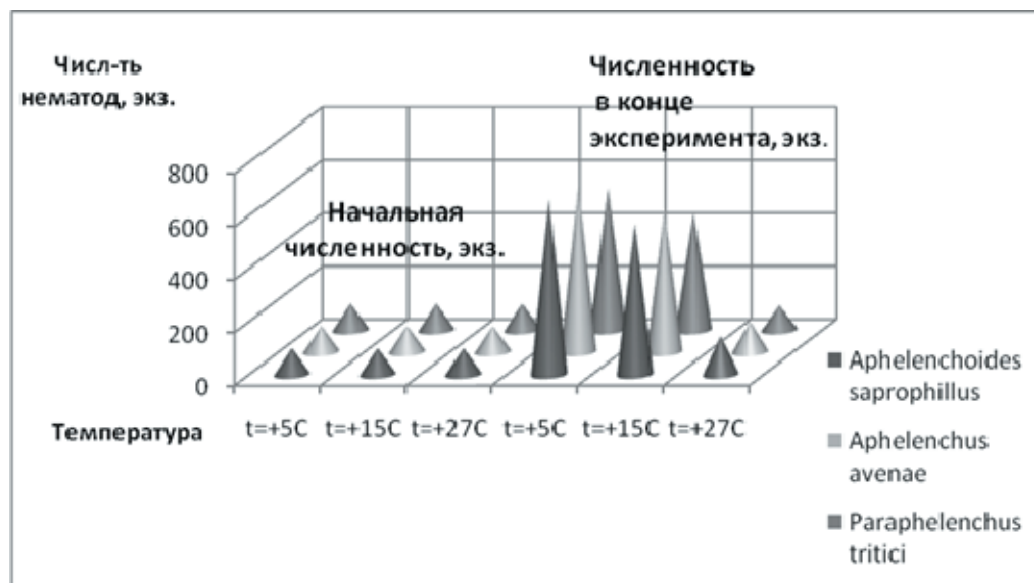


Рис.1. Влияние температуры на размножение микогельминтов на культуре гриба *Microdochium nivale* при 5⁰С, +15⁰С и +27⁰С.

При +5⁰С вид *P. tritici* уничтожил мицелий гриба *M. nivale*, в течение 70-75 дней. Численность его при этом составила - 563 экз. на пробирку. При +15⁰С мицелий гриба, вследствие питания микогельминта, исчез за 40-45 дней, численность популяции вида была – 444 экз. на пробирку. Температура +27⁰С оказалась неблагоприятной для вида *P. tritici*: численность (93 экз.) нематод была меньше, чем первоначальный инокулюм (Рис.1).

Вид *A. avenae* при +5⁰С полностью уничтожил мицелий гриба за 70-75 дней, численность популяции вида была – 627 экз. на пробирку. При культивировании *A. avenae* при +15⁰С обнаружено, что *A. avenae* обладает меньшей скоростью размножения, что естественно сказало на численности вида – 536 экз. на пробирку. При +27⁰С численность *A. avenae* не превышала первоначальную (116 экз. на пробирку) (Рис.1).

Температура +5⁰С оказалась благоприятной для культивирования микогельминта *A. saprophillus*. Этот вид использовал все пищевые ресурсы, за 60-65 дней, численность его при этом составила – 661 экз. на пробирку. При +15⁰С *A. saprophillus* уничтожил мицелий гриба *M. nivale* за 40-45 дней, но численность популяции была меньше, чем при +5⁰С – 536 экз. на пробирку. При температуре +27⁰С размножения вида отмечено не было.

Температура +5⁰С оказалась наиболее благоприятной для культивирования микогельминтов *P. tritici*, *A. avenae* и *A. saprophillus* на мицелии гриба *M. nivale*. Коэффициент размножения при этой температуре у всех видов колебался от 4,8 до 7,1, при этом нематоды использовали все представленные пищевые ресурсы (мицелий гриба *M. nivale*) за 50-75 дней. Однако при температуре +15⁰С скорость размножения у микогельминтов уменьшилась (коэффициент размножения – 4,65-6,09), что естественно сказало на численности популяции (*P. tritici* – 444 экз. на пробирку, *A. avenae* – 536 экз. на пробирку и у *A. saprophillus* – 570 экз.). В пробирках, хранившихся при этой температуре, были отмечены единичные погибшие особи, что не наблюдалось в пробирках при температуре +5⁰С. В тоже время, у видов *P. tritici*, *A. avenae* и *A. saprophillus* при температуре +27⁰С не зарегистрировано размножения (коэффициент размножения – 1,14-1,48). К тому же, при

этой температуре во многих пробирках погибли практически все нематоды. Наибольшая скорость размножения при температурах +5⁰С и +15⁰С, наблюдалась у микогельминта *A. saprophillus*. Его численность была в 1,5 раза выше, чем у других видов.

Температура культивирования также оказывала влияние на половой и возрастной состав популяций. У видов *P. tritici*, *A. avenae* и *A. saprophillus* с увеличением температуры с +5⁰С до +15⁰С зарегистрировано увеличение численности личинок (*P. tritici* с 70,4 % до 77,8 %; *A. avenae* с 80,5 % до 91 % и у *A. saprophillus* с 85,4 % до 92,2 %). Скорей всего это можно объяснить тем, что многие половозрелые самки погибали при более высокой температуре. При +27⁰С резко сокращалась численность личинок видов, скорей всего личинки просто не успевали выйти из яиц. С увеличением температуры до +15⁰С у нематод *A. saprophillus* отмечено увеличение численности самцов с 2-х до 10 %.

Таким образом, анализ полученных данных по культивированию трёх видов микогельминтов на грибе *M. nivale* показывает, что температура влияла на размножение нематод, на сроки использования представленных пищевых ресурсов, на половой и возрастной состав. Установлено, что температура +5⁰С является благоприятной для размножения трёх видов нематод, а общая численность нематод при данной температуре была почти в 1,5 раза выше, чем при +15⁰С и +27⁰С.

Вид *A. saprophillus* оказался наиболее агрессивным по отношению к низкотемпературному грибу *M. nivale*. Он не только смог уничтожить весь мицелий, но и достиг при этом высокой численности популяции. Это объясняется его оригинальным свойством – способностью питаться и размножаться при пониженных температурах.

Микогельминты, способные питаться и размножаться при пониженных температурах, возможно, могут быть использованы как потенциальные биоагенты в борьбе с розовой снежной плесенью озимой пшеницы.

ЛИТЕРАТУРА

- Ткаченко О.Б. Распространение и круг растений-хозяев наиболее опасных возбудителей снежных плесеней, склероциальных грибов // Бюллетень ГБС. – 2012. – Вып.168. №4. – С.64-71.
- Щуковская А.Г. Фитонематоды озимой пшеницы, поражённой розовой снежной плесенью // Мат. науч. конф. «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями». – М. – 2004. – вып.5. – С. 437-440.
- Шестепёров А.А., Савотиков Ю.Ф. Карантинные фитогельминтозы. Кн.1. М.: Колос, 1995. С. 464.

ВЛИЯНИЕ АРАХИСОВОЙ ГАЛЛОВОЙ НЕМАТОДЫ - *MELOIDOGYNE ARENAREA* НА СТРУКТУРУ КОРНЕЙ ТОМАТА

Эшова Х.С., Саидова Ш.О.

Национальный университет Узбекистана, 100099, ул. А.Буриев, 34, г Ташкент
Узбекистан; E-mail: kholisa.eshova@mail.ru

Галловой нематодой заражено около 2000 видов культурных и диких растений, принадлежащих к различным семействам, и с каждым годом число их увеличивается [2]. Томат входит в число 15 культур-лидеров, составляющих 85% мирового сельскохозяйственного производства [4]. Значительный ущерб урожаю томата, как известно, наносят фитогельминты специфического патогенного эффекта, в частности галловые нематоды рода *Meloidogyne*.

Целью исследования было изучить влияние арахисовой галловой нематоды - *Meloidogyne arenarea* на структуру корней томата.

Материалом исследования служили растения: томат обыкновенный - *Lycopersicum esculentum* L. Фитообъекты были искусственно заражены галловой нематодой- *Meloidogyne arenaria*. Заражение производилось в фазе начала вегетации томата в экспериментальной теплице ботанического сада биолого-почвенного факультета НУУз. Паразитические нематоды вносили в исследуемые растения в виде водной суспензии, содержащей 3700 ± 200 личинок галловых нематод – *M. arenaria* для каждого растения томата. Все опытные группы фитообъектов культивировали на одном и том же участке в теплице с идентичными для всех условиями. Контрольную группу незараженную галловыми нематодами растений выращивали там же, избегая контакта с инвазированными растениями. Для каждого объекта исследования брали выборку из 25 зараженных растений, предварительно отобранных по сходным внешним анатомическим признакам, отличающимся от контрольной группы. Сбор материала производили через 3 месяца в фазу плодоношения. Главный корень очищали от почвы, которую исследовали на наличие галловых нематод инкубаторным методом [3]. Анатомическое строение осевых органов изучали на материале, фиксированном в 70% этаноле, по общепринятой методике [1]. Материал срезали с микротомом толщиной 5-6 мкм, окрашивали метиловым синим и сафранином. Всего было изготовлено 25 микропрепаратов.

На поперечном срезе в незараженном помидоре корень покрыт пробкой, коровая паренхима смята за счет заложения феллогена. Флоэма обширная. Функционирует многорядный камбий. Позже образовавшиеся сосуды крупнее, чем первоначальные. Они расположены одиночно и группами 3-4. Радиальные лучи в ксилеме 1-2 рядные, распираются на флоэме. Возле сосудов радиальные лучи изгибающиеся. Между сосудами древесина тонкостенная, в большинстве случаев форма округлая и редко 4-5 угольные углы малозаметные (Рис. 1.А).

Галловые нематоды оказывают на растение непрерывное воздействие на протяжении всей его вегетации, в пораженных органах постоянно находится некоторое количество особей. Выделяемые нематодами ферменты отрицательно влияют на ткани растений. При этом нарушаются коррелятивные взаимосвязи физиологических процессов, происходящих в растительных органах, нарушается дифференциация клеток и тканей, вследствие чего возникают патологические новообразования – галлы. Патологические признаки главного корня и боковых корней томата при инвазии фитогельминтом *M. arenaria* проявлялись галлообразованием. Галлы на главном корне всегда были крупнее, чем на боковых корнях, и на каждом из них присутствовала самка нематоды в виде светло-коричневой «горошины» с заостренным концом. Размер галла прямо пропорционально зависел от количества расположенных на нем самок (Рис.1.Б).

Каждая личинка фитонематоды 2-го возраста после вторжения в корешок растения - хозяина вызывала образование специальной питающей паразита зоны. Патологические признаки тканей и клеток, прежде всего, касались сосудистого пучка и паренхимы вокруг него. Стенки флоэмы и ксилемы были значительно утолщены, деформированы. Голова седентарной личинки располагалась почти в центре галла. Вблизи головы обнаружили гигантские многоядерные клетки – ценоциты. На одну нематоду приходилось в среднем 4-7 таких клеток. Ценоциты были окружены гидроцитными клетками, а вокруг них была выявлена гиперплазия прилегающих соседних клеток паренхимы. Через эти видоизмененные паренхиматозные клетки происходил транспорт веществ к питающим клеткам, сохраняя жизнеспособность развивающейся нематоды и растения-хозяина. В зоне питания и вблизи тела нематоды часто наблюдали неравномерно утолщенные стенки паренхиматозных клеток первичной коры корня. Такой морфо - функциональный механизм, выраженный процессами гипертрофии тканей растения-хозяина, можно расценивать как создание сеногостального защитного барьера. Самка *M. arenaria* представляла собой оотеку

с заключенными в ней яйцами и личинками, располагающаяся в паренхиме корня. Ценоцитий формировался возле головы фитонематоды, рядом находилась группа сильно увеличенных в размере (в три - четыре раза больше клеток паренхимы) гидроцитных клеток (Рис.1.С).

В паренхиматозных клетках под давлением растущей самки наблюдались компрессионные изменения: клеточная стенка истончалась и деформировалась, а сами клетки приобрели плоскую прямоугольную форму. По мере развития яиц и личинок самка увеличивалась в размере, принимала округлую форму, затем ткани тела самки атрофировались, а оотека продолжала автономное существование, обеспечивая жизнедеятельность яиц и личинок за счет ценоцития (Рис.1.Д).

При заражении арахисовой галловой нематодой в тканях томатов происходят патологические изменения. При развитии личинок арахисовых галловых нематод и образовании гигантских клеток на корнях томата нарушается функция проводящих тканей корня. В результате поступающие в растения с водой минеральные элементы, питательные вещества расходуются на содержание личинок галловых нематод. Урожайность растений снижается.

Таким образом, галловые нематоды влияют на структуру томата: видоизменяется корневая система растения, нарушается рост и развития. Патологические признаки на корнях томата проявляются галлообразованием образованием гигантских клеток - ценоцитов, и гидроцитных клеток.

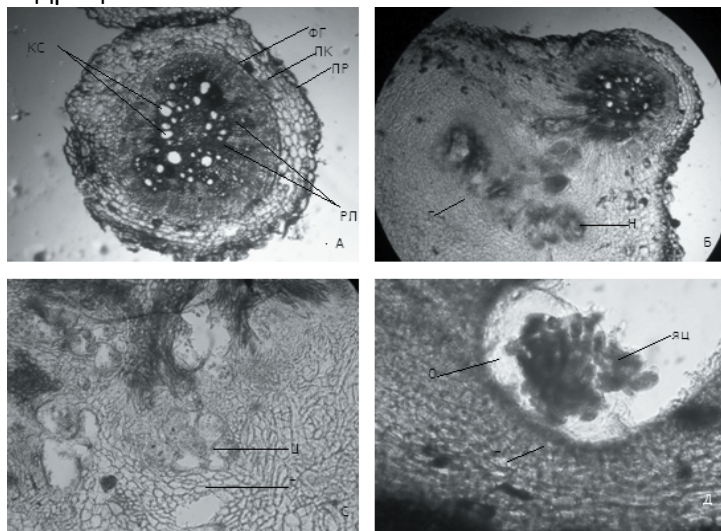


Рис. 1. Фрагмент корня томата, незараженный и зараженный галловыми нематодами. ФГ-феллоген, ПК-первичная кора, ПР-перидерма, КС-ксилема, РЛ-радиальные лучи, Н-нематода, О-оотека, Ц-ценоцитий, Г-гидроцитные клетки, ЯЦ-яйцо нематоды. Микрофото. Увел. Ок. 3,5.Об.7,5 (А,Б). Ок. 3,5.Об.20 (С,Д).

ЛИТЕРАТУРА

- Барыкина Р.П., Костринова Л.Н., Кочемарова И.П., Лотова Л.И., Транковский Д.А., Чистякова О.Н. Практикум по анатомии растений.-М.: Росвузиздат, 1963.-184с.
- Васюкова Н. И., Зиновьева С. В., Удалова Ж. В., Герасимова Н. Г., Озерецковская О. Л., член корреспондент РАН М. Д. Сонин Жасмоновая кислота и устойчивость томатов к галловой нематоды // Доклады академии наук, 2009, том 428, № 3, с. 420–422.
- Метлицкий О.З., Гуськова Л.А. Методы изучения вредоносности нематод в полевых условиях // Матер. симп. «Принципы и методы взаимоотношений между параз. Нем. и растениями». - Тарту.-1979.-С.61-70.
- Накормить 8000000000 и сохранить планету // Семена, 2000. №6.-С. 13-14.



10th International Nematological Symposium
and school on nematology for young scientists

Proceedings

July 01-05, 2013

Golitsyno – Bolshie Vyazemy

Editorial Board:

- M.V. Pridannikov *PhD., Russian Research Institute of Phytopathology,
Centre of Parasitology IEE RAS, Moscow*
- Zh.V. Udalova *PhD, Centre of Parasitology IEE RAS, Moscow*
- N.N. Butorina *PhD, Centre of Parasitology IEE RAS, Moscow*

E6Я431 **Prossedings of the 10th International Nematological Symposium.** Bolshe Vazemy:
Russian Research Institute of Phytopathology, 2013. 135 p.

The editions is collected scientific papers contributed to the 10th International Nematological Symposium of Russian Society of Nematologists and school of young scientists (July 01-05, 2013, Moscow region Golitsyno – Bolshie Vyazemy, Russia). The papers cover issues of fundamental and applied nematology: ecology of populations, nematode phylogenetic and taxonomy, actual problem of monitoring, nematode pest management and study of host-parasite interactions.

The symposium has been supported by

International Scientific and Technology Center

Agricultural Research Service (ARS USDA)

Russian Foundation for Basic Research (# Г 13-04-06042\13)

Non-Profit Foundation «Dynasty» (#ДП-СШ-03/13)

CJSC «Schyolkovo Agrochim»



© Composite autors, 2013

© Russian Research Institute of Phytopathology and
Centre of Parasitology IEE RAS, 2013

Organizers:

Russian Society of Nematologists

Russian Research Institute of Phytopathology

A.N. Severtsov Institute Ecology and Evolution

Supported by:

**Department of Biological Science of
the Russian Academy of Science**

**Department of Plant Protection and Biotechnology of Plants of
the Russian Academy of Agriculture Science**

Sponsored by:



International Scientific and Technology Center



Agricultural Research Service (ARS USDA)



Russian Foundation for Basic Research



Non-Profit Foundation «Dynasty»



CJSC «SChyolkovo Agrochim»



Content:

Abd-Elgawad M.M.M., Omer E.A., Ismail, R.F. Effect of plant extracts of some medicinal plants on phytonematodes in Egypt	96
Abd-Elgawad M.M.M., Jian H., Qiao Y., Hammam M.M.A. Entomopathogenic nematodes and their potential against insects and phytonematodes in Egypt	98
Anikieva L. Structure and functioning of the parasitic system nematodes <i>Toxascaris leonina</i> - parasite predatory mammals	101
Baicheva O., Udalova Zh., Zinovieva S., Gerasimova N., Damianova A. The effect of compounds of chitosan with salicylic acid on the infection of tomato plants by <i>Meloidogyne incognita</i>	102
Belogurova L.S. Meiobenthos of the deep area of peter the great bay (Sea of Japan) and communities of free-living nematodes	102
Bert W., Janssen T., Slos D., Kolombia .A.Y., Claeys M., Couvreur M., Mermans C., Ensafi P., Quisado J.S., Xue Q., Karssen G., Yushin V.V., Decraemer W. Nematode morphology, taxonomy and phylogeny at ghent university: A diversity of integrated toolkits	103
Blyummer A.G., Rivkus J.Z. Nematode infestation as a factor of influence on the populations of <i>Coptosylla lamellifer rostrata</i> Ioff et Tifl., 1934 (Syphonaptera, Coptosyllidae) parasitizing on the gerbils in the central and southern Kyzyl-Kum	103
Butova K. B., Pridannikov M. V. Plant-parasitic root-knot nematode <i>Meloidogyne hapla</i> in Russia	104
Čermák V., Čudejková M., Mikušková K., Tománková K., Gaar V. Description of a <i>Bursaphelenchus</i> sp. (Nematoda: Parasitaphelenchidae) from peat substrate of hop seedlings from the Czech Rpublic	104
Chizhov V.N., Butorina N.N., Perevertin K.A. Influence of a root parasitic nematode complex on productivity of fescue (<i>Festuca pratensis</i> Huds.) and timothy grass (<i>Phleum pratense</i> L.) In central region of Russia	105
Claeys M., Yushin V.V., Bert W. High pressure freezing (HPF) and automatic freeze substitution (AFS): innovative techniques for transmission electron microscopy (TEM) in nematology	105
Dababat A.A., Erginbas-Orakci G., Braun H.J., Comez H., Dreisigacker S. Novel source/s of resistance to cereal nematodes '<i>Heterodera</i> spp and <i>Pratylenchus</i> spp' in spring and winter wheat varieties	106
Efeykin B.D., Mikhailov K.V., Aleshin V.V., Spiridonov S.E., Panchin Yu. V. Phylogenetic relationships of nematodes and nematomorphs as inferred from sequence analysis of ribosomal proteins (RPL-RPS)	106
Eshova Kh., Saidova Sh.O. Influence of root-knot nematode <i>Meloidogyne arenaria</i> on structure tissues of tomato roots	107
Fadeeva N., Mordukhovich V. Metazoan meiofauna from the north-western slope of the Sea of Japan with emphasis on free-living nematodes assemblages	107
Grucmanová Š., Holuša J. Nematoda of double-spined spruce bark beetle <i>Ips duplicatus</i> (Sahlberg, 1836) from Central Europe	108
Guzeeva E.A., Yushin V.V. Structure and development of spermatozoa in the Thelastomatid nematodes (Rhabditida: Oxyuridomorpha: Thelastomatidae)	109

Guzeva E.A., Kosevich I.A., Spiridonov S.E. Molecular-taxonomic study of two pinworm species of the genus <i>Pseudonymus</i> (Oxyuridomorpha: Thelastomatoidea: Pseudonymidae) from water beetles (Coleoptera: Hydrophilidae) of the Astrakhan state reserve	110
Handoo Z.A., Mowery J.D., Chitwood D.J. The history of the USDA nematode collection and its database: valuable resources for taxonomic research and identification	110
Janssen T., Karssen G., Couvreur M., Bert W. Phylogeny, taxonomy and evolution of reproduction within the nematode genus <i>Pratylenchus</i>: a multi-gene approach combined with karyotyping	113
Khudyakova E.A., Sudarikova S.V. Validation of the FLASH-PCR method for identification <i>Globodera rostochiensis</i> (Woll.) Behrens	113
Khusainov R.V. Fauna and ecology of wood-habiting nematodes from brittle willow (<i>Salix fragilis</i>) in Russian central European part	114
Kolesova E.A., Shesteporov A.A. Development of a computer model "forecast yield loss of potato depending on the intensity of globoderoz"	114
Koohkan M., Shokoohi E. Preliminary study for mass production of <i>Mylonchulus</i> sp. in laboratory condition	115
Korma A.M. To biology of nematodes of genus <i>Bursaphelenchus</i> East Poles'ya of Ukraine	115
Koropets S.I. Specifics of scotch pine seedlings nematodosis development, problems of their diagnostics and the forecast	115
Kosaka H., Sayama K., Kanzaki N., Makino S. Host range and geographical distribution of <i>Sphaerularia vespae</i>, a parasite of hornets	116
Kosheleva T.N. morphological anomalies of free-living marine nematodes of the Black Sea	116
Kudrin A., Lapteva E. Natural flooding effects on soil nematodes communities	117
Kulinich O.A., Arbusova E.N., Kozyreva N.I., Mazurin E.S., Romashova N.B., Kolychikhina M.S., Ryss A.Yu. <i>Bursaphelenchus mucronatus</i> nematodes and their associated bacteria as a possible cause of the pine forest death in Russia	119
Lavrova V.V., Sysoeva M.I., Matveeva E.M. Temperature priming – a base of enhanced of plant resistance to phytonematode	120
Matveeva E.M., Sushchuk A.A., Diyeva D.S. Soil nematode communities under annual and perennial crops	120
McGawley E.C., Overstreet C., Pontif M.J. Variation in reproduction and pathogenicity of geographic isolates of <i>Rotylenchulus reniformis</i> on cotton in America	121
Mehdizadeh S., Shokoohi, E. Seasonal distribution of free-living and plant parasitic nematodes in the rhizosphere of apple in Kerman province of Iran	121
Migunova V.D., Lychagina S.V. Nematodes associated with vegetable cultures in greenhouses of Saratov region	122
Mironenko N.V., Rogozina E.V., Limantseva L.A., Afanasenko O.S. Fitness of pathotype Ro1 <i>Globodera rostochiensis</i> on partially resistant potato hybrids	122
Mladenov A., Lazarova S., Elshishka M., Mincheva Y., Peneva V. Impact of ski runs on soil nematode assemblages from different habitats on North Pirin Mountain – preliminary results	123

Nadi M., Shokoohi E., Troccoli A. Molecular analysis of <i>Helicotylenchus</i> cf. <i>digonicus</i> from south of Iran based on sequence of the 28S ribosomal DNA	123
Noweer E.M.A. Occurrence and morphological of nematode- antagonistic fungi associated with prevalent nematodes in Abd-Elamad region soils (Giza Egypt)	124
Oro V. <i>Heterodera avenae</i> from Serbia and its phylogenetic connections with similar populations	124
Pousis C., Troccoli A., Park B.Y., Fanelli E., D’Addabbo T., Veronico P., Radicci V., De Luca F. Metagenomic approach for the analysis of nematode diversity and their use as biological indicators	128
Pridannikov M.V., Petelina G.G. ISTC project on the biodiversity of plant parasitic nematodes in russia as a basis for multifocal international research of plant parasitic nematodes in Eurasia	130
Rashidifard M., Shokoohi E., Hoseinipour A., Jamali S. Evaluation of some plant extracts on mortality of larvae (J2) of citrus nematode	131
Renčo M., Sasanelli N. <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> effect of chestnut tannin solutions on the potato cyst nematode <i>Globodera pallida</i> pathotype Pa2	131
Romanenko N.D., Perevertin K.A., Popov I.O., Popova E.N., Petrunya I.V. On the incidence of mixed viral infections and their effects on the yield of potato tubers	134
Romanenko N.D., Perevertin K.A., Metlitskaya K.V., Zayets V.G., Tabolin S.B., Popova E.N., Popov I.O., Petrunya I.V. A study of biological and economic efficiency of fungal and bacterial antagonists and their possible use in plant protection	134
Romanenko N.D., Tabolin S.B., Titova A.S. On the development of environmentally friendly protective measures against pests on strawberry	134
Ryss A. The history of Russian nematology: Zoological Institute St. Petersburg	135
Ryss A., Andreev M., Kurbatova L. Nematodes of Antarctica	135
Ryss A. On the conception of endemic vector-borne transmission infections applied to nematode-caused diseases of plants and animals	136
Saifullah A. Low temperature scanning electron microscopic studies on the interaction of <i>Globodera rostochiensis</i> Woll. and <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	136
Samaliev H., Markova D., Baicheva O. Reproduction of root-knot nematodes on eleven common weeds in potato fields in Bulgaria	136
Sasanelli N., Gallo M., Ciccarese A., Laquale S., Ciccarese F., D’Addabbo T. Evaluation of innovative techniques for a sustainable control of root-knot nematodes and <i>Pyrenochaeta lycopersici</i>	137
Schhukovskaya A.G., Tkachenko O.B., Shesteporov A.A. Reproduction of mycotrophic nematodes <i>Aphelenchus avenae</i>, <i>Paraphelenchus tritici</i>, <i>Aphelenchoides saprophillus</i> on fungal mycelium <i>Microdochium nivale</i> (fr.) Samuels & I.C. Hallet, a cause of pink snow mold on winter wheat	139
Sediqi, E., Shokoohi, E., Karimi, J. Molecular characterization of new isolate of <i>Heterorhabditis bactriophora</i> Poinar, 1975 based on sequence of the ITS rDNA region, from south east Iran	140
Shoshin A.V., Shoshina E.A. Morphology and evolution of the lip region of nematodes of the family Tobrilidae	140
Shoshin A.V., Shoshina E.A. Morphology of supplement organs of nematodes of Tobrilidae family	141

Slos D., Ensafi P., Claeys M., Yushin V.V., Bert W. Ultrastructure of sperm development in the peanut-parasitic nematode <i>Ditylenchus</i> n. sp.	141
Spiridonov S.E., Odoyevskaya I.M., Bukina L.A., Chiljuta N.V. Discrimination of <i>Trichinella</i> species from Russian arctic with <i>Coxb</i> mtDNA sequences	142
Subbotin S.A. DNA barcoding of plant parasitic nematodes: achievements and perspectives	142
Sushchuk A.A., Matveeva E.M. Soil nematode communities of northern insular biocenoses	143
Tabolin S. On the nematode fauna in soils from parks of Moscow	143
Vaish S.S., Singh K.P. <i>Catenaria anguillulae</i> Sorokin: its potential and prospect for biological control of plant parasitic nematodes	144
Wen Y., Meyer S.L.F., Masler E.P., Liao J., Chitwood D.J. Toxicity of alkaloids from the Chinese Plum Yew (<i>Cephalotaxus fortunei</i>) to <i>Meloidogyne incognita</i>, <i>Panagrellus redivivus</i>, and <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	144
Westerdahl B.B. Population cycling of plant parasitic nematodes in perennial cropping systems	145
Yushin V.V., Claeys M., Bert W. Major Sperm Protein (MSP) in the nematode spermatozoa	145
Zhilina T.M., Shevchenko V.L. Soil nematodes in pine forests of natural reserved territories of Chernigov region	146
Zhilokov A., Kozhevnikov K. Electronic accounting of pathogen biological agent collections (PBA)	146
Zinovieva S.V. Plant resistance to parasitic nematodes: molecular genetics and biochemical aspects	149
Zinovieva S.V., Udalova Zh.V., Gerasimova N.G. Role of jasmonic and salicylic acids in the resistance of tomato to root-knot nematode <i>Meloidogyne incognita</i>	149
Zograf J.K., Yakovlev K.V. Spermatogenesis and localization of Major Sperm Protein (MSP) in free-living nematode <i>Panagrellus redivivus</i> (Rhabditida, Panagrolaimidae)	150
Zullini A. Is a biogeography of freshwater nematodes possible?	150
Tchesunov A.V. Peculiarities of fine morphology of desmoscolecida by the example of <i>Tricoma albimaris</i>	151
Diyeva D.S., Matveeva E.M., Sushchuk A.A. Soil nematode communities of potato crop under heavy metal pollution	152
Coosemans J. Saprophytic nematodes as bio-indicators in soil analyses	153
Esfahani M. Nasr, Motieeyan L., Helalat N. The prospects of non-chemical of plant parasitic nematodes in Isfahan, Iran	153

EFFECT OF PLANT EXTRACTS OF SOME MEDICINAL PLANTS ON PHYTONEMATODES IN EGYPT

Abd-Elgawad M.M.M.,¹ Omer E.A.,² Ismail, R.F.²

¹ *Plant Pathology Department, National Research Center, El-Tahrir St., Dokki 12622, Giza, Egypt; E-mail: mahfouzian2000@yahoo.com*

² *Pharmaceutical Sciences Dept., National Research Center, El-Tahrir St., Dokki 12622, Giza, Egypt; E-mail: sayedomer2001@yahoo.com*

INTRODUCTION

Medicinal and aromatic plants are self-explanatory but their phyto-extracts have many interesting properties which make them a very broad front of potential applications in agro-ecological fields. They are employed as natural biocides (anti-insects, anti-helminthes, and antibiotics) as well. So, *Tagetes lucida* has just been introduced and cultivated in Egypt. On the other hand, plant parasitic nematodes cause 12.3% losses to agricultural products worldwide, from which about 5% is attributed to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). (Barker *et al.*, 1994; Moosavi, 2012); Egypt is not an exception. Increasing recognition that nematicidal residues became a health problem promoted much more research for safe and cheap alternative methods of nematode control (e. g., Barbosa *et al.*, 2010; Vicidomini, 2011; Moosavi, 2012). Plant constituents may alter nematode behavior and development, serve as nematicides, or disrupt molting, hatching, and other hormonally regulated processes (Barker *et al.*, 1994). Regulation of nematode behavior with such environmentally acceptable, natural compounds has potential use in developing extremely safe and economically sound management strategies. In the present investigation, the effects of plant extracts from five medicinal plant species on egg-hatching inhibition of *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood and on the motility of economically important phytonematodes were studied.

MATERIALS AND METHODS

Five plant species, *Tagetes lucida*, *Achillea millefolium*, *Cymbopogon citratus*, *Artemisia annua* and *Calendula officinalis*, were collected and ethanolic extracts were obtained from the herbs, roots and flowers. The authors termed the obtained ethanolic extract as Standard (= S) and then they obtained S/2dilution with distilled water addition. A 0.05% Tween 80 was included as spreading agent. Populations of *Criconemella* spp., *Helicotylenchus* spp., and *Pratylenchus* spp. were extracted (Jenkins, 1964) from soil of tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv. Super Strain B) field. Tomato roots with many exposed egg-masses were used to obtain *M. incognita* eggs (Hussey and Barker, 1973) from average sized and freshly picked eggmasses. The soil stages, juveniles and adults, of nematodes and *M. incognita* eggs were separately transferred to the extracts of the plants in 5-cm-diameter Petri dishes. *M. incognita*-second stage juveniles (J₂) used herein were obtained by incubation of nematode egg masses in tap water at 27°C in the dark. They were collected every 2 days and concentrated in small volumes of sterilized water by filtering through 1 µm filters (Whatman type) and collecting them after repeated washes (Molinari, 2009). Each treatment had eight replicates (dishes); 1000 nematode eggs or 30 soil stages of a single genus/dish. The experiment was repeated once. Nematodes in distilled water and 0.05 Tween solution served as checks. The Petri dishes were kept at room temperature (27± 3 °C). Numbers of unhatched and *M. incognita*-J₂ were daily recorded for 16 days and immobile soil stages of the other nematode genera were counted after 24 and 72 h. Each time, the nematodes were transferred in aerated distilled water and then the active nematodes were counted after a day.

RESULTS AND DISCUSSION

The plant extracts of the 5 medicinal plants inhibited (P < 0.05) egg hatching, motility and visible flexing of all the tested nematodes (Tables 1-2). The percentage immotility increased with increase in the concentration of the extract and the exposure period. Such an increase was also

observed as a general trend concerning other volatile oils and plant extracts (e.g., Abd-Elgawad and Omer, 1995). Marotti *et al.* (2010) mentioned that *Tagetes* species produce thiophenes, polyacetylenic compounds that possess strong biocidal activity, thus making *Tagetes* plants very useful for suppressing nematode populations in the soil and as sources of natural pesticides. Such efficacy may be applied, with different degree, to other plants tested since *A. annua* was generally more effective in reducing the numbers of active nematodes tested than others except *T. lucida*-root extract which was superior to herbal extract. The extracts inhibited *M. incognita*-juvenile hatching up to 88.8% for *C. citratus* compared to 5.1% at the controls. Additional studies will be necessary to identify the most effective components from each extract and to develop more effective formulas with low production costs (Barbosa *et al.*, 2010).

Table 1. Effect of plant extracts from 5 plant species on development to hatching of *Meloidogyne incognita* eggs*

Treatment	Plant part	Average numbers of developmental stages in eggs		Inhibition of hatch %
		Embryos	larval stages	
<i>Tagetes lucida</i>	Herb	610	112	72.2
<i>Achillea millefolium</i>		340	128	46.8
<i>Cymbopogon citratus</i>		790	98	88.8
<i>Artemisia annua</i>		765	113	87.8
<i>Tagetes lucida</i>	Root	810	56	86.6
<i>Calendula officinalis</i>	Flower	818	64	88.2
Tween (0.05)	--	45	7	5.2
Distilled water	--	32	18	5.0

*Each value is an average of 16 replicates; concentration of any extract is the standard solution.

Table 2. Effect of plant extracts from 5 plant species on percentage motility of soil stages of phytonematodes and their recovery in distilled water*.

Plant species and control	Plant part	Conc. +	<i>Meloidogyne incognita</i>		<i>Criconebella</i> spp.		<i>Helicotylenchus</i> spp.		<i>Pratylenchus</i> spp.		% recovery (total nematodes)	
			% immobility after									
			24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
<i>Tagetes lucida</i>	Herb	S	74 cd	91 bc	71 cde	81 de	78 c	83 b	91 ab	100 a	24	15
		S/2	62 efg	78 d	63 e	74 ef	67 d	72 c	83 bcd	100 a	33	22
<i>Achillea millefolium</i>		S	61 fg	69 e	65 de	70 f	62 de	65 c	70 ef	85 b	37	30
		S/2	55 g	62 e	51 f	55 g	56 e	52 d	65 f	81 b	38	39
<i>Cymbopogon citratus</i>		S	78 bc	96 ab	78 bc	100 a	94 a	100 a	89 abc	100 a	18	5
		S/2	63 efg	78 d	72 cd	84 cd	91 a	100 a	81 cd	100 a	25	12
<i>Artemisia annua</i>		S	89 a	100 a	88 a	98 a	92 a	100 a	83 bcd	100 a	15	6
		S/2	78 bc	82 d	78 bc	90 bc	86 abc	100 a	72 ef	100 a	23	11
<i>Tagetes lucida</i>	Root	S	83 ab	100 a	88 a	96 ab	87 abc	100 a	97 a	100 a	15	6
		S/2	68 def	83 cd	78 bc	84 cd	79 bc	100 a	91 ab	100 a	23	12
<i>Calendula officinalis</i>	Flower	S	79 bc	95 ab	81 ab	100 a	92 a	100 a	82 cd	100 a	20	4
		S/2	70 cde	81 d	69 de	87 cd	78 c	100 a	77 de	100 a	19	11
Tween (0.05)	--	--	14 h	18 f	5 g	8 h	14 f	27 e	9 g	18 c	--	--
Distilled water	--	--	10 h	13 f	6 g	9 h	18 f	25 e	11 g	20 c	--	--

* Average of 16 replicates. In a column, numbers followed by the same letter are not significantly different ($P \leq 0.05$) according to Duncan's multiple-range test. + Ethanol extract was considered as Standard (= S) and then they obtained S/2 dilution with distilled water addition and 0.05% Tween 80.

REFERENCES

- Abd-Elgawad, M, M and Omer, E. A. 1995. Effect of essential oils of some medicinal plants on phytonematodes. *Anzeiger Schadlingskde, Pflanzenschutz, Umweltschutz*, 68(4): 82-84.
- Barbosa, P., Lima, 1 A. S., Vieira, P., Dias, L. S., Tinoco, M. T., Barroso, J. G., Pedro, L. G., Figueiredo, A. C., Mota, M. 2010. Nematicidal activity of essential oils and volatiles derived from Portuguese aromatic flora against the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Journal of Nematology* 42(1):8–16.
- Barker, K. R.; Hussey, R. S.; Krusberg, L. R.; Bird, G. W.; Dunn, R. A.; Ferris, H.; Ferris, V. R.; Freckmann, D. W.; Gabriel, C. J.; Grewal, P. S.; MaCGuildwin, A. E.; Riddle, D. L.; Roberts, P. A.; Schmitt, D. P., 1994: Plant and soil nematodes: Societal impact and focus for the future. *Journal of Nematology* 26: 127-137.
- Hussey, R. S., and Barker, K. R., 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57: 1025-1028.
- Jenkins, W. R., 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soils. *Plant Disease Reporter* 18: 692.
- Marotti, I., Marotti, M., Piccaglia, R., Nastri, A., Grandi, S., and Dinelli, G. 2010. Thiophene occurrence in different Tagetes species: agricultural biomasses as sources of biocidal substances. *J. Sci. Food Agric.* 90(7):1210-7.
- Molinari, S. 2009. Bioassays on plant-nematode interactions. Pp. 293-326 in S. S. Narwal, D. A. Sampietro, C. A. N. Catalàn, M. A. Vattuone, and B. Politycka, co-eds. *Plant bioassays*. Studium Press LLC, New Delhi, India.
- Moosavi, M.R. 2012. Nematicidal effect of some herbal powders and their aqueous extracts against *Meloidogyne javanica*. *Nematropica* 42:48-56.
- Vicidomini, S. 2011. Alternative properties of *Artemisia* (Asteraceae) phyto-extracts to anti-malarian ones: preliminary bibliografic review on nemato-toxic effects. *Il Naturalista Campano* [ISSN 1827-7160] <http://www.museonaturalistico.it/>, n. speciale: 1-22.

ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES AND THEIR POTENTIAL AGAINST INSECTS AND PHYTONEMATODES IN EGYPT

Abd-Elgawad M.M.M.,¹ Jian H.,² Qiao Y.,² Hammam M.M.A.¹

¹ *Plant Pathology Department, National Research Center, El-Tahrir St., Dokki 12622, Giza, Egypt; E-mail: mahfouzian2000@yahoo.com*

² *Plant Pathology Department, China agricultural university, Beijing 100193, China, E-mail: hengjian@sina.com*

Summary. Entomopathogenic nematodes (EPN) can be used in IPM programs to avoid hazards of chemical pesticides. Surveys for indigenous EPN resulted in isolating numerous species/strains from different parts of Egypt; *Steinernema abbasi*, *S. carpocapsae*, *S. kushidai*, *S. glaseri*, *Heterorhabditis bacteriofora*, *H. indica*, *H. taysearae*. This latter has originated from Egypt as a new species having several geographical isolates in the present study. Target insect pests for EPNs in Egypt included *Artoglia (pieris) rapae*, *Hellula Undalis*, *Temnorhynchus baal*, *Sesamia cretica*, *Plutella xylostella*, *Rhynchophorus ferrugineus*, *Spodoptera littoralis*, *Agrotis ipsilon*, *Tropinota squalida*, *Galleria mellonella*, and *Zeuzera pyrina*. Moreover, a two-fold goal; i.e. controlling plant-parasitic nematodes and insect pests simultaneously by EPN, is being tried in Egypt. Possible mechanisms of plant-parasitic nematode suppression by EPN were discussed to obtain optimal application tactics and maximize their field effectiveness.

INTRODUCTION

Growing dissatisfaction with chemical pesticides has sparked wide interest in developing environmentally friendly biological alternatives. Insecticidal nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) are the most successful example of a biological pesticide used against soil dwelling and wood boring insect pests (Grewal *et al.*, 2005). In the lab., they possess virtually all the attributes of an ideal biological control agent. They are extraordinarily lethal with many insects being killed within 36 hrs. Dozens of important insect pests are susceptible, yet nontarget populations are undisturbed. EPN do not require specialized application equipment. Application via irrigation has further improved grower acceptance. Nematodes provide control of root weevils equivalent to chemicals for tens of thousands of hectares of citrus in USA and Europe (Kaya and Gaugler, 1993). In ornamentals, black vine weevils, fungus gnats, and numerous species of wood-boring caterpillars are controlled effectively with nematodes. Many other pests of horticulture, agriculture, home and garden are also targets (Grewal *et al.*, 2005). Yet, the intolerance of EPN to environmental extremes has accounted for unfavorable or erratic field results (Gaugler, 2002; Grewal *et al.*, 2005). Genetic improvement of these nematodes to enhance their biocontrol potential through selective breeding is likely only if the desired alleles are present in the genepools of their populations; e.g. insufficient genetic variation in resistance to ultraviolet light resulted in rejecting selective breeding as an option to improve UV tolerance in *Steinernema carpocapsae* (Gaugler *et al.*, 1989). In Egypt, several studies have recorded new populations of steinernematids and heterorhabditids with potential efficacy against numerous pests (e.g., Shamseldean and Abd-Elgawad, 1994; Abu-Shady *et al.*, 2011) but further surveys of other habitats may record novel EPN isolates. New isolates provide possibility to increase the genetic variation and consequently develop new nematode strains. The primary aim of the survey reported here was to isolate indigenous EPN strains for use in biocontrol of pests. Such strains are preferred, because of both environmental considerations and likely adaptation to local climatic conditions.

MATERIALS AND METHODS

One hundred samples from agricultural sites of different climatic and habitat types in Egyptian governorates of Sharkia, Giza, El-Menia, Behera, Alexandria and Kafr Elsheikh, Egypt were surveyed for the presence of EPNs as reported by Mracek and Webster (1993) from May to October, 2011. The EPN extraction process was repeated several times (Woodring and Kaya, 1988) to confirm Koch's postulates (Pelczar and Reid, 1972). Their morphological and DNA identification was carried out (according to Abd-Elgawad and Ameen, 2005; Nguyen *et al.*, 2006).

Table 1. Amplification primers and references used for molecular identification of seven EPN isolates.

No.	Amplification primers	References
Isolate 1	18S: 5'-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3' 26S: 5'-TTTCACTCGCCGTTACTAAGG-3'	Vrain, C. T., D. A. Wakarchuk, A. C. Lévesque, and R. I. Hamilton. 1992. Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the <i>Xiphinema americanum</i> group. <i>Fundamental and Applied Nematology</i> 15:563-573.
Isolate 2	93: 5'-TTAGTTTCTTTTCTCCGCT-3'	Stock, S. P., Rivera-Orduño, B. and Flores-Lara, Y. 2009. Heterorhabditis sonorensis n.sp. (Nematoda: Heterorhabditidae), a natural pathogen of the seasonal cicada <i>Diceroprocta ornea</i> (Homoptera: Cicadidae) in the Sonoran desert. <i>Journal of Invertebrate Pathology</i> 100, 175-184.
Isolate 3	94: 5'-TTGAACCGGGTAAAAGTCG-3'	
Isolate 4		
Isolate 8		
Isolate 10		
Isolate 9	AB28: 5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3' TW81: 5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3'	Joyce, S.A., Burnell, A.M. and Power, T.O. 1994. Characterization of Heterorhabditis isolates by PCR amplification of segments of mtDNA and rDNA genes. <i>Journal of Nematology</i> 26, 260-270.

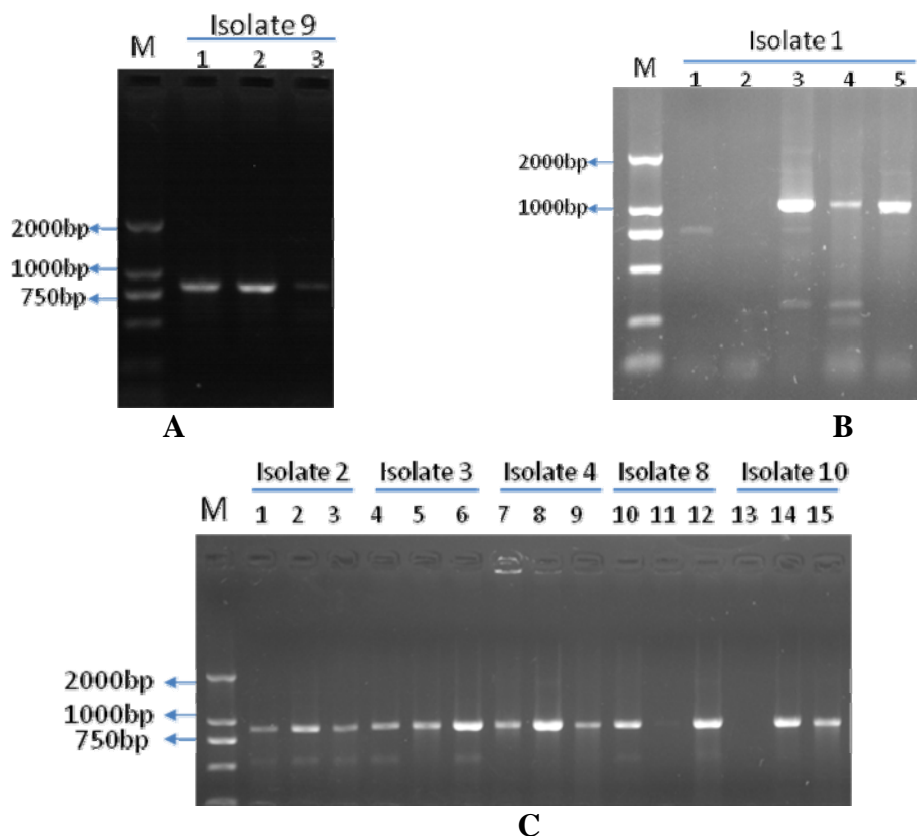


Fig. 1. SDS gel electrophoregram of soluble proteins from seven heterorhabditid nematodes. A: three lanes of isolate no. 9; *H. indica*. B: five lanes of isolate no. 1; *H. taysearae*. C: fifteen lanes of isolates no. 2, 3, 4, 8, and 10; *H. taysearae*. Molecular markers (M) are shown on the left.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Seven samples were positive for EPN. *Heterorhabditis indica* was extracted from sandy soil planted with tomato at Alexandria but six *H. taysearae* isolates were extracted from sandy and silty soils of mango and citrus orchards in the other governorates (Table 1; Fig. 1). Morphological examination indicated that some quantitative values fairly differed from their type specimens. It is common that EPN isolates of the same species have different morphometrics. The extent of overlap in morphometric characters is such that, with the possible exception of a few species with relatively long body lengths especially *H. megidis*, no one individual from a population can be reliably assigned to a particular species (Dix *et al.*, 1992). Alternatively, DNA sequence analysis has proved to be a more useful method for species delimitation (Stock and Hunt, 2005). For DNA characterization, the methods of DNA extraction, PCR processing, sequencing, multiple alignments and DNA analysis reported by Nguyen *et al.* (2006) were followed using D2D3 regions of 28S rDNA. D2D3 region. Sequences of the seven isolates studied were identical to previous ones. EPN may be used for a two-fold goal; i.e. controlling plant-parasitic nematodes (PPN) and insect pests simultaneously. Yet, to achieve the first goal necessitates optimal application tactics of EPN, e.g. delivery of the dauer stage juveniles near the plant roots for effective PPN control. Four mechanisms of PPN suppression caused by EPN were summed up: 1) EPN crowded along the roots of plants forcing PPN away; 2) EPN led to a build-up of nematode antagonists; 3) allelochemicals; and 4) root-penetrating EPN may release small quantities of nematode antagonistic metabolites that disperse through neighboring root tissue, protecting the root from further PPN penetration (Grewal *et al.*, 2005). Eventually, a phylotree for *Heterorhabditis* based on ITS sequences was recently erected (Patrick Tailliez, pers. Comm) containing *H. sonorensis*, *H. taysearae*, *H. Mexicana*,

H. amazonensis, *H. baujardi*, *H. floridensis*, *H. gerrardi*, *H. indica*, *H. noenieputensis*, *H. atacamensis*, *H. safricana*, *H. marelatus*, *H. downesi*, *H. megidis*, *H. zealandica*, *H. bacteriophora*, and *H. Georgiana*. Out of them *H. taysearae*, *H. bacteriophora*, and *H. indica* are found in Egypt. In addition *H. egyptii*, isolated from Egypt, may be species inquirendae because its molecular identification is incomplete.

REFERENCES

- Abd-Elgawad, M.M.M. and Ameen, Hoda H. 2005. *Heterorhabditis egyptii* N. Sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Egypt. Egypt. J Agric. Res. 2(2):855-870.
- Abu-Shady, Noha M., Shamseldean, M.M., Abd-Elbary, N.A. and Stock, S.P. 2011. Diversity and distribution of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) in Egypt. Journal of Nematology 43:224.
- Dix, I., Burnell, A.M., Griffin, C.T., Joyce, S.A., Nugent M.J. and Downes M.J. 1992. The identification of biological species in the genus *Heterorhabditis* (Nematoda: Heterorhabditidae) by cross-breeding second generation amphimictic adults. Parasitology 104:509-518.
- Gaugler, R. (Editor). 2002. Entomopathogenic nematology. Wallingford, UK: CABI Publishing.
- Gaugler, R., McGuire, R. and Campbell, J. 1989. Genetic variability among strains of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. Journal of nematology 21: 247-253.
- Grewal, P.S., Ehlers, R.-U. and Shapiro-Illan, D. I. (Eds). 2005. Nematodes as Biocontrol Agents. CABI Publishing: Wallingford, UK.
- Kaya, H. and Gaugler, R. 1993. Entomopathogenic nematodes. Ann. Rev. Entomol. 38:181-206.
- Mracek, Z. and J.M. Webster 1993. Survey of Heterorhabditidae and Steinernematidae (Rhabditida: Nematoda) in Western Canada. Journal of Nematology 25:710-717.
- Nguyen K.B., Malan, A.P., and Gozel, U. 2006. *Steinernema khoisanae* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. Nematology 6:157-175.
- Pelczar, M.J. and Reid, R.D. 1972. *Microbiology*, 3rd ed. New York, USA: McGraw-Hill.
- Shamseldean, M. and Abd-Elgawad, M. 1994. Natural occurrence of insect pathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae) in Egyptian soils. Afro-Asian Journal of Nematology 4:151-154.
- Stock, S.P. and Hunt, D.J. 2005. Morphology and systematics of nematodes used in biocontrol. In: Nematodes as biocontrol agents, pp. 3-43 (Eds P.S. Grewal, R.-U. Ehlers and D.I. Shapiro-Illan) CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Woodring, J.L. and Kaya, H.K. 1988. Steinernematid and heterorhabditid nematodes: a handbook of techniques. Southern Cooperative Series Bulletin 331. Fayetteville, USA: Arkansas Agricultural Experiment Station.

STRUCTURE AND FUNCTIONING OF THE PARASITIC SYSTEM NEMATODES *TOXASCARIS LEONINA* - PARASITE PREDATORY MAMMALS

Anikieva L.¹

¹ *Institution of the Russian Academy of Sciences Institute of biology, Karelian research centre, RAS, Petrozavodsk, 185910, Russia; E-mail: anikieva@krc.karelia.ru*

Peculiarities of functioning of the parasitic system nematodes *Toxascaris leonina* were analyzed on the basis of original material. The role of the different age groups of the host animals in maintaining of the number and life cycle of this species under changing conditions were studied.

THE EFFECT OF COMPOUNDS OF CHITOSAN WITH SALICYLIC ACID ON THE INFECTION OF TOMATO PLANTS BY *MELOIDOGYNE INCOGNITA*

Baicheva O.¹, Udalova Zh.², Zinovieva S.², Gerasimova N.³, Damianova A.¹

¹*Institute for Nuclear Research and Nuclear Energy, Sofia, Bulgaria,*
E-mail: baicheva_o@abv.bg

²*Centre of Parasitology, IPEE RAS; zinovievas@mail.ru, udalova.zh@rambler.ru;*

³*Bach Institute of Biochemistry RAS;*

One of the ways in the protection of plants against pathogens is the induction of resistance by elicitors and signaling molecules. Tomato *Lycopersicon esculentum* – root-knot nematode *Meloidogyne incognita* system was employed to study the effect of chitosan, a signaling molecule salicylic acid (SA) and the compound of chitosan with fragments of the SA. It was shown that the investigated compounds of chitosan inhibit development of nematodes in treated plants. When comparing the effect of chitosan derivative, high elicitor activity of chitosan with SA and modified chitosan was observed. It was suggested, that modification of chemical and spatial structure of the oligomer chain of two pieces of 2-hydroxy-3-methoxybenzyl and pyridoxal, promoted expression of protective genes.

MEIOBENTHOS OF THE DEEP AREA OF PETER THE GREAT BAY (SEA OF JAPAN) AND COMMUNITIES OF FREE-LIVING NEMATODES

Belogurova L.S.¹

¹*A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology, Far Eastern Branch of
the Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690059, Russia;*

Study of the deep-sea meiobenthic communities of Peter the Great Bay of the Sea of Japan was conducted in August 2010 for the first time. Samples were collected at 14 sampling points in the bathyal zone at depths of 270, 400, 600, and 800 m. All samples of bottom sediments contained aleurite-pelite fractions, and numerous dead valves of the diatom algae and radiolarian valves. The meiobenthos was represented by seven taxonomical groups, and pseudomeiobenthos by four. Nematodes occurred at all depths. The share of nematodes varied from 11.6 to 91.7%, the average being 21% of the meiobenthos total population density. The taxonomical composition of the fauna varied with depth. All trophic groups were present in the area of study: selective detritophages (16%), nonselective detritophages (26%), scrappers (26%), and predators (32%). Totally, 19 species of the free-living marine nematodes, belonging to 18 genera, 11 families, and 4 orders were revealed. The highest species number (12) has been found 400 m deep; the lowest species number (2) - at depths of 270 and 600 m. *Dorylaimopsis peculiaris* was a dominant species.

**NEMATODE MORPHOLOGY, TAXONOMY AND PHYLOGENY AT GHENT UNIVERSITY:
A DIVERSITY OF INTEGRATED TOOLKITS**

Bert W.¹, Janssen T.¹, Slos D.¹, Kolombia A.Y.¹, Claeys M.¹, Couvreur M.¹, Mermans C.¹, Ensafi P.¹,
Quisado J.S.¹, Xue Q.¹, Karssen G.², Yushin V.V.³, Decraemer W.^{1,4}

¹ *Nematology Unit, Department of Biology, Ghent University, K.L. Ledeganckstraat 35, 9000 Ghent, Belgium; E-mail: Wim.Bert@UGent.be*

² *Plant Protection Service, Nematology Section, Geertjesweg 15, 6706 EA Wageningen, The Netherlands;*

³ *A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology, FEB RAS, Vladivostok, Russia;*

⁴ *Royal Belgian Institute of Natural Sciences, Department of Invertebrates, Vautierstraat 29, B-1000 Brussels, Belgium;*

Historically, the strength of nematology research at Ghent University lies within the field of morphology, taxonomy and phylogeny. From the backbone of nematode phylogeny to species delineation, we integrate today a tradition of light-microscopy and ultrastructural morphology with molecular approaches. We will provide an impression of our taxonomical work on free-living, plant-parasitic, virus-vector, facultatively parasitic, and entomopathogenic nematodes from natural and agricultural ecosystems of several continents. Our priority of coping with the enormous nematode diversity lies in integrative work in connection with other relevant research. Hereby, we will focus on the following elements of our approach: ways to combine DNA sequencing data with morphology, the possibilities of electron microscopy, the assessment of intraspecific vs interspecific variation, applications of species delineation which are both theoretically sound and practically feasible, the integration of ecological and biological data, and the relevance to crop protection and biomonitoring. Finally we will discuss possibilities to integrate our data by the use of databases and phylogenetic frameworks.

NEMATODE INFESTATION AS A FACTOR OF INFLUENCE ON THE POPULATIONS OF *COPTOPSYLLA LAMELLIFER ROSTRATA* IOFF ET TIFL., 1934 (SYPHONAPTERA, COPTOPSYLLIDAE) PARASITIZING ON THE GERBILS IN THE CENTRAL AND SOUTHERN KYZYL-KUM

Blyummer A.G.¹, Rivkus J.Z.²

¹ *All-Russian Plant Quarantine Centre, Pogradichnaya, 32, Bykovo 140150, Moscow region, Russia; E-mail: agbugs@mail.ru*

On the basis of materials collected in central and southern latitudinal climatic subzones of the Kyzyl-Kum Desert in 1983-1997, it was shown, that a large portion of female specimens of a flea *Coptopsylla lamellifer rostrata*, parasitizing on the autumn-winter gerbil, was infected by nematodes. Maximum infestation of 32.2% was observed in the Central Kyzyl Kum during the 1st week of November. In the Southern part infestation was less extensive (20%), and occurred later on the same month. Distribution of Tylenchidae in the Kyzyl Kum appeared to have a focal nature. Within the boundaries of the area, blank (flea-free) zones of 1 - 6 km² were detected. It was suggested that degradation of flea mezopopulations and *C.l.rostrata* elimination from the parasitocenosis of the great gerbil, occurred a result of extensive nematode development and, respectively, flea female specimens upper threshold infestation by nematodes.

PLANT-PARASITIC ROOT-KNOT NEMATODE *MELOIDOGYNE HAPLA* IN RUSSIAButova K. B.^{1,2}, Pridannikov M. V.^{2,3}¹ *All-Russian Plant Quarantine Centre, Pogradichnaya str., 33, Bykovo, Moscow region, 140150 Russia; E-mail: butova.ksenia@mail.ru;*² *All-Russian Research Institute of Phytopathology, Institute Str., Bolshie Vyazemy, Moscow region, 143050, Russia;*³ *Centre of Parasitology, A. N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, RAS, Leninskiy pr. 33, Moscow, 119071, Russia;*

Currently in the territory of Russia in vivo recorded only one kind of root-knot nematodes are relevant for agriculture: northern root-knot nematode *Meloidogyne hapla*. Northern root-knot nematode has wide host range, which in their natural habitat are the nature reserves of the nematodes. Like other types of root-knot nematodes, *M. hapla* is an endoparasite of the root system. The cycle of the development proceeds in root tissues, and on its surface eggs bags are formed. In the Central and North-Western areas one-two generations develop. In the place of female food forms outgrowth of tissue (Gall), sometimes several females form large (up to 1 cm in diameter) syngall. Very typical reaction of the plants to defeat by the northern root-knot nematode is the formation of numerous small lateral roots. The growth and development of the infested plants is delayed, significantly deteriorate their commodity quality. In recent years major cases of infestation by this nematode in the Moscow and Pskov areas were noted. *M. hapla* is an important object of study from the point of view of plant protection, as there are no registered nematicides for open ground and registered varieties of vegetable crops resistant to root-knot nematode.

DESCRIPTION OF A *BURSAPHELENCHUS* SP. (NEMATODA: PARASITAPHELENCHIDAE) FROM PEAT SUBSTRATE OF HOP SEEDLINGS FROM THE CZECH REPUBLICČermák V.¹, Čudejková M.², Mikušková K.¹, Tománková K.¹ and Gaar V.¹¹ *State Phytosanitary Administration, Division of Diagnostics, Šlechtitelů 773/23, 779 00 Olomouc, Czech Republic; E-mail: katerina.mikuskoval@srs.cz;*² *C.R. Haná, Department of Molecular Biology, Šlechtitelů 586/11, 779 00 Olomouc, Czech Republic;*

In a phytosanitary survey conducted on hop seedlings produced in hop nurseries in the Czech Republic, a new species of *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 was extracted from peat substrate. This species is characterized by relatively short body lengths (female 395-481µm; male 417-510 µm), short stylets (female 11,2-12,0 µm; male 10,8-11,7 µm) with weak basal thickening, small spicules (11,5-13,7 µm) with minute cucullus, distinguishingly bent female tails with finely rounded terminus. The females have a small vulval flap. The species differs from the closest related species by morphometrics and morphological characters and also by species specific ITS-RFLP profile. The sequence of the ITS region revealed, that this species is very closely related to *Bursaphelenchus hofmanni* Braasch, 1988. The new species has been successfully maintained in fungal cultures of non-sporulating forms of *Botrytis cinerea* for further studies.

INFLUENCE OF A ROOT PARASITIC NEMATODE COMPLEX ON PRODUCTIVITY OF FESCUE (*FESTUCA PRATENSIS HUDS.*) AND TIMOTHY GRASS (*PHLEUM PRATENSE L.*) IN CENTRAL REGION OF RUSSIA

Chizhov V.N.¹, Butorina N.N.¹, Perevertin K.A.¹

¹ Center of Parasitology, IPEE RAS, Leninskii pr., 33, Russia, 119071 Moscow,
E-mail: chizhov@list.ru

Three-year studies of the numbers of root parasitic nematode species complex were conducted on crops of timothy grass (*Ph. pratense L.*) and fescue (*F. pratensis Huds.*), growing on medium loamy soils in the Central region of Russia. Dependence of grass productivity on free-living parasitic nematode population density, on the whole, without genus differentiation was observed. Relationship between estimate nematode numbers at the end of the second vegetation season and grass productivity on the third year of vegetation was the strongest. It was described by a classic exponential Seinhorst model. Parameters for two grass types and two yield forms, hay and seeds, were detected. The fact that productivity decrease of timothy grass was observed at lower parasitic nematodes density, compared to fescue, could be explained by different resistance of host plants, and differences in parasite complex qualitative composition. Nematodes of the species *Helicotylenchus digonicus* predominated in rhizosphere of both plant hosts. In rhizosphere of timothy grass species *Paratylenchus microdirus*, *Macropostonia sp.*, *Pratylenchus pratensis* were subdominant, and *Pratylenchus penetrans* was noted. Species *Paratylenchus microdirus* and *Macropostonia sp.* were subdominant in fescue rhizosphere. When the nematode harmful effect was assessed on the basis of seed mass, the maximum decrease rate of the studied grasses productivity occurred at much lower nematode numbers, compared to assessment carried out on the basis of hay mass.

HIGH PRESSURE FREEZING (HPF) AND AUTOMATIC FREEZE SUBSTITUTION (AFS): INNOVATIVE TECHNIQUES FOR TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY (TEM) IN NEMATOLOGY.

Claeys M.¹, Yushin V.V.^{2,3}, Bert W.¹

¹ Nematology Unit, Department of Biology, Ghent University, Belgium;
E-mail: nini.claeys@ugent.be;

² A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology, FEB RAS, Vladivostok, Russia;

³ Far East Federal University, Vladivostok 690600, Russia;

The goal of morphologists, already at the beginning of electron microscopy, is to preserve the ultrastructure as close to their native state as possible. For the ultrastructural study of nematodes chemical fixation has several limitations. Nematodes react quickly and this prevents penetration of the fixative resulting in ultrastructural artifacts. Hence, the worms have to be cut into pieces to facilitate penetration of chemical reagents. Here we present high-pressure freezing (HPF) in combination with automatic freeze substitution (AFS) as an alternative for classical chemical fixation. HPF has two main advantages compared to chemical fixation: a much faster rate of fixation and a simultaneous stabilization of all cellular components. The technique is based on the suppression of ice crystal formation because of ultrarapid freezing (10000°C/sec) at a high pressure of around 2000 bar in liquid nitrogen. The nematode cuticle or even the egg shell are not a barrier for this fixation. The low-temperature substitution of dehydrating agents and fixatives into rapidly-frozen samples allows the crosslinking of cellular components and the removal of water at temperatures low enough to avoid the damaging effects of ambient-temperature dehydration. Taken all together, HPF followed by AFS shows superior morphological preservation

for ultrastructural observations with well preservation of antigenicity for immunocytochemistry. Successful use of the technique is demonstrated, given our promising results on nematode gonads, gametes, spermatogenesis and localization of major sperm protein. (Support: RFBR 11-04-00368; FEB RAS 12-III-A-06-098; RF 2010-220-01-180).

NOVEL SOURCE/S OF RESISTANCE TO CEREAL NEMATODES '*HETERODERA* SPP AND *PRATYLENCHUS* SPP' IN SPRING AND WINTER WHEAT VARIETIES

Dababat A.A.¹, G. Erginbas-Orakci¹, H.J. Braun², H. Comez², S. Dreisigacker²
Y. Mannes², R. Singh², H. Toktay³, M. İMREN⁴, H. Elekcioglu⁵, A. Morgounov¹

¹ CIMMYT, P.K. 39 Emek 06511 Ankara, Turkey, Tel +903123348777, Fax +903123270798;

² CIMMYT Apdo. Postal 6-641, C.P. 06600, D.F. Mexico;

³ Nigde University- Turkey;

⁴ Biological Control Research Institute, Adana, Turkey;

⁵ Cukurova University- Adana-Turkey;

Soil borne pathogens (SBPs) including the Cereal Cyst Nematode (CCN) caused by *Heterodera* species and the Root Lesion Nematodes caused by *Pratylenchus* species are attack roots of cereal crops and resulting in a high yield loss and reduce grain quality. The damage caused by these nematodes is accelerated in areas where drought exists. A few control options are being used to reduce CCN damage through keeping the population level below damage threshold such as; chemical, biological, cultural, and genetic (resistance/tolerance) practices. Resistance is environmentally friendly and biologically effective once identified. However, up to now, resistance has only been identified against one of the CCN nematodes, *Heterodera filipjevi* in Turkey and foreign wheat germplasm though this resistance is not yet present in high yielding cultivars. Therefore, alternative approaches limiting the damage caused by CN to wheat are needed. As a result of screening wheat germplasm against the CN hundreds of moderately resistant germplasm to *H. filipjevi* in winter wheat and to both *Pratylenchus* species and *H. avenae* in spring wheat germplasm are available. In 2012, germplasm with multi disease resistance including *H. avenae*, *Pratylenchus thornei* and *P. neglectus*, and *H. filipjevi* were distributed to international collaborators. Two sets of spring and winter wheats are being genotyped to understand the genetics background of their resistance sources.

PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF NEMATODES AND NEMATOMORPHS AS INFERRED FROM SEQUENCE ANALYSIS OF RIBOSOMAL PROTEINS (RPL-RPS).

Efeykin B.D.,¹ Mikhailov K.V.,² Aleshin V.V.,² Spiridonov S.E.,¹ Panchin Yu. V.^{2,3}

¹ Center of parasitology, A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, RAS, Moscow;
E-mail: bocha19@yandex.ru

² M.V. Lomonosov Moscow State University, Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow; E-mail: aleshin@genebee.msu.su

³ A.A. Kharkevich Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow; E-mail: ypanchin@yahoo.com

Nematomorphs or horse-hair worms are representatives of class Nematomorpha. All nematomorphs parasitize on the larval stage in the body cavity of arthropods. Adult worms escape from host into water, where copulate, laid eggs and give birth to tiny juveniles with prominent proboscis. This latter penetrate the body of intermediate or definitive arthropod host.

Phylogenetic relationships of Nematomorpha are still obscure: some authors consider these together with kinorhynchs and priapulids as members of the phylum Cephalorhyncha (Malakhov, 1980), when other consider nematomorphs as close relatives of nematodes (Schmidt-Rhaesa, 1996). Total DNA was extracted with phenol-chloroform method from single specimen of *Gordionus alpestris*, collected in the stream in Western Caucasus. DNA was examined in Illumina Hi-seq 2000. Adapters and reads with low coverage were removed from obtained reads. Contigs were assembled with Velvet. Two separate sequencing procedures permit to estimate *Gordionus alpestris* genome as approx. 270 Mb. At least twentyfold coverage of the genome was obtained with N50=4050, what was sufficient for the RPL-RCF proteins. All the predicted RPL-RCF proteins were revealed in the obtained contigs. Before phylogenetic analysis of each separate protein the ambiguous sites were removed from the alignment. Edited alignments were concatenated with ScaFoS 1.24. Maximum likelihood trees were constructed in RaxML 7.2.6. Conducted phylogenetic analysis supported the close relationships of Nematoda and Nematomorpha, with Tardigrada as the next closest relative.

INFLUENCE OF ROOT-KNOT NEMATODE *MELOIDOGYNE ARENAREA* ON STRUCTURE TISSUES OF TOMATO ROOTS

Eshova Kh.¹, Saidova Sh.O.¹

¹ National University of Uzbekistan, 100099, A. Buriev street, Tashkent, Uzbekistan,
E-mail: kholisa.eshova@mail.ru;

Present study is devoted to description of the peanut gall nematode *Meloidogyne arenaria* impact on structure of tomato roots. It was established that correlative relation of physiological processes and cell and tissue differentiation in plant organs get disrupted. This results in formation of pathological morphologic structures, galls. Giant multinuclear cells, cenocytes and hydrocytes are formed.

METAZOAN MEIOFAUNA FROM THE NORTH-WESTERN SLOPE OF THE SEA OF JAPAN WITH EMPHASIS ON FREE-LIVING NEMATODES ASSEMBLAGES

Fadeeva N.¹, Mordukhovich V.¹

¹ Far Eastern Federal University, 27 Oktyabrskaya St. room 430a, Vladivostok, 690600, Russia;
E-mail: nfadeeva2006@yandex.ru;

Biota of the majority of the Sea of Japan slope areas is very insufficiently explored, peculiarities of quantitative distribution of some of its groups, and their geographical coverage are still not fully established. Present study was conducted to investigate the community structure and distributional patterns of meiofauna of the north-western slope of the Sea of Japan. Sediment samples were collected during Russian-German expedition SoJaBio (Sea of Japan Biodiversity Studies) on board of R.V. Akademik Lavrentyev in August 2010. Samples were taken from the depth ranging from 515 to 3367 m. Totally 22 quantitative samples from 4 sampling locations were analyzed. Nematodes and Harpacticoid copepods were the most abundant taxa. Meiofauna density values ranged from 45 ind./10cm² (water depth 3367 m) to 1620 ind./10cm² (water depth 515 m). Totally 125 free-living nematode species from 35 families were found in all samples. Number of species per sample varied from 14 to 22. Composition and structure of the nematode assemblages clearly changed with depths. Representatives of families Xyalidae (about 30 %), Chromadoridae (about 20 %) and Trefusiidae (about 20 %) were predominant at the deepest locations. Density and composition of nematode assemblages at the genus level were comparable with those revealed at similar depths in waters around the world. Species diversity generally decreased with depth.

NEMATODA OF DOUBLE-SPINED SPRUCE BARK BEETLE *IPS DUPLICATUS* (SAHLBERG, 1836) FROM CENTRAL EUROPEGrucmanová Š.¹, Holuša J.¹¹ Faculty of forestry and Wood Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamycka 1176, 165 21 Praha 6 – Suchdol, Czech Republic; E-mail: grucmanova@fld.czu.cz

The double-spined spruce bark beetle *Ips duplicatus* is one of the significant pest bark beetles species in Europe, but nematofauna associated with this species still was not described. However nematodes are studied as potential biological pest control, there are only a few publications about nematodes associated with bark beetles in Europe, eg. the best known Ruhm 1956 or Tenkacova and Mituch 1986; 1987; 1991; Balazy 1966. The overview of nematode species associated with *Ips* bark beetles provides Grucmanova and Holusa (in press). But there are no informations about nematodes associated with *Ips duplicatus*.

Bark beetles were collected from three locations in the Czech Republic in different altitudes 350, 450 and 600 m a.s.l., from May to June, the overwintering generation, and from August to September, the offspring generation. Five cut infested Norway spruce trees *Picea abies* (L.) Karst. were selected for each locality and bark beetle generation. And 20 bark beetles were collected from each infested tree and stored separately in Eppendorf tubes in the fridge. Ten *Ips duplicatus* galleries were collected from each tree and then the gallery content was removed and stored separately in plastic bags in the fridge until the elaboration. In laboratory, individual beetles were examined for the presence of nematodes by viewing their body parts under the microscope and were subsequently dissected. Localization of nematodes was recorded as well as sex of the beetle, locality and sampling date (overwintering of offspring generation). Gallery contents were examined for the presence of nematodes using Baermann funnel. Nematodes were collected and fixed in TAF solution and transferred to glycerol and the permanent preparations were made by melting of paraffin. The dependence of presence of nematodes on bark beetles sex, differences between localities and overwintering and offspring generations were studied.

In total 600 beetles and 300 galleries were analyzed from three localities. There is not the significant difference between localities in the presence of phoretic, endoparasitic (in intestine or haemocel) nematodes. But there are the significant differences between overwintering and offspring generation in the presence of phoretic nematodes (ANOVA df=1; F=13.05; p>0.001) and even endoparasitic nematodes (Kruskal-Wallis df = 1; p = 0.0102). This is consistent with the known data reported by Choo and Kaya 1987 or Tenkacova and Mituch 1986. Infestation by phoretic nematodes varied from 42 to 65 % in overwintering and from 18 to 40 % in offspring generation. Infestation by endoparasitic nematodes in haemocel was 8-30 % in overwintering and 3-13 % in offspring generation. And infestation by endoparasitic nematodes in intestine was 4-16 % in overwintering and 0-11 % in offspring generation. The number of nematodes found in the gallery content varied from 0 to 1500 individuals according to developmental stage of bark beetle and it seem to be the older stage the larger amount of nematodes.

In double-spined spruce bark beetle haemocel *Contortylenchus* sp. and *Parasitylenchus* sp. adult females as well as the large numbers of eggs and juveniles of these nematodes were found. Highly probably it is *Contortylenchus diplogaster* v. Linstow, 1890 and *Parasitylenchus dispar* (Fuchs, 1915) which are known from other *Ips* bark beetles (see Grucmanova and Holusa 2013). Some juvenile tylenchids were found even in intestine. These tylenchid juveniles were probably representatives of the mentioned nematode genera found in haemocel. This would be consistent with known development cycles of these nematodes. In intestine of *I. duplicatus* *Parasitorhabditis obtusa* juveniles were observed. Simultaneously juveniles and adults of this species were also found in gallery contents. *P. obtusa* was the most frequent and the most abundant nematode

species in galleries. Very frequent nematode species in galleries was *Micoletzkyia buetschlii* and its juveniles were also found under elytra, on wings and between body segments usually in groups from a few to tens of individuals. Beside these two species members of *Cryptaphelenchus* and *Parasitaphelenchus* genera were observed in gallery contents and some tylenchid juveniles were found too.

This study was supported by grants CIGA 20124302.

REFERENCES

- Balazy S. 1966. Living organisms regulate population density of bark beetles in spruce forests, with special reference to entomopathogenic fungi.- *Poznanskie Towarzystwo Przyjaciol Nauk Wydzial Nauk Rolniczych i Lesnych*, 21 (1): 3-48.
- Choo H.Y., Kaya H.K., Shea P., Noffsinger E.M. 1987. Ecological Study of Nematode Parasitism in *Ips* Beetles from California and Idaho.- *Journal of Nematology*, 19 (9): 495-502.
- Grucmanova S., Holusa J. 2013. Nematodes associated with bark beetles with focus on the genus *Ips* (Coleoptera: Scolytinae) in central Europe. *Acta Zoologica Bulgarica* (in press).
- Ruhm W. 1956. The Nematodes of Bark Beetles.- *Parasitologische Schriftenreihe*, 6: 1-437.
- Tenkacova I., Mituch J. 1986. A contribution to the knowledge of nematofauna of Scolytidae bark beetles in norway spruce in forest park in Košice.- *Lesnický časopis*, 32 (5): 381-387.
- Tenkacova I., Mituch J. 1987. Nematodes new for the fauna of the Czechoslovak Socialist Republic with the affinity to scolytids (Coleoptera: Scolytidae).- *Helmintologia*, 24: 281-291.
- Tenkacova I., Mituch J. 1991. Nematodes of bark beetles (Coleoptera: Scolytidae) from Tatra National Park.- *Zborník prác o Tatranskom národnom parku*, 31: 173-182.

STRUCTURE AND DEVELOPMENT OF SPERMATOOZOA IN THE THELASTOMATID NEMATODES (RHABDITIDA: OXYURIDOMORPHA: THELASTOMATIDAE)

Guzeeva E.A.¹, Yushin V.V.^{2,3}

¹ *Centre of Parasitology, A.N. Severtsov Institute Ecology and Evolution RAS, Moscow, 119071, Russia; E-mail: guzeyeva@mail.ru;*

² *A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology FEB RAS, Vladivostok, 690059, Russia, E-mail: vvyushin@yandex.ru;*

³ *Far Eastern Federal University, Vladivostok, 690600, Russia;*

The structure and development of spermatozoa in the thelastomatid nematodes, *Hammerschmidtella cristata* and *Leidynema portentosa*, parasitizing in the hindgut of the Madagascar hissing cockroaches *Gromphadorhina portentosa* were studied using transmission electron microscopy. The male reproductive system of thelastomatids is monorchic with reflexed testis. Spermatogonia are densely packed polygonal cells with rounded nucleus and distinct nucleolus; centrioles of 9 singlets are located near each spermatogonium nucleus; the cytoplasm contains mitochondria and ribosomes. Spermatocytes occupy almost two-thirds of testis length. The spermatocyte nucleus enlarges and chromatin is dispersed on inner surface of the nuclear envelope; electron-dense mitochondria surround the nucleus; the cytoplasm contains Golgi bodies and lipid droplets. Late spermatocytes bear numerous filopodia. Spermiogenesis starts with condensation of nuclear chromatin and fusion of mitochondria into dense cluster. The nucleus has no nuclear envelope. It is located posteriad to this cluster and becomes elongated. Immature spermatozoa (3×6-7 μm) are elongated with widened anterior part and narrowed tail. Anterior part contains the cluster of mitochondria, a large electron-light body and numerous transparent vesicles of uniform size. Elongated and tapering nucleus protrudes into the tail-like posterior of the cell. All these peculiar characters of sperm morphology and development demonstrate the unique pattern of the thelastomatid male gametes within the order Rhabditida. (Support: RFBR 12-04-90847-mol_rf_nr; RFBR 11-04-00368-a; FEB RAS 12-III-A-06-098; RF 2010-220-01-180).

**MOLECULAR-TAXONOMIC STUDY OF TWO PINWORM SPECIES OF THE GENUS *PSEUDONYMUS*
(OXYURIDOMORPHA: THELASTOMATOIDEA: PSEUDONYMIDAE) FROM WATER BEETLES
(COLEOPTERA: HYDROPHILIDAE) OF THE ASTRAKHAN STATE RESERVE**

Guzeeva E.A.¹, Kosevich I.A.¹, Spiridonov S.E.¹

¹ Centre of Parasitology, A.N. Severtsov Institute Ecology and Evolution RAS, Moscow, 119071, Russia; E-mail: guzeyeva@mail.ru, s_e_spiridonov@rambler.ru

Parasitism of thelastomatid nematodes in the hindgut of hydrophilid beetles was reported from different regions of the world. Currently, thelastomatids of water beetles constitute the family Pseudonymidae. Taxonomic relationships of separate genera and species within this family are still not completely resolved, and additional characters for species identification are urgently needed. Two species of the genus *Pseudonymus* Diesing, 1857 were collected from the hindgut of a hydrophilid beetle (*Hydrophilus piceus* L.) sampled in the River Volga delta. Two species of thelastomatids were recovered, identified according to morphological features as *Pseudonymus islamabadi* (Basir, 1941) and *P. hydrophili* (Galeb, 1878). Pronounced sexual dimorphism prevents secure identification of con-specific males and females, and previously such judgments were based solely on comparative occurrence of the specimens of both sexes in dissected hosts. Sequences of the D2-D3 segment of the LSU rDNA for two morphological types of males and females were obtained and compared (alignment length 636-637 bp – nucleotide difference between two species – 44 bp). Complete identity of LSU sequences confirmed that females with strongly swollen the first, fifth and seventh cuticular annuli of the anterior end and 85×45 µm eggshells and males with narrowed tail with short spine appendage and 25 µm long spicule belong to *P. islamabadi*, whereas females with the only one widened annulus and 70×40 µm eggshells and males with rounded posterior end and spicule length of 27 µm belong to *P. hydrophili*. Morphological features of two *Pseudonymus* species from lower Volga are illustrated with SEM. Supported by RFBR 12-04-10100-k.

**THE HISTORY OF THE USDA NEMATODE COLLECTION AND ITS DATABASE: VALUABLE RESOURCES
FOR TAXONOMIC RESEARCH AND IDENTIFICATION**

Handoo Z.A.¹, Mowery J.D.¹, Chitwood D.J.¹

¹ USDA ARS Nematology Laboratory, 10300 Baltimore Ave., BARC-West, Bldg 10A, Beltsville, MD, 20705, USA; E-mail: zafar.handoo@ars.usda.gov;

Mention of trade names or commercial products in this publication is solely for the purposes of providing specific information and does not imply recommendation or endorsement by the United States Department of Agriculture.

Nematodes constitute an important group in the animal kingdom, and are highly adaptable and capable of surviving in any environment. So far, only a small percentage of the total species are known, and as new species are discovered, they reveal previously unknown agricultural problems (Golden, 1988). Systematics collections are a fundamental research resource, as they contain the specimens upon which all biological research is validated. These resources serve as a major asset for taxonomic research and are used for a wide variety of scientific and regulatory purposes including the facilitation of agricultural trade, the continued protection of agriculture against economically dangerous invasive species, and the advancement of nematode taxonomy and scientific research, including nematode identifications.

The U.S. Department of Agriculture Nematode Collection (USDANC), in Beltsville, Maryland, USA, is one of the largest and most comprehensive nematode repositories in the world. The Collection provides an enduring and stable foundation for the field of nematology and is essential for research on taxonomy, systematics, morphology and identifications. Nematology research in the United States originally began in the late 1800's, and involved many USDA nematologists later recognized as pioneers in the field of nematology. N. A. Cobb worked at USDA for 25 years, during which time he made significant contributions to the taxonomy of nematodes, and is recognized as the "Father of Nematology" in the United States. Other pioneering USDA nematologists include G. Steiner, G Thorne, B. G. Chitwood, J. R. Christie and A. L. Taylor, among others (Golden, 1977). For many years the collections of the USDA nematologists remained as individual personal collections that were not well organized or maintained; unfortunately, many valuable specimens deteriorated or were misplaced and collection records lost during these years. To remedy this problem, soon after the initiation of the current nematode taxonomy program, A. Morgan Golden established the USDA Nematode Collection in 1960 to serve as an official permanent repository that is well organized and contains detailed records of all specimens (Golden, 1962). A preventative maintenance program was also established so that aging slides can be periodically remounted as needed, and the process of salvaging material from the early USDA nematologists remains an ongoing effort. Over time the Collection has steadily expanded, and now includes over 45,000 slides and vials. The growth of the Collection has been facilitated by the deposition of new type specimens from scientists throughout the world, the continuous deposition of specimens received from worldwide sources for identification purposes, as well as the incorporation of personal collections received from individual scientists (Handoo *et al.*, 1998a). The nematode taxonomy program, which provides nematode identification services, has been a large factor in contributing to the success of the Collection. Every year more than 500 samples of nematodes are processed and identified, most of which are from regulatory agencies throughout the United States, and the nematodes from the majority of these samples are deposited into the USDA Nematode Collection.

The Collection consists of 7 constituent divisions of slides and vials, most of which are stored in fire-proof safes (Fig. 1 & 2). While the majority of specimens are plant-parasitic, the Collection also includes many free-living, insect-parasitic, marine and freshwater nematodes. The constituent divisions of the Collection are the Type Collection with 6,748 slides and 613 vials, the General Collection with 18,707 slides and 7,243 vials, the Thorne Collection with 6,600 slides, the Steiner Mermithid Collection with 2,303 slides, the Mass Collection with 1,035 slides and 1,102 vials, the Gates Collection with 356 slides, and a Demonstration Collection of 87 museum jars.

In the early days of the Collection, essential details of each specimen were recorded and filed in a card catalog system, and duplicate records were filed according to species, host, and origin (Handoo *et al.*, 1998b). However, all records are now digitized and are stored and maintained in a computer database. Currently the database is configured so that any new records are automatically uploaded to a USDA server and are then instantly searchable and available to the public at <http://nt.ars-grin.gov/nematodes/search.cfm>. This instant upload configuration represents a great improvement over previous upload methods and greatly improves the timeliness that information can be made available to the public. The database currently contains over 39,000 entries with essential data on nematode host and distribution recorded for each species.

The unique specimens and records in the Collection are extremely valuable and have been used to resolve billion-dollar issues involving agricultural trade. One of the oldest slides in the Collection is of *Mononchus longicaudatus*, from Australia, that was prepared by N.A. Cobb in 1890 (Golden & Huettel, 1990). Identification of new or potentially harmful species of nematodes is important to the success to modern agriculture and aids in the development of quarantine or regulatory procedures to prevent their spread. In 2006, for example, when the pale cyst nematode

was discovered in Idaho, the immediate implementation of a federal quarantine on this serious pest helped prevent the spread of this species in the United States; thereby saving millions of dollars in annual crop losses. The study of original type material of *Globodera pallida* on deposit in the Collection was invaluable in confirming the final identification of the Idaho material (Skantar *et al.*, 2007). Furthermore, systematists often must study type collections thoroughly, and future generations performing comprehensive revisionary work will also need to re-examine type specimens. The Collection serves as a valuable asset especially in regards to revision of earlier described material. For example, during an examination of archival material, several nematode genera from the Collection were found attacked by the bacterial parasite, *Pasteuria*. This revealed substantial information on this important pathogen and helped in the discovery of a new species of bacteria (Sayre *et al.*, 1988). The Collection contains unique and interesting specimens and invaluable information about nematodes, which scientists throughout the world have regularly incorporated into their research and subsequent publications.



Fig. 1. Slides of type specimens organized in wooden slide boxes inside a fire-proof safe.



Fig. 2. Vials of nematodes on deposit in the USDA Nematode Collection

Since it is not always possible for scientists to personally visit the Collection, specimens are available for loan for limited periods at the responsibility of a recognized scientist or institution. The utmost care should be taken when handling these valuable specimens and all material should be promptly returned after examination. Scientists are encouraged to visit the Collection in order to study material in person. New type specimens and other material are always welcomed and appreciated when deposited into the Collection.

REFERENCES

- GOLDEN, A. M. 1962. Transfer of type specimens of certain plant nematodes to a new collection. *Nematologica* 8: 84-85
- GOLDEN, A. M. 1977. USDA Nematode Collection. In: *Systematic Collections of the Agricultural Research Service*. pp. 61-64. USDA ARS, Miscellaneous Publication No. 1343, 84 pp.
- GOLDEN, A. M. 1988. Perspectives in nematology. In: *Advances in plant nematology* (M. A. Maqbool, A. M. Golden, A. Ghaffar, and L. R. Krusberg. Eds.). pp. 15-22. M/S Shamim Printing Press, Karachi, Pakistan.
- GOLDEN, A. M. & HUETTEL, R. N. 1990. The USDA Nematode Collection and its oldest slide. *Nematology Newsletter* 36: 20-21.
- HANDOO, Z. A., GOLDEN, A. M. & ELLINGTON, D. M. S. 1998a. Nematodes - USDA Nematode Collection. In: *Systematic Collection of the Agricultural Research Service, revised* (Lichtenfels, J.

- R., J. H. Kirkbride, Jr., and D. J. Chitwood. Eds.). pp. 48-52. USDA ARS, Miscellaneous Publication No. 1343, 77 pp.
- HANDOO, Z. A., GOLDEN, A. M. & ELLINGTON, D. M. S. 1998b. Type specimens on deposit in the United States Department of Agriculture Nematode Collection. *Journal of Nematology* 30: 108-158.
- SAYRE, R. M., STARR, M. P., GOLDEN, A. M., WERGIN, W. P., & ENDO, B. Y. 1988. Comparison of *Pasteuria penetrans* from *Meloidogyne incognita* with a related mycelial and endospore-forming bacterial parasite from *Pratylenchus brachyurus*. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 55: 28-49.
- SKANTAR, A. M., HANDOO, Z. A., CARTA, L. K., & CHITWOOD, D. J. 2007. Morphological and molecular identification of *Globodera pallida* associated with potato in Idaho. *Journal of Nematology* 39: 133-144.

PHYLOGENY, TAXONOMY AND EVOLUTION OF REPRODUCTION WITHIN THE NEMATODE GENUS PRATYLENCHUS: A MULTI-GENE APPROACH COMBINED WITH KARYOTYPING

Janssen T.¹, Karssen G.², Couvreur M.¹, Bert W.¹

¹ *Nematology Unit, Ghent University, Department of Biology, Ledeganckstraat 35, 9000 Ghent, Belgium; E-mail: Toon.Janssen@UGent.be*

² *Plant Protection Service, Nematology section, P.O Box 9102, 6700 HC Wageningen, The Netherlands*

Root-lesion nematodes of the genus *Pratylenchus* (Filipjev 1936) are an important pest in economic crops (Sasser and Freckman 1987). They have a worldwide distribution (except for polar regions) and can parasitize on a very wide range of plants. At the moment the genus counts about 70 described species, but identification of the different species based on morphology remains problematic. Within the genus reproduction strategies vary from amphimixis over meiotic to mitotic parthenogenesis. Also karyotypes are highly variable and polyploidy is certainly present and probably associated with asexual reproduction (Roman and Triantaphyllou 1969). Current study is based on as much as species as possible, sampling will be done at type locations if possible, and all populations are studied from multiple and complementary perspectives. Morphology is documented using light and electron microscopy and mode of reproduction and karyotypes are elucidated by in vitro staining of reproductive systems. This information will be analyzed in a multi-gene comparative evolutionary perspective to obtain a better insight in evolution of reproductive strategies, genome evolution and phylogenetic relationships. The obtained data and outcomes will be highly valuable towards a complete integrative taxonomy of the genus *Pratylenchus*, the first results will be presented here.

VALIDATION OF THE FLASH-PCR METHOD FOR IDENTIFICATION *GLOBODERA ROSTOCHIENSIS* (WOLL.) BEHRENS

Khudyakova E.A.¹, Sudarikova S.V.¹

¹ *All-Russian Plant Quarantine Centre, 140150, Moscow region, village Byikovo; E-mail: vniikr@mail.ru*

A research on recognition of reliability (validation) of cyst nematode diagnostics employing a commercial diagnostic set produced by the company «Agrodiagnostika» (Moscow) was conducted. The following indicators of validation were defined according to the EPPO PM Standards 7/84, RM 7/98:1. The analytical sensitivity. In a series of experiments it was shown that the detection limit of viable cysts was at least five larvae or eggs per sample, and not less than 50 larvae or eggs per sample for non-viable cysts. 2. Analytical specificity. As a result of the

experiment nonspecific reaction of employed primers with *Globodera pallida* and *Heterodera sp* were not detected. Along with this specific reaction with *Globodera rostochiensis* was observed. The experiment revealed high specificity of the employed set for FLASH-PCR to *Globodera rostochiensis*. 3. Repeatability. The study was conducted on one and the same day by one and the same operator employing one and the same equipment. The experiment showed a significant repeatability 100%. 4. Reproducibility. Results of this experiment also allowed to identify *Globodera rostochiensis* in all samples, which indicates high method reproducibility. As a result of the study a conclusion that the molecular FLASH-PCR method is suitable for identification of a cyst nematode of *Globodera rostochiensis* (Woll.) Behrens in diagnostic quarantine laboratories was drawn.

FAUNA AND ECOLOGY OF WOOD-HABITING NEMATODES FROM BRITTLE WILLOW (*SALIX FRAGILIS*) IN RUSSIAN CENTRAL EUROPEAN PART.

Khusainov R.V.¹

¹ Center of Parasitology A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, RAS, Leninsky prospect 33, Moscow, 119071, Russia.

Fauna and ecology of wood-habiting nematodes dwelling in brittle willow (*Salix fragilis*) and their relation to various wood life cycles were studied in 2010-2012. Samples were collected in 6 regions of Central European Part of Russia. They were divided into 6 types based on three main parameters such as rind surface structure, sanitary state of wood and presence of simple or complicated epiphytes. Consequently representatives of 32 genera from 18 families belonging to 8 orders were detected. Phleobionts (algaephages and bacteriophages) were dominated in strong woods without any mechanical destructions (type A and type B). Dorylaimids and plectids were also present in woods that had been covered by complicated epiphytes (moss and lichen) a lot (type C). There were many various mycetophages from Aphelenchida and Tylenchida orders in glabrated woods (type D). Saprobionts and edaphobionts predominated in perished and decayed woods (types E and F). Entomopathogenic species were discovered only in both last types as a rule, but their quantities differed strongly.

DEVELOPMENT OF A COMPUTER MODEL "FORECAST YIELD LOSS OF POTATO DEPENDING ON THE INTENSITY OF GLOBODEROZ"

Kolesova E.A.¹, Shesteporov A.A.¹

¹ Russian State Agrarian External University, Balashicha, 143900, Russia;
E-mail: zr-kaf@mail.ru

The mathematical predictive models of potato yield loss for two varieties of potato: Sineglazka and Nevsky were worked out. The first group of models demonstrated the potato crop loss, dependence on the population density of golden potato nematode (the coefficient of determination $R^2 = 0.303$, $R^2 = 0.326$); the second group of models showed the potato yield loss dependence on the intensity of globoderoz development (the coefficient of determination $R^2 = 0.68$, $R^2 = 0.76$). The latter models were more mathematically sound. Inverse proportion was observed between potato yield and intensity of globoderoz development. The dependence of the potato yield on intensity of globoderoz development could be mathematically described by the formula: $y=b-ax$, where b – coefficient, which depends on the variety, features, x – intensity of globoderoz development in %. Imitational experiments involving the interactive computer model revealed that the intensity of globoderoz development (from 10 to 90%) caused yield losses of Sineglazka potato variety (from 12.2 to 78.2%), Nevsky variety (from 10.8 to 64.9 %).

PRELIMINARY STUDY FOR MASS PRODUCTION OF *MYLONCHULUS* SP. IN LABORATORY CONDITION

Koohkan M.¹, Shokoohi E.¹

¹ *Plant Protection Department, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran; E-mail: eshokoohi@mail.uk.ac.ir*

Predatory nematodes play a vital role in food web ecology. *Mylonchulus* is a widely distributed predatory soil nematode and is of interest in the study of soil ecology, yet very little information exists on its *in vitro* culturing. In this investigation, an artificial environment (SEA) was created to maintain *Mylonchulus* for mass productional studies. One hundred prey nematodes (e.g. *Tylenchus*, *Aphelenchus*, *Helicotylenchus* and *Ditylenchus*) were added as food sources. The petridishes were maintained under 25°C in a dark condition. Five adults were added to each petridishes. The number of *Mylonchulus* has been recorded 54, 60 and 65 days after nematode inoculation to the medium. The first juveniles were observed after 56 days, they increased to 10 after 60 days, and after 65 days their number increased to 15. The results revealed that juvenile of *Mylonchulus* could not survive without adults in cultured medium, and, therefore, may adults prepare the prey for juveniles. Furthermore, a thin layer of water is needed for activation and mass production of *Mylonchulus* in medium.

TO BIOLOGY OF NEMATODES OF GENUS *BURSAPHELENCHUS* EAST POLES'YA OF UKRAINE

Korma A.M.¹

¹ *Chernigov State Institute for Economics and Management, 1 Streletskaya St., Chernigov, 14033, Ukraine; E-mail: korma@km.ru*

Research of wood nematodes fauna enabled to determine composition of *Bursaphelenchus* nematodes species in Eastern Polissia, Ukraine. The nematodes are represented by three species: *Bursaphelenchus mucronatus* Mamiya et Enda, *Bursaphelenchus sexdentati* Ruhm, and *Bursaphelenchus eggersi* Ruhm. *B. mucronatus* species predominate among xylobiont nematodes and have detection frequency of 54,1%. Some ecological peculiarities of *B. mucronatus* nematodes area of distribution enlargement due to bugs-carriers not described previously in the literature have been established. The author makes assumption related to ascertained ecological peculiarities and domination of *B. mucronatus* species. The research showed the fact of transfer of *Buprestis mucronatus* nematodes by coniferous *Buprestis octogutta* L. (*Ancylocheira octoguttata* L.)

SPECIFICS OF SCOTCH PINE SEEDLINGS NEMATODOSIS DEVELOPMENT, PROBLEMS OF THEIR DIAGNOSTICS AND THE FORECAST.

Koropets S.I.¹

¹ *National University of Life and Environmental Sciences, Heroyiv Oborony str., 15, Kyiv-03041, Ukraine; E-mail: bulterius@mail.ru*

The complex of plant nematodes, associated with Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) in Ukrainian forestry nurseries, was investigated. We have detected 67 species of plant nematodes. According to the ecotrophic characteristic, all species belong to 4 groups: phytohelminths (17 species), mycohelminths (9 species), saprobic (36 species) and predatory (5 species). Phytohelminths *Coslenchus costatus*, *Aglenchus agricola*, *Pratylenchus vulnus*, *Ditylenchus dipsaci*; mycohelminths *Aphelenchoides asterocaudatus*, *Aph. minimus* and saprophages *Acrobeloides buetschlii*, *Cervidellus insubricus* were common to the rhizosphere of healthy seedlings. Peculiarities of nematodoses development and problems of their monitoring are discussed.

HOST RANGE AND GEOGRAPHICAL DISTRIBUTION OF *SPHAERULARIA VESPAE*, A PARASITE OF HORNETS

Kosaka H.,¹ Sayama K.,² Kanzaki N.,³ Makino S.⁴

¹ Kyushu Research Center, Forestry and Forest Products Research Institute, Kurokami 4-11-16, Kumamoto 860-0862, Japan; E-mail: hkosaka@ffpri.affrc.go.jp,

² Hokkaido Research Center, Forestry and Forest Products Research Institute, Hitsujigaoka 7, Sapporo, Hokkaido 062-8516, Japan; E-mail: sayama@ffpri.affrc.go.jp,

³ Department of Forest Microbiology, Forestry and Forest Products Research Institute, Matsunosato 1, Tsukuba, Ibaraki 305-8687, Japan; E-mail: nkanzaki@ffpri.affrc.go.jp ,

⁴ Principal Research Coordinator, Forestry and Forest Products Research Institute, Matsunosato 1, Tsukuba, Ibaraki 305-8687, Japan; E-mail: makino@ffpri.affrc.go.jp

Sphaerularia vespae has been found in a common Japanese hornet, *Vespa simillima*, and described as the second species of the genus *Sphaerularia*. Another species of this genus is *S. bombi*, a well-known parasite of bumblebees. As is the case with *S. bombi*, potential queens of *V. simillima* parasitized by *S. vespae* are sterilized. To understand the basic ecology of *S. vespae*, its host range and geographical distribution were investigated. *S. vespae* was found in four of the seven species of hornets (*Vespa* spp.) native to Japan: *V. simillima*, *V. mandarinia*, *V. dybowskii* and *V. ducalis*. In *V. analis*, only immature *S. vespae* were found but no mature nematodes were detected. This suggests that *V. analis* is not a host of *S. vespae* and that *S. vespae* cannot complete its lifecycle in *V. analis*. *S. vespae* was not found in *V. crabro* and *V. affinis*. *S. vespae* was found in Hokkaido, Honshu and Kyushu. In Hokkaido the prevalence of *S. vespae* was highest in *V. simillima*, while in Kyushu it was highest in *V. mandarinia*; both are dominant hornet species in their respective regions. These results suggest that *S. vespae* is widely distributed across the main islands of Japan from Hokkaido to Kyushu. *S. vespae* has not been found, however, in Iriomote Island, located almost at the southwest end of Japan, nor in Korea. Further research is necessary to confirm host adaptation of *S. vespae* to *V. crabro* and *V. affinis* and its distribution in the southern islands of Japan and other countries.

MORPHOLOGICAL ANOMALIES OF FREE-LIVING MARINE NEMATODES OF THE BLACK SEA

Kosheleva T.N.¹

¹ Institute of Biology of the Southern Seas, NAS Ukraine, 2, Nakhimov av., Sevastopol, 99011, Ukraine; E-mail: alinka8314@gmail.com

New data concerning morphological anomalies of nematodes found in the coastal zone (Sevastopol region) and the oxic/anoxic interface (NW Crimea and the Bosphorus region) of the Black Sea have been discussed. The structure and localization of amphid are species-specific features of free-living nematodes. Normally amphid is a paired organ having certain localization in the anterior part of body. Previously (Sergeeva, 1991, 2003) the following spectrum of amphids anomalies was marked: 1) the number of amphids could be 1-5 instead of two in norm; 2) the form of amphids could be different; 3) one of two amphids in specimens could be underdeveloped; 4) one of two amphids could be divided into parts; 5) amphids location in relation to anterior edge and to the axis symmetry of the body is violated.

Our new data show that the number of Black Sea nematodes that manifesting such deviation, has increased from 13 to 33 species. Most often we found anomalous specimens in the following populations: *Terschellingia longicaudata* (0,6-100%), *Axonolaimus setosus* (2,4-100%), *Parodontophora quadristicha* (2,9-100%). Present study, as well as previous ones, showed that

such spectrum of abnormality in development of amphids of the Black Sea nematodes is not an accidental phenomenon. Obviously, anomalous features may be hereditary because they are found in the same species in females, males and young specimens. Accumulated data concerning the anomalous development of nematodes in various water areas of the Black Sea, may indicate the reaction to some adverse environmental conditions and should be observed in the other waters as well.

NATURAL FLOODING EFFECTS ON SOIL NEMATODES COMMUNITIES

Kudrin A.¹, Lapteva E.¹

¹ *Institute of Biology, KomiSC, RAS, Kommunisticheskaya st. 28, Syktyvkar, Russia;*

E-mail: allkudrin@gmail.com

Flood plains are unique ecosystems that consist of two subsystems, an aquatic and a terrestrial one. In their natural state, floodplains are amongst the most dynamic and heterogeneous ecosystems, showing complex patterns of variation over a wide range of temporal and spatial scales (Tockner et al., 2010). Through of frequently inundation, floodplain soils receive a generous amount of nutrient-rich sediments. This makes floodplains one of the most productive natural ecosystems of the world. The time and duration of flooding significantly affect productivity. Inundation of floodplain also can be a stress to the both aboveground and belowground biota. Although often ignored, changes in below-ground environments following flooding are no less important than those that occur above-ground. As observed abundance and biomass of soil invertebrate are immediately reduced by flooding. The effect becomes stronger with flooding duration (Plum, 2005). In addition, many soil animals have survival strategies in flooded conditions (Adis and Junk, 2002). Soil nematodes are protoaquatic organisms. And it has a high resistance to environmental extremes through resistance adaptation and other types of the survival strategies (McSorley, 2003). And probably, can be resistant to the spring/summer flood. However, no data on the response of soil nematodes to the natural flooding. Our objective was to examine the effects of flooding duration on nematode in the floodplain.

The study was conducted on floodplain forests of the Pechora and Sisola River, taiga zone of northwest Russia. At the each floodplain were evaluated three sites having various flooding time: (1) brief flooding, 2-3 days; (2) moderate flooding, 2-3 weeks; (3) extended flooding, 8-12 weeks (Table 1). Soil sampling for nematodes and soil properties was performed three times during summer, on June, July and August 2010.

Table 1.

Floodplain	Pechora River			Sisola River		
Site	PF1	PF2	PF3	SF1	SF2	SF3
Flooding intensity	brief	moderate	extended	brief	moderate	extended

Soil cores (3 cm diam.) were taken at 0-13 cm depth at each site. Thus, eight samples were collected from each site on each sampling date, each of which was analyzed separately. Nematode populations expressed as number of nematodes per 100 cm³. Total nematode abundance was analyzed with a one-way analysis of variance (ANOVA). Significance was determined at the P<0.05 level. Significant differences among plots that experienced various inundation time were assessed with the Fisher LSD test (P<0.05). The data for total nematode abundance was log_{n+1} transformed before analysis. All statistical analyses were performed using STATISTICA 6.0.

After floodwaters receded in June 2010, duration of inundation had negative effect on nematode abundance both in the floodplains Pechora and Sisola River (ANOVA). LSD Fisher post-

hoc test showed significant ($p < 0.05$) differences between plots that experienced various inundation time in June 2010 (Table 2). One month after floodwaters receded in July 2010, nematode abundance did not differ between briefly and moderately flooded sites in the floodplains of Pechora River (PF1 and PF2) and between sites briefly and longer-duration flooded in the floodplains of Sisola River (SF1 and SF3). Soil moisture (GWC) had no significant differences between briefly and moderately sites both in the floodplains Pechora and Sisola River (Table 2). Two month after floodwater had receded (August 2010) nematode abundance did not differ among plots that experienced various inundation time. GWC had no significant differences between briefly and moderately sites in the floodplains of Pechora River and between all plots of the floodplains of Sisola River (Table 2).

Table 2. Gravimetric water content and mean abundance of nematode in the floodplains of Pechora and Sisola River

	June			July			August		
	PF1	PF2	PF3	PF1	PF2	PF3	PF1	PF2	PF3
Floodplaine of Pechora River									
GWC	0.93 ^a	0.97 ^a	2.80 ^b	0.66 ^a	0.62 ^a	1.43 ^b	0.72 ^a	0.63 ^a	2.34 ^b
Mean abundance (ind./100cm ³)	3657 ^a	917 ^b	422 ^c	2572 ^a	786 ^b	296 ^b	553 ^a	362 ^a	611 ^a
Floodplaine of Sisola River									
GWC	0.84 ^{ab}	0.40 ^b	2.42 ^a	0.29 ^a	0.34 ^a	1.50 ^b	0.67 ^a	0.73 ^a	1.01 ^a
Mean abundance (ind./100cm ³)	2424 ^a	1071 ^b	496 ^c	483 ^a	337 ^b	937 ^a	406 ^a	724 ^a	455 ^a

Different letters indicate significant differences between the plots that experienced various inundation time determined by Fisher LSD test at $P < 0.05$

Negative effect possibly induced changes in soil properties. Thus, the major consequence of flood is a decrease in oxygen concentration (Greenwood, 1961). Various authors reported that low O₂ concentration lead to disruptive nematode survival and reproduction (Cooper et al., 1970; Kung et al., 1990). With the depletion of oxygen, the concentration of CO₂ rises, and NH₄, which is toxic to soil animals, accumulates (Plum, 2005). Moreover, according to Porazinska et al. (1999), waterlogger soils may become oxygen deficient and stimulate sulfate-reducing bacteria to produce sulfur compounds toxic to nematodes. Flooding can result in soil compaction, consolidation, and loss of soil structure. Soil pores, the habitat of soil invertebrate, can easily become blocked by sediments (Plum, 2005). Water-filled soil pores require nematodes to swim, an inefficient form of locomotion for most species (Barbercheck, Duncan, 2004).

Effect of inundation time was found immediately after floodwaters receded. Two months after the flood, no significant distinction in nematode abundance was founds between plots that experienced various inundation time. This finding likely indicated on apparent sensitive soil nematodes to flood on study floodplains, but fast reversible consequence of spring inundation for nematodes. Obtained effect is consistent with a general trend observed by Plum (2005) for macrofauna of floodplain ecosystems. According to this trend, abundances and biomass of soil invertebrates (macrofauna) are immediately reduced by flooding. The effect becomes stronger with flooding duration and rising temperatures, but even then, it is reversible and will normally be compensated to a large extent during the next soil-dry period.

CONCLUSION

Our results are strongly indicative of negative impact of natural flooding on soil nematodes, and they clearly correlate with general trend, according to which abundances and biomass of soil invertebrates are immediately reduced by flooding. The effect becomes stronger with flooding duration, but even then, it is reversible and will normally be compensated to a large extent during the next soil-dry period. One of the major reasons of negative effect is probably a decrease oxygen concentration in the soil that has direct and indirect influence on nematodes.

REFERENCE

- Tockner K., Lorang M.S., Stanford J.A. River flood plains are model ecosystems to test general hydrogeomorphic and ecological concepts // *River Research and Applications*. 2010. Vol. 76. P. 76–86.
- Plum N.M. Terrestrial invertebrates in flooded grassland—a literature review // *Wetlands*. 2005. Vol. 25. P. 721–737.
- Cooper A.F., Van Gundy S.D. Metabolism of glycogen and neutral lipids by *Aphelenchus avenae* and *Caenorhabditis* sp. in aerobic, microaerobic and anaerobic environments // *J. Nematol.* 1970. Vol. 2. P. 305–315.
- Kung S., Gaugler R., Kaya H.K. Influence of soil pH and oxygen on persistence of *Steinernema* spp. // *Journal of Nematology*. 1990. Vol. 22. P. 440–445.
- Greenwood D. J. The effect of oxygen concentration on the decomposition of organic materials in soil // *Plant and soil*. 1961. Vol. 14. P. 360-376.
- Barbercheck M.E., Duncan L. Abiotic factors // In R. Gaugler & A.L. Bilgrami (eds.). *Nematode behavior*. 2004. CABI Publishing, Wallingford, UK. P. 309-344.
- Adis J., Junk W.J. Terrestrial invertebrates inhabiting lowland river floodplains of Central Amazonia and Central Europe: A review // *Freshwater Biology*. 2002. Vol. 47. P. 711-731.
- McSorley R. Adaptations of nematodes to environmental extremes // *Florida Entomologist*. 2003. Vol. 86. P. 138-142.
- Porazinska D.L., Duncan L. W., McSorley R., Graham J. H. Nematode communities as indicators of status and processes of a soil ecosystem influenced by agricultural management practices // *Appl. Soil Ecol.* 1999. Vol. 13. P. 69-86.

BURSAPHELENCHUS MUCRONATUS NEMATODES AND THEIR ASSOCIATED BACTERIA AS A POSSIBLE CAUSE OF THE PINE FOREST DEATH IN RUSSIA

Kulinich O.A.^{1,2}, Arbusova E.N.², Kozyreva N.I.², Mazurin E.S.², Romashova N.B.²,
Kolychikhina M.S.², Ryss A.Yu.³

¹ *Center of Parasitology, A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, RAS
Leninsky prospekt 33, Moscow, 119071, Russia; E-mail: okulinich@mail.ru;*

² *All-Russian Plant Quarantine Centre, 140150, Moscow region, village Byikovo;*

³ *Zoological Institute RAS, St. Petersburg, 199034, Russia, E-mail: nema@zin.ru;*

During the survey of conifer forests in Russia (2010-2012), twenty four isolates of the wood-inhabiting nematode *Bursaphelenchus mucronatus* were extracted and propagated *in vitro* to determine the symbiotic bacteria associated with them. Sixteen species of bacteria belonging to nine families *Enterobacteriaceae*, *Xanthomonadaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Burkholderiaceae*, *Rhizobiaceae*, *Nocardiaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Paenibacillaceae* were isolated from the nematodes and identified, i.e.: *Achromobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas*, *Pantoea*, *Paenibacillus*, and *Serratia*. Bacterium *Pseudomonas fluorescens* was isolated from nine *B. mucronatus* isolates. According to the results of Chinese researchers *P. fluorescens* is an

essential species of the nematode-bacterial complex that induces Pine Wilt Disease in pine forests of southern China. Thus, we can make an assumption that in 2010, *B. mucronatus* nematodes and symbiotic bacteria of *P. fluorescens* caused the death of some pine forests in areas where the mean air temperature in European Russia was 26.4 °C in June and 25.5 °C in August.

TEMPERATURE PRIMING – A BASE OF ENHANCED OF PLANT RESISTANCE TO PHYTONEMATODE

Lavrova V.V.¹, Sysoeva M.I.¹, Matveeva E.M.¹

¹ *Institute of Biology of Karelian Research Centre RAS, Pushkinskaya St., 11, Petrozavodsk, 185910, Russia; E-mail: VVLavrova@mail.ru;*

A potato cyst-forming nematode (PCN) *Globodera rostochiensis* Woll. is one of the harmful potato crop parasite. Plants can acquire enhanced resistance to pathogens after treatment with synthetic or natural compounds (for example, β -aminobutyric acid, chitosan). The induced resistance is associated with an enhanced capacity for the rapid and effective activation of local and systemic defense responses. This process is called 'priming'. Priming can be mediated by temperature, because the latter modulates plant immune responses. The aim of the study was to investigate potato plant responses to short-term low temperature impact before nematode infestation. Experiments were conducted in the growth chamber and the field conditions on seedlings and tuber respectively. Resistance formation to PCN, level of resistance gene expression, activity of photosynthetic apparatus and fatty acid content were analyzed. Results showed that independently of treatment period (tubers or seedlings) temperature drop decreases nematode infestation level and promotes plant fitness. DROP-treated potato contained more polyunsaturated fatty acids. These plants also expressed elevated level of nematode resistant gene (*H1*). Thus short-term temperature drop may lead to the induction of a primed state of potato plant that sensitizes the tissue for improved elicitation of various defense responses during nematode invasion. Plant temperature priming may be a result of histone modifications and chromatin remodeling. Research was supported by Ministry of Education and Science of Russian Federation (project 8050).

SOIL NEMATODE COMMUNITIES UNDER ANNUAL AND PERENNIAL CROPS

Matveeva E.M.¹, Sushchuk A.A.¹, Diyeva D.S.¹

¹ *Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, 11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Russia; E-mail: matveeva@krc.karelia.ru*

Permanent (common) and variable (specific) components of nematode fauna under annual (potato, cabbage, carrot and beet) and perennial (seeded meadow with single species *Phleum pratense* L.) were determined. Nematode fauna under alien species *Heracleum sosnowskyi* Manden was compared to nematode communities of different types of agrocenoses and plants introduced and naturalized in biocenoses. Taxonomic diversity (16 genera) and nematode quantity (250 ind./100 g soil) were low under annual crops, especially carrot and beet, but high under *P. pratense* and *H. sosnowskyi* (27 genera, 1241-5125 ind./100 g soil). Common taxa for annual crops according to semi-taxonomic feeding classification belonged to Rhabditida *r*- and *k*-strategic bacterial feeders (7 genera), Adenophorea bacterial feeders (1), Tylenchida fungal feeders (3) and Dorylaimida omnivores (2). Under annual crops, maturity, channel and structure indices values were low and enrichment index was high. Therefore, regular agrotechnics use led to domination of bacterial feeders with *c-p*=1 and simplification of community structure. Soil ecosystems were assessed as disturbed. In biocenoses with *P. pratense* and *H. sosnowskyi* *MI* and *CI* were higher

and *EI* was lower. Introduction and subsequent establishment of alien species in plant community (at the edge of potato crop) did not lead to negative consequences for nematodes during 10 years. Nematode fauna stayed similar to that of potato crop in species composition but differed by occurrence of Adenophorea bacterial feeders uncommon for agrocenoses. Low *SI* (16.3) indicated degraded food web and stressed state of soil ecosystem. Research was partially supported by Programme of Fundamental Research of Biology Department RAS.

VARIATION IN REPRODUCTION AND PATHOGENICITY OF GEOGRAPHIC ISOLATES OF *ROTYLENCHULUS RENIFORMIS* ON COTTON IN AMERICA.

McGawley E.C.¹, Overstreet C.¹, Pontif M.J.¹

¹ Louisiana State University Agricultural Center, Baton Rouge, LA 70803; USA;

E-mail: emcgawley@agctr.lsu.edu

The comparative reproduction and pathogenicity of isolates of *Rotylenchulus reniformis* from the American states of Alabama, Arkansas, Hawaii, Louisiana, Mississippi and Texas on cotton was evaluated in microplot trials. Prior to initiation of microplot trials, ten single egg mass (SEM) populations of each geographic isolate were derived from single egg masses. Reproduction of the SEM populations of each geographic isolate were evaluated in greenhouse studies with Stoneville LA887 cotton by assessing the numbers of vermiform stages in soil and eggs per gram of root tissue 60 days after inoculation. On the basis of these trials, each repeated once, one SEM population of each of the six isolates was selected for use in microplot trials. Averaged over the two trials, SEM population designations selected for use in microplot trials and their respective reproduction values (*R*, where $R = Pf/Pi$) and numbers of eggs per gram of root were: AL-8 (*R*=14.9, eggs=202); AR-3 (*R*=30.4, eggs=525); HI-9 (*R*=20.2, eggs=183); LA-3 (*R*=18.2, eggs=517.); MS-7 (*R*=25.7, eggs=602) and TX-10 (*R*=42.8, eggs=938). Data from full-season (147 days) microplot trials, averaged over 2 years, showed significant differences (Tukey's HSD test ($P < 0.05\%$)) among isolates of reniform nematode in both reproduction and pathogenicity. Dry plant weight at harvest averaged 370.6 g for the non-inoculated control. All isolates except the one from HI produced root weights at harvest that were reduced significantly below that of the control. Harvest weights for plants inoculated with LA-3 and MS-7 were significantly lower than those from the other four geographic regions.

SEASONAL DISTRIBUTION OF FREE-LIVING AND PLANT PARASITIC NEMATODES IN THE RIZOSPHERE OF APPLE IN KERMAN PROVINCE OF IRAN

Mehdizadeh, S.¹, Shokoohi, E.²

¹ Young Researchers Society, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

² Department of Plant Protection, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran; E-mail: eshokoohi@mail.uk.ac.ir

The seasonal distribution of the free living (rhabditids) and plant parasitic nematodes (tylenchids) were investigated over a 1-year period. Samples were collected at depths of 35-40 cm, on clay soil of the rhizospheres of apple trees in November, March, May and July of 2012. Nematodes were ranged from 2 to 63 individuals per 10 cm² soil. Enzyme Commission number (EC) and Potential of hydrogen (pH) features were determined. The pH ranges from 7.3 to 8.02 in different seasons. The total nematode density was low during November (autumn) (24 individuals/300 cm²) and reached a maximum number of 223 individuals/300 cm² soil in March (winter). The results indicated that population dynamics of nematodes have a direct relationship

with EC and pH. Therefore, if pH increases, density of plant parasitic nematodes increases, while, density of free living nematodes decreases. On the other hand, the results of pH indicate that when pH is 8.2, the plant parasitic nematodes have maximum density. In this condition, the genus *Pratylenchus* has maximum density (March, pH=8.2). However, in pH=7.50 the genus *Panagrolaimus* reaches maximum density (44 individuals/300 cm² soil). Furthermore, distribution of the genera depends on the season. The results showed that the genus *Acrobeles* only found in spring (May). However, the most frequent nematodes were *Helicotylenchus*, *Pratylenchus*, *Aphelenchus*, *Panagrolaimus* and *Mesorhabditis* that found in all seasons.

NEMATODES ASSOCIATED WITH VEGETABLE CULTURES IN GREENHOUSES OF SARATOV REGION.

Migunova V.D.¹, Lychagina S.V.¹

¹ All-Russian K.I. Skryabin Scientific Research Institute of Helminthology, Bolshaya Cheremushkinskaya 28, Moscow, 117218, Russia; E-mail: barbarusha@rambler.ru

The analysis of rizosphere soil of three greenhouses in Saratov region for presence of plant parasitic and free-living nematodes was performed. The analyzed territory total area was three hectares. The total number of nematodes was 392±48 specimens per 100 ml of soil. Average number of *Meloidogyne incognita* larva was 120 specimens per 100 ml of soil. Other genera were represented by *Acrobelloides*, *Rhabditis*, *Acrobeles*, *Aphelenchoides*, *Dorylaimus*, *Plectus*. A four-fold increase of the number of predacious nematode *Butleriellus* sp. and presence of dorylaimids led to the decrease of numbers of root-knot nematode larva in the nematode-complex (from 32 to 19%). This might be related to regulatory impact of predators under greenhouse conditions. Thus the fauna of predacious nematodes of greenhouses is poor. Nematodes of family Mononchidae were absent in greenhouse substrate. The dorylaimid nematodes were rare and few. The predacious nematodes of genus *Butlerius* (fam. Diplogasteridae) were frequently registered in greenhouse substrate. This nematode genus may be considered a potential agent of biological control of plant parasitic nematodes under greenhouse conditions.

FITNESS OF PATHOTYPE RO1 *GLOBODERA ROSTOCHIENSIS* ON PARTIALLY RESISTANT POTATO HYBRIDS

Mironenko N.V.¹, Rogozina E.V.², Limantseva L.A.¹, Afanasenko O.S.¹

¹ All Russian Institute for Plant Protection, Pushkin, shosse Podbelskogo, 3, St. Petersburg, Russia, 196608; E-mail: nina2601mir@mail.ru

² N.I. Vavilov Research Institute of Plant Industry (VIR), 42-44, B.Morskaya Street, 190000, St. Petersburg, Russia;

An interaction between the golden nematode *Globodera rostochiensis* (Woll.) Behrens pathotype Ro1 and potato have been studied by using partially resistant potato hybrid clones which are the offspring of wild species native to South America. A few cysts formed on the roots of partially resistant plants were used for re-infection of the same genotypes of potato interspecific hybrids. Reproductive ability of the nematode second generation after two inoculations of 12 hybrid clones was measured by the index of reproduction and the number of larvae per cyst. On six potato hybrid clones the indexes of reproduction in the second generation were evaluated as "0", so there was not propagation of *G. rostochiensis*. On the other six potato clones we observed the suppression of nematode propagation. Reproductive ability was lower than on the roots of a cultivar Nevsky: the index of reproduction estimated 0, 5-4,69 versus 10, 33 and the number of larvae per cyst estimated on average 34 versus 67 pcs. Proportion of nematode cysts having a small number of larvae (30 pcs) in a second generation progeny collected from hybrid clones was

three times more than from Nevsky. We found single large cysts (5% and 1%) with 80-160 larvae after second inoculation on hybrids with *S. doddsii* and *S. incamayoense* in pedigree. On cultivar Nevsky number of large cysts was determined as 17-22%. Our results show that the initial soil-born population of *G. rostochiensis* is heterogeneous. Depending on the genotype of the host plant, selection among hatched larvae has occurred.

IMPACT OF SKI RUNS ON SOIL NEMATODE ASSEMBLAGES FROM DIFFERENT HABITATS ON NORTH PIRIN MOUNTAIN – PRELIMINARY RESULTS

Mladenov A.¹, Lazarova S.¹, Elshishka M.¹, Mincheva Y.¹, Peneva V.¹

¹ *Institute of Biodiversity and Ecosystem Research, Bulgarian Academy of Sciences, 2 Y. Gagarin Street, 1113 Sofia; E-mail: sasho_ecolab@yahoo.com*

Soil nematode assemblages of different habitats (Mountain (*Pinus mugo* L.) and Macedonian Pine (*Pinus peuce* Griseb.) and spruce (*Picea abies* L.) forests, subalpine meadows and ski runs – bare and with grasses) are to be studied in the frame of a PhD project in order to assess changes caused by ski runs in various community parameters based on newly collected material (2009) and a previous study (2005). The results on structural and functional diversity of nematode assemblages of Macedonian Pine forest fragments (8 sites) and ski runs (4 bare ski runs and 5 runs with grasses) are presented and discussed. Several ecological parameters were analysed: relative abundance, diversity and maturity indices, trophic and life strategies functional group. Nematode assemblages of bare runs formed a separate group, characterised by a very low abundance and generic richness and composed of genera belonging mainly to c-p2 and c-p4 groups, diverse trophic structure (with a very low percentage of plant feeders); ski runs with grasses supported the most abundant and diverse nematode assemblages, dominated by bacterial feeders and omnivorous nematodes, again c-p2 and c-p4 prevailing; Macedonian Pine fragments had relatively balanced trophic structure of nematode communities, with plant feeders having a very small proportion and generic richness compared with grass communities; sites studied in 2009 had substantially lower number of genera and abundance. Two of bare ski runs sampled in 2005 were sampled again in 2009, however, currently they represent ski runs with grasses, thus the strongly degenerated soil nematode assemblages have been partly recovered.

MOLECULAR ANALYSIS OF *HELICOTYLENCHUS* CF. *DIGONICUS* FROM SOUTH OF IRAN BASED ON SEQUENCE OF THE 28S RIBOSOMAL DNA

Nadi M.¹, Shokoohi E.¹, Troccoli A.²

¹ *Plant Protection Department, College of Agriculture, ShahidBahonar University of Kerman, Kerman, Iran; E-mail: eshokoohi@mail.uk.ac.ir*

² *CNR, Istituto per la Protezione delle Piante, Via G. Amendola 122/D, Bari 70126, Italy;*

Helicotylenchus is a cosmopolitan genus including some important plant parasitic nematodes causing damage in agricultural and horticultural crops. During a soil sampling of almond (*Prunus*) orchards in Baft region of Kerman province (South East of Iran), a species of *Helicotylenchus* was extracted from rizosphere of almonds and identified according to morphological and morphometric characters as *H. digonicus*. In addition, the D2D3 segment of 28S rDNA was amplified using specific primers and sequenced. The Nblast result showed that studied population has 8 nucleotides differences with Italian population of *H. digonicus* (DQ328758; 99% identity). Phylogenetic analysis using Maximum Likelihood places this population close to an undescribed population of *Helicotylenchus* (HM014303) and *H. digonicus*. Genetic pairwise distances showed low variation (0.002) with a population of *H. digonicus* (HM014241) from South Africa.

OCCURRENCE AND MORPHOLOGICAL OF NEMATODE- ANTAGONISTIC FUNGI ASSOCIATED WITH PREVALENT NEMATODES IN ABD-ELSAMAD REGION SOILS(GIZA EGYPT).

Noweer E.M.A.¹

¹ *Plant Pathology Department, Nematology Laboratory, National Research Centre, Dokki, Cairo, Egypt;*

Occurrence of nematode-antagonistic fungi in Abd-elsamad, Giza, sandy soils which are well-known by its heavy organic manure application were studying by collecting soil samples from fruit orchards, field crop and vegetables during two consecutive years. Five saprophytic fungal species which produce nematode-toxic metabolites in its filtrates namely *Aspergillus niger*, *A. terreus*, *A. ochraceus*, *Trichoderma harzianum* and *T. viride*. Seven species of nematode-trapping fungi *Arthrobotrys conoides*, *A. dactyloides*, *A. oligospora*, *Dactylaria brochopaga*, *D. thaumasia var. longa*, *Dactylella gephyropaga* and *Stylopaga hadra* were isolated from the nematode-positive samples. Four nematode-endoparasitic fungi *Catenaria sp.*, *Cephalosporium balanoides*, *Haptoglossa heterospora* and *Harposporium anguillula* were isolated from nematode bodies. *Verticillium chlamyosporium* was isolated from egg-masses of *Meloidogyne incognita*. All of these fungi were identified, described and photographed.

HETERODERA AVENAE FROM SERBIA AND ITS PHYLOGENETIC CONNECTIONS WITH SIMILAR POPULATIONS

Oro V.¹

¹ *Institute for Plant Protection and Environment, Teodora Dražera 9, 11000 Belgrade, Serbia; E-mail: viooro@yahoo.com*

Growing cereals on Balkans in region around Danube and Pannonian Basin dating back to the Neolithic age (Medović, 2011). So far, cereals were and still are staple food for people from this region. Cyst nematodes associated with cereals were found occasionally in Serbia and only *Heterodera avenae* Wollenweber, 1924 was recorded (Meagher, 1977). *Heterodera filipjevi* (Madžidov, 1981) Mulvey and Golden, 1983 was recently reported (Oro *et al.*, 2012).

Heterodera avenae is one of three main species of the Cereal Cyst Nematode (CCN) complex. Yield losses on wheat are reported to be 15-20% in Pakistan, 40-92% in Saudi Arabia, 23-50% in Australia, 24% in the Pacific North West of the USA and 26-96% in Tunisia (Nicol *et al.*, 2011). Oats (*Avena sativa*) are the type hosts of *H. avenae* although, the nematode has been found on other grasses from the following genera: *Agropyron*, *Agrostis*, *Alopecurus*, *Anisantha*, *Arrhenatherum*, *Avena*, *Brachypodium*, *Bromus*, *Dactylis*, *Echinochloa*, *Festuca*, *Hordeum*, *Koeleria*, *Lolium*, *Phalaris*, *Phleum*, *Poa*, *Polypogon*, *Secale*, *Setaria*, *Sorghum*, *Trisetum*, *Triticum*, *Vulpia*, *Zerna* and *Zea* (Subbotin *et al.*, 2010).

Vavilov (1962) described seven geological centers of plant origin: South-West Asian, East Asian, South Asian, Mediterranean, Abyssinian, Central American and Andean center (South American). According to him cultivated oats have the polyphyletic origin. He designates Mediterranean area and northern Africa a center of origin of *Avena byzantine-A. sterilis*, Abyssinia (Ethiopia) a center of origin of *A. abyssinica*, the north-western and western Europe centers of origin of *A. strigosa*, *A. brevis* and *A. nudibrevis* and he designates China center of origin of *A. nuda*. However, he could not designate center(s) of origin of *A. sativa* and *A. orientalis*, though he found original forms of *A. sativa* in Transcaucasia (*A. fatua* as well) and China. Žukovskij (1971) described 12 geographic centers of origin of cultivated plants: Chinese-Japanese, Indonesian-Indo-Chinese, Australian, Hindustan, Central Asian, South West Asian, Mediterranean, African, Euro-

Siberian, Central American, South American and North American geocenter. He mentioned Mediterranean geocenter as a center of origin of *A. strigosa*, *A. brevis*, *A. byzantine* and *A. sterilis*.

The emergence of molecular tools has enabled the study of the genetic structure of organisms using nucleotide or protein sequences. It helped to elucidate evolutionary relationships among organisms which have no fossil remains such as cyst nematodes. *Heterodera avenae* has been molecularly characterized for the first time in Serbia (GenBank accession no.: KC847094). This paper describes phylogenetic connections between a population of *H. avenae* from Serbia and other similar foreign populations.

MATERIAL AND METHODS

Phylogenetic analyses were based on the ITS1-5.8S-ITS2 region of *H. avenae* populations comparing sequences of Serbian *H. avenae* population from Bezdan locality (north-eastern Serbia, Vojvodina province) with similar CCN populations obtained from NCBI GenBank database. Sequences chosen for comparison were following: AY 148353 Germany, AF 274395 France 1, AY 148370 France 2, AY 148373 France 3, AY 148355 Spain, AY 148367 Morocco, AF 274397 India, AY 148358 United Kingdom, AY 148362 India 2, AY 148361 Saudi Arabia, AY 148364 Turkey, AF 498378 Iran, AY 148365 Israel, AY 148381 China 1, AY 148382 China 2.

The sequences were aligned with ClustalW. The genetic distances among 16 CCN populations were calculated using pairwise distances of Mega 4 (Tamura *et al.*, 2007). Phylogenetic trees were created using Maximum Parsimony (Eck and Dayhoff, 1966) and Maximum Likelihood methods employing Mega 4 and Phyml 2.4.4. (Guindon and Gascuel, 2003) respectively. The Maximum Parsimony (MP) consensus tree was obtained using 500 replicates and Hasegawa, Kishino and Yano (Hasegawa *et al.*, 1985) model of nucleotide substitution. Evaluation of dendrogram reliability was calculated by the bootstrap test. For Maximum Likelihood (ML) analyses, the used model of nucleotide substitution was GTR+ Γ model. Dendrogram reliability was calculated by the bootstrap test of 100 replicates. The dendrograms were drawn to scale in the units of the number of nucleotide changes.

RESULTS AND DISCUSSION

The pairwise distances among investigated populations in percentages are given in Table 1. Analyses of divergence among CCN populations showed that Serbian population and populations from Germany, France and UK share identical pattern. The percentage of difference among other populations of *H. avenae* ranged from: 0.21% between our population and those from Spain, Morocco, India, Turkey, Iran and Israel; 0.52% between our population and Saudi Arabian and French 2 populations, 0.62% between our population and French 3 and Indian 2 populations to 0.93-1.04% between our population and the populations from China.

Generally, both MP and ML dendrograms (Fig. 1 and Fig. 2, respectively) are in agreement. The dendrograms generated two clades. One side (clade) is occupied by Chinese populations while all other populations are on the other side. Within the latter, there are populations from the western Europe (UK, Germany, France 1) and a population from Serbia as the only representative from Balkans. In the same subclade are populations from Mediterranean area: Spain and Morocco. Two French populations (France 2 and 3) formed separate subclade.

Within the same clade are Asian populations from Turkey, Iran, Israel and India with the same nucleotide pattern. Among Asian populations there are the population from Saudi Arabia and the second population from India divergent from others. Actually, it seems that two geocentric cores are formed. The one comprising Euro-Mediterranean countries together with Balkans and Transcaucasian region as the other. The percentage of divergence of *H. avenae* populations gradually increase starting from Balkan. Surprisingly, the increase is the same going to the south-west toward Mediterranean countries and to the south-east toward Transcaucasia (0.21%). Going further to the east toward India, divergence still increase (0.62%) while it reaches

its maximum of 1% in China. European and Mediterranean areas are previously mentioned as centers of different oat species such as *A. strigosa*, *A. brevis*, *A. byzantine* and *A. sterilis*.

Table 1 Pairwise distances (in %) of *H. avenae* populations

POPULATIONS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. AY148353 Germany															
2. AF274395 France1	0.00														
3. AY148370 France2	0.52	0.52													
4. AY148355 Spain	0.21	0.21	0.73												
5. AY148367 Morocco	0.21	0.21	0.52	0.42											
6. AF274397 India	0.21	0.21	0.31	0.42	0.21										
7. AY148358 UK	0.00	0.00	0.52	0.21	0.21	0.21									
8. AY148362 India2	0.62	0.62	0.73	0.83	0.62	0.42	0.62								
9. AY148361 Saudi Arabia	0.52	0.52	0.62	0.73	0.52	0.31	0.52	0.73							
10. AY148364 Turkey	0.21	0.21	0.31	0.42	0.21	0.00	0.21	0.42	0.31						
11. AF498378 Iran	0.21	0.21	0.31	0.42	0.21	0.00	0.21	0.42	0.31	0.00					
12. AY148365 Israel	0.21	0.21	0.31	0.42	0.21	0.00	0.21	0.42	0.31	0.00	0.00				
13. AY148373 France3	0.62	0.62	0.52	0.83	0.62	0.42	0.62	0.83	0.73	0.42	0.42	0.42			
14. AY148381 China1	1.04	1.04	1.14	1.25	1.04	0.83	1.04	1.25	1.14	0.83	0.83	0.83	1.25		
15. AY148382 China2	0.93	0.93	1.04	1.14	0.93	0.73	0.93	1.14	1.04	0.73	0.73	0.73	1.14	0.31	
16. Serbia	0.00	0.00	0.52	0.21	0.21	0.21	0.00	0.62	0.52	0.21	0.21	0.21	0.62	1.04	0.93

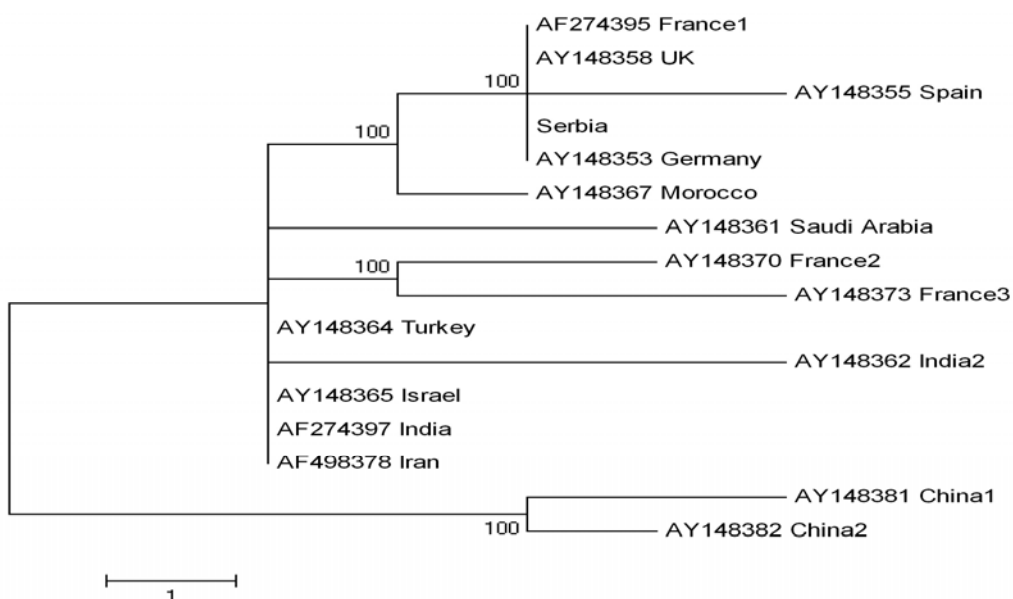


Fig. 1MP dendrogram of *H. avenae* populations

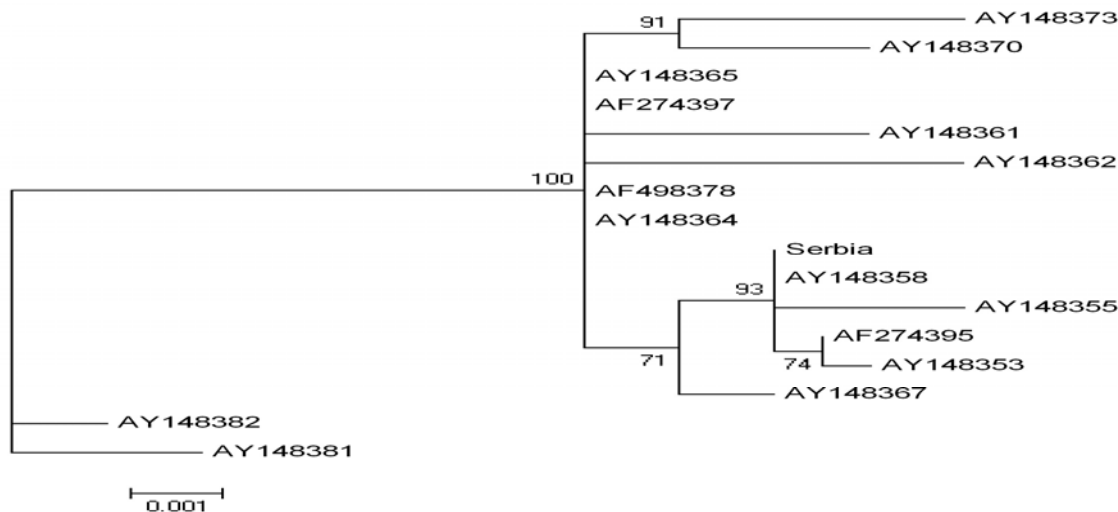


Fig. 2 ML dendrogram of *H. avenae* populations

Transcaucasia as a possible center of origin of *A. sativa* could be one center of origin of cultivated oats. Euro-Mediterranean area could be another potential place of oat domestication. The results presented here, illustrating biogeography of host-parasite interaction, support it.

ACKNOWLEDGMENT

This study was supported by the Serbian Ministry of Education, Science and Technological Development Grants TR 31018 and III 46007.

REFERENCES

- Eck, R.V. & Dayhoff, M.O. 1966. Atlas of Protein Sequence and Structure. *National Biomedical Research Foundation*, Silver Springs, Maryland.
- Guindon, S. & Gascuel, O. 2003. PhyML: A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52:696-704.
- Meagher, J.W. 1977. World dissemination of cereal-cyst nematode (*Heterodera avenae*) and its potential as a pathogen of wheat. *Journal of Nematology*, 9: 9-15.
- Medović, A. 2011. Najbolje iz preistorijske Vojvodine: starčevačka jednozrna pšenica, „kasna“, i južnobanatski proso, „rani“. Fosilni biljni ostaci sa lokaliteta Starčevo – Grad. *Rad Muzeja Vojvodine*, 53, 143-149. (in Serbian)
- Nicol, J. M., Turner, S. J., Coyne, D. L., den Nijs, L., Hockland, S. & Tahna Maafi, Z. 2011. Current Nematode Threats to World Agriculture. In: *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions* (J. Jones, G. Gheysen and C. Fenoll, eds.), Springer, New York, 21-45pp.
- Oro, V., Živković, S., Ivanović, Ž. & Waeyenberge, L. 2012. First Report of the Cereal Cyst Nematode *Heterodera filipjevi* on Wheat in Serbia. *Plant Disease*, 96:1583.
- Subbotin, S.A., Mundo-Ocampo, M. & Baldwin, J.G. 2010. *Heterodera avenae*. In: *Systematics of cyst nematodes 2*, (D.J. Hunt & R.N. Perry eds.), Brill, Leiden-Boston, 76-85pp.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24:1596-1599.
- Vavilov, N.I. 1962. Centri proishozhdenija kuljturnih rastenij. In: *N.I. Vavilov- Izbranie proizvedenija* (F.H. Bahteeva, ed.), Izdateljstvo "Nauka", Leningrad. (in Russian), 88-192 pp.
- Žukovskij, P.M. 1971. Centri proishozhdenija i centri raznoobrazija kuljturnih vidov. In: *Kuljturnije rastenija i ih sorodiči*, Izdateljstvo "Kolos", Leningrad. (in Russian), 6-58 pp.

METAGENOMIC APPROACH FOR THE ANALYSIS OF NEMATODE DIVERSITY AND THEIR USE AS BIOLOGICAL INDICATORS

Pousis C., Troccoli A., Park B.Y.², Fanelli E.¹, D'Addabbo T.¹, Veronico P.¹, Radicci V.¹,
De Luca F.¹

¹ IPP-CNR, Via Amendola 122/D, 70126 Bari, Italy; E-mail: f.deluca@ba.ipp.cnr.it

² Division of Crop Protection, National Academy of Agricultural Science, Suwon, Republic of Korea;
E-mail: daggernema@korea.kr

INTRODUCTION

Soil nematodes are organisms that quickly respond to changes (stress and pollutants) in the environment and can be useful ecological indicators of environmental disruption. Since they occur in any environment containing organic carbon, they do not quickly escape from stressful conditions, occupy key positions in soil food webs and can be classified in easily identifiable trophic groups (Bongers and Ferris, 1999). While there are many indices of biological diversity, specific tools have been developed for nematodes, such as the Maturity Index (MI) and the Enrichment Index (EI). These indices are based on an ecological classification where to each taxonomic family is assigned an ecological value that ranges from 1 (typical families of polluted soils or sediments) to 5 (typical families of soils or sediments). The lower values (1 and 2) belong to *colonizer* nematodes (c), i.e. opportunists, characterized by a rapid biological cycle and able to quickly invade unstable or polluted habitats. High values (3 to 5) belong to *persister* nematodes (p), characterized by a slow reproduction rate. Persisters are more sensitive to pollutants and other disturbances than colonizers, therefore MI also serve to measure the impact of mixtures of pollutants and the effect of their complex interactions with biotic and abiotic environment.

The aim of this study was to identify the nematofauna, recovered from three different habitats, at morphological and molecular level to provide useful information on the soil features and any possible disturbances by calculating ecological indexes of soil biodiversity.

MATERIALS AND METHODS

Soil samples were collected in the following locales of Apulia region (South Italy): Cerano (BR), in an uncultivated soil near a coal-fired power; Conversano (BA), a soil in the vicinity of a landfill and Torre Guaceto (BR), in a sandy coastal dune soil, within a natural reserve. Three composite soil samples were taken for each site, spacing the samplings 20 feet apart from each other. For each sample 100 g of soil were collected in duplicate (one for taxonomic and one for molecular analysis). Nematodes were extracted from 100 g of soil by a modified Cobb's sieving method and suspension recovered after 24 h. In order to clarify the water suspension containing the nematodes, a further filtration through a thin film of paper lying on a coarse-mesh plastic support at the top of a Baermann funnel was performed. Nematodes were then collected after additional 24 h.

Genomic DNA was obtained from pool of nematodes using the PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen) as described by the manufacturer. The concentrations were measured by spectrophotometer at 260, 280 and 230 nm using NanoDrop® ND-2000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific Inc., MI., Italy).

The 1,5 kb fragment of 18S rRNA gene was amplified from total DNA using a specific primer pair. PCR reactions were performed on a PCR Sprint Thermal Cycler using ~40 ng of DNA, 10 pmoles of each oligonucleotide primer, 0.2 mM of dNTP mix, 5X Taq polymerase buffer and 1.5 unit of Taq Polymerase (Promega) in a 50 µl volume. PCRs consisted in a first denaturing cycle at 94 °C for 5 min, followed by a variable number of cycles of amplification defined by denaturation at 94 °C for 45 sec, annealing at 55 °C for 45 sec, and extension at 72 °C for 1.5 min. A final extension cycle of 72 °C for 7 min was included. At the end of this cycle the samples were

immediately cooled to 4 °C. PCR-generated DNA fragments were resolved in 1× Tris-borate buffered 1.2% agarose gels and visualized by ethidium bromide staining. Amplification products were excised from agarose gel, purified using Nucleo Spin extract II (Macherey-Nagel) and ligated into the pGEM[®]-T Easy Vector (Promega). Positive colonies were selected and plasmids were purified using the QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen GmbH). Approximately 10 µg of purified plasmid was sent to the MWG Operon (Germany) for sequencing. Sequences generated were compared by BLAST (Altschul et al., 1997) against NCBI database of all SSU sequences.

RESULTS AND DISCUSSION

The nematofauna present in soil samples from the three selected sites of Cerano, Conversano and Torre Guaceto was analyzed and nematodes characterized at morphological and molecular level. Data obtained by morphological analysis showed a higher presence of opportunist nematodes in Conversano and Cerano's sites compared to Torre Guaceto. According to the classification in **c-p** (colonizer/persister), the maturity (MI) and the enrichment indices (EI) were calculated for all three samples (Fig. 1). The results obtained revealed that Conversano and

Cerano's sites are more disturbed than the natural reserve of Torre Guaceto.

Molecular analyses revealed that the 18S rDNA marker is specific of the *phylum* Nematoda. Sequences were analyzed by using appropriate bioinformatic programs (BLAST, CLUSTAL W, etc) in order to identify and characterize each sequence at genus and/or family level.

Application of the same ecological indices used for morphological data to nematode families identified through molecular analysis also confirmed that the sites of Cerano and Conversano are more disturbed than the preserved site of Torre Guaceto (Fig. 2). In conclusion, this preliminary results proved that nematodes are a good indicators of soil health, showing for each of the three sampled sites a different level of disturbance.

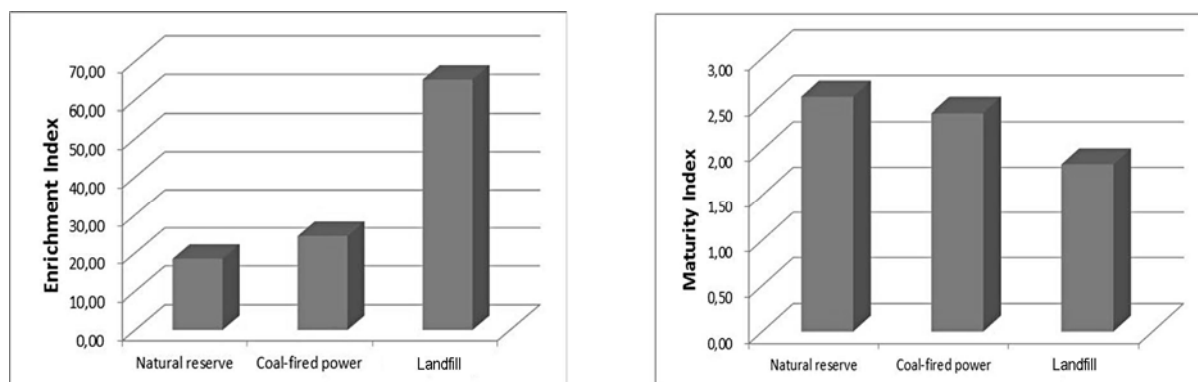


Fig 1. The maturity index and the enrichment index for each samples analyzed morphologically were calculated according to the classification c-p (persistent/colonizer).

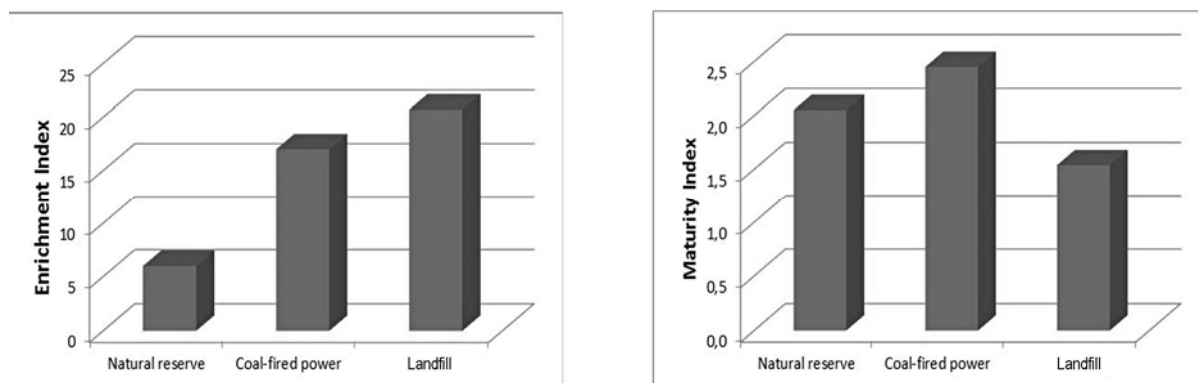


Fig 2. The maturity index and the enrichment index for each samples analyzed by molecular method were calculated according to the classification c-p (persistent/colonizer).

ACKNOWLEDGMENTS

Funds partially provided by Fondazione Cassa di Risparmio di Puglia and by the Italian Ministry of Economy and Finance to the CNR for the project 'Innovazione e Sviluppo del Mezzogiorno - Conoscenze Integrate per Sostenibilità ed Innovazione del Made in Italy Agroalimentare' - Legge n. 191/2009.

REFERENCES

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. 1997. *Nucleic Acids Res.*, 25(17):3389-402.
- Bongers, T. and Ferris, H. 1999. Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring. *Trends in Ecol. and Evol.*, 14:224-228.

ISTC PROJECT ON THE BIODIVERSITY OF PLANT PARASITIC NEMATODES IN RUSSIA AS A BASIS FOR MULTIFOCAL INTERNATIONAL RESEARCH OF PLANT PARASITIC NEMATODES IN EURASIA

Pridannikov M.V.^{1,2}, Petelina G.G.¹

¹ *Russian Research Institute of Phytopathology, Institute Str. 5, RRIP (VNIIF), Bolshie Vyazemy, Moscow region, 143050, Russia;*

² *Center of Parasitology, A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, RAS, Leninsky pr., 33, Moscow, 199071, Russia; E-mail: mikhail.pridannikov@yahoo.com*

Study of plant parasitic nematodes in the Russian Research Institute of Phytopathology started in 1955 and continued till 1969. Distribution, biology and pathogenicity of most important nematodes on vegetables, cereals, potato and onion and garlic were the basic tasks of nematological work. Various methods of chemical, agrotechnical and biological management of nematodes were developed during this time.

New period of nematological research in RRIP was started by the joint project titled "Discovery of active molecules from natural products for the control of plant parasitic nematodes" together with USDA ARS Nematology Laboratory and financial support by International Science and Technology Center (ISTC) in 2001.

There are the most achievements of "Tripartite Alliance" between RRIP, NL USDA ARS and ISTC during 12 years:

* Twenty regions of Russia (European, Northern-west parts, Caucasia, Ural and Volga region) were investigated on nematode fauna. Among them: potato cyst nematodes (*Globodera* sp.), cereal cyst nematodes (*Heterodera avenae*, *H. filipjevi*, *H. latipons*), soybean nematode (*H. glycines*), sugar beet nematode (*H. schachtii*), alfalfa nematode (*H. medicaginis*), root-knot nematodes (*Meloidogyne* sp.), nematodes virus-vectors (*Xhiphinema* sp.) etc.

* Twenty regions of Russia (European, Northern-west parts, Caucasia, Ural and Volga region) were investigated on nematode fauna. Among them: potato cyst nematodes (*Globodera* sp.), cereal cyst nematodes (*Heterodera avenae*, *H. filipjevi*, *H. latipons*), soybean nematode (*H. glycines*), sugar beet nematode (*H. schachtii*), alfalfa nematode (*H. medicaginis*), root-knot nematodes (*Meloidogyne* sp.), nematodes virus-vectors (*Xhiphinema* sp.) etc.

* The Collection of plant parasitic nematodes of RRIP was created. More than 600 nematode slides are keeping in the collection and information about those slides collected in database. Fourteen species of cyst nematodes, three species of root-knot nematodes are cultivating in a greenhouse.

* Laboratory of diagnostic of plant pathogenic organisms was created. Young scientists from the laboratory have regularly increased their knowledge and skills by training in Russian research institutes and at foreign laboratories of the USA, Italy, Germany, Austria and other.

* Laboratory renders assistance for various agriculture producers for identification of nematodes by morphological and molecular methods.

EVALUATION OF SOME PLANT EXTRACTS ON MORTALITY OF LARVAE (J2) OF CITRUS NEMATODE

Rashidifard M.¹, Shokoohi, E.², Hoseinipour A.², Jamali S.³

¹ Young Researcher Society, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran;

² Plant Protection Department, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran; E-mail: eshokoohi@mail.uk.ac.ir

³ Plant Protection Departments, College of Agricultural science, University of Guilan, Rasht, Iran;

Citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans* Cobb 1913, the causal agent of slow decline, is one of the most important nematode in citrus orchards of the world, and almost in all areas under cultivation of these crops caused economic losses. Most effective method for managing the nematode is using of the chemical nematicides but due to environmental effects, applying non-chemical compounds is growing up worldwide. In this research, nematicidal properties of four plant extract including pepper (*Capsicum* sp.), ginger (*Officinale* sp.), tobacco (*Nicotiana* sp.) and fennel (*Foeniculum* sp.) were evaluated. The experiments carried out in split plot based on completely randomize design, with three replications. The concentration 5% was used for all treatments, and the petridishes contained 50 individuals. The data were recorded at 24, 48 and 72 hrs after application of the plant extracts. Finally, the results were analyzed using SAS software and Duncan multiple range tests were used for mean comparison. The results indicated that all plant extracts decreased population levels of J2 of *T. semipenetrans*. The most mortality was observed in tobacco leaf extract (94%, $p < 0.05$). The lowest mortality was belong to the pepper leaf extract (83%, $p < 0.05$).

IN VITRO AND IN VIVO EFFECT OF CHESTNUT TANNIN SOLUTIONS ON THE POTATO CYST NEMATODE *GLOBODERA PALLIDA* PATHOTYPE PA2

Renčo M.¹, Sasanelli N.²

¹ Institute of Parasitology, Slovak Academy of Sciences, Hlinkova 3, 040 01 Košice, Slovak Republic;
E-mail: renco@saske.sk

² Institute for Plant Protection, C.N.R., Via G. Amendola 122/D, 70126 Bari, Italy;
E-mail: n.sasanelli@ba.ipp.cnr.it

INTRODUCTION

The potato cyst nematode *Globodera pallida* (Stone) Behrens causes severe yield losses of potato in many potato growing areas of the world having five geographically different patotypes. Successful control of this nematode has been achieved in the past using chemical nematicides (Whitehead *et al.*, 1994) which are serious threat for nature as well as for human and animal health. Therefore, according to the recent revision of the European legislation on the use of pesticide in agriculture, the research of alternatives to chemicals has received a strong impulse. Plants can represent a source of natural nematicides and a higher number of nematicidal compounds were already reported in many plant species (Chitwood, 2002). Also tannins, secondary plant polyphenols that protect many plants against herbivores, are toxic to a wide range of fungi, bacteria and yeasts as well as gastrointestinal nematodes in ruminants. Few studies on their effect on potato cyst nematodes has been carried out. Therefore, an *in vitro* and an *in vivo* pot experiments were undertaken to investigate the potential nematicidal effect of tannin aqueous solutions at different concentrations on the potato cyst nematode *G. pallida*.

MATERIALS AND METHODS

The population of *G. pallida* pathotype Pa2 was collected from an infested soil at Avezzano (province of L'Aquila, Abruzzo region) and tannin were provided by Agrostar s.r.l. (Cavriago,

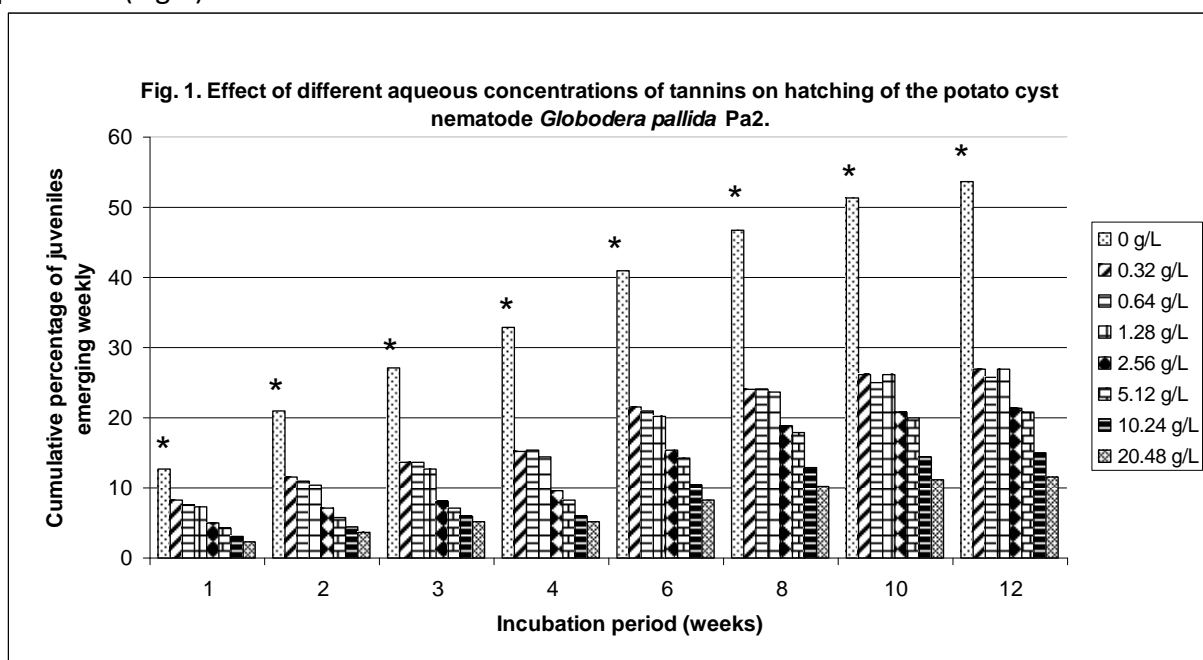
province of Reggio Emilia, Italy), extracted by vapour from chestnut wood, without chemical solvents, in powder form after dehydration.

For *in vitro* hatching test, different concentrations from 0.32 to 20.48 g/l, in a geometric series, were obtained by dissolving the largest rate of tannin in distilled water. Each tested aqueous tannin solution was prepared considering a double concentration, because of each of them was adjusted with an equal amount of potato root leachate used as natural hatching agent. Four ml of each test solution, sufficient to cover cysts, were then added to four batches of 30 cysts of *G. pallida* (Pa2). Potato root leachate was used as control. Juveniles emerging from cysts were removed and counted every week over a 12 week period. The solutions were renewed weekly but after four weeks the test solutions were removed and for the remaining eight more weeks the incubation continued only in potato root leachate. At the end of the experiment cysts were crushed and unhatched eggs and juveniles were counted. Numbers of second stage juveniles emerging weekly were expressed as cumulative percentages of the total egg content of the cysts (hatched + unhatched eggs). Data were subjected to analysis of variance (ANOVA), after arcsin square root transformation, and means were compared by Student's *t* test.

For *in vivo* experiment the same population of *G. pallida* was used at initial population density 5 eggs and juveniles/g of soil. Three tannin concentrations were considered 1) 100 g/m²; 2) 250 g/m² and 3) 450 g/m², applied as aqueous solution only at sowing or at sowing and two weeks later, for a total of six tannin treatments. Untreated nematode infested soil was used as control. In each pot one potato tuber (cv. Désirée) was sown. Three months later, at the end of the experiment, cysts of *G. pallida* (Pa2) were extracted, crushed and their egg content estimated. Data from the experiment were subjected to analysis of variance (ANOVA) and means compared by Least Significant Difference's Test (LSD's Test). In both trials statistical analysis were performed using the PlotIT program.

RESULTS AND DISCUSSION

In *in vitro* experiment chestnut tannin solutions significantly reduced *G. pallida* egg hatch during the first four weeks in comparison to untreated control (0 g/L). Also, when tannin aqueous solutions were removed and the incubation continued in potato root leachate, the emergence of juveniles remained significantly lower compared to the untreated control until the end of the experiment (Fig.1).



* Untreated control (0 g/L) significantly higher than all other tannin treatments (Student's *t* test; P=0,01).

Similarly, in the *in vivo* experiment in pot, the number of *G. pallida* cysts/100 g dried soil, number of eggs and second stage juveniles/g soil and the reproduction rate ($r=Pf/Pi$) were significantly reduced by all tannin treatments in comparison to the untreated control (Table 1).

Table 1 Development of *G. pallida* (Pa2) in soil treated with tannin at different doses and application times.

Treatment	Dose g/m ²	Application time	N° cyst/100g soil		Eggs and J ₂ /cyst		Eggs and J ₂ /g soil		$r = Pf/Pi$	
Untreated control	0		99.5 ⁽¹⁾	a ⁽²⁾	159.0	a	155.5	a	31.1	aBCDF
Tannin	100	At sowing	27.3	Ab	153.5	a	41.8	Ab	8.4	AbCDF
Tannin	100	At sowing + 2 weeks later	23.9	Ab	148.0	a	35.9	Ab	7.2	AbDF
Tannin	250	At sowing	23.5	Ab	149.5	a	33.4	Ab	6.8	AbDF
Tannin	250	At sowing + 2 weeks later	17.1	Abc	122.3	Ab	21.5	Ab	4.3	ABCcF
Tannin	450	At sowing	14.6	Abc	109.5	Ab	15.9	bc	3.2	ABCc
Tannin	450	At sowing + 2 weeks later	7.5	ABc	100.8	Ab	6.1	c	1.2	ABCd

⁽¹⁾ Each value is an average of 4 replications;

⁽²⁾ Data flanked in each column by the same letter are not statistically different according to Least Significant Difference's Test (P=0.01).

Similar results, using the same chestnut tannin at the same concentrations and doses were found for the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* (Maistrello *et al.*, 2010) and for the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* (Renčo *et al.*, 2012) both *in vitro* and in pot trials. Therefore, the use of chestnut tannins could be an appropriate alternative control method against plant parasitic nematodes in sustainable agriculture. However, further studies are suggested to investigate the effect of tannins derived from different plants (quebracho, mimosa, etc.), in different types of soils, on different nematode species and on beneficial soil free living nematodes.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by the VEGA scientific grant agency, grant No. 2/0079/13

REFERENCES

- Chitwood, D.J. 2002. Phytochemical based strategies for nematode control. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 40: 221-249.
- Maistrello, L., Vaccari, G., Sasanelli, N. 2010. Effect of chestnut tannins on the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Helminthologia*, 47: 48-57.
- Renčo, M., Sasanelli, N., Papajová, I., Maistrello, L. 2012. Nematicidal effect of chestnut tannin solutions on the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* (Woll.) Barhens. *Helminthologia*, 2, 108-114
- Whitehead, A.G., Nichols, A.J.F., Senior, J.C. 1994. The control of potato pale cyst-nematode (*Globodera pallida*) by chemical and cultural methods in different soils. *Journal of Agricultural Science*, 123: 207-212

ON THE INCIDENCE OF MIXED VIRAL INFECTIONS AND THEIR EFFECTS ON THE YIELD OF POTATO TUBERS

Romanenko N.D.¹, Perevertin K.A.¹, Popov I.O.¹, Popova E.N.², Petrunya I.V.¹

¹ Center for Parasitology, A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, RAS, Lenininsky prospekt, 33, Moscow, 119071, Russia;

² Institute of geography RAS, Staromonetnij per., 29, Moscow, 119017, Russia;

The potato golden cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, was revealed in tomato and potato plantations of Novoannensky, LLC in the Volgograd region of Russia. Potato virus Y (PVY) and Potato virus X (PVX) were also found on the territory for the first time. PCR analysis revealed potex- and potivirus infection on tomato plants. In addition, the negative effect of a single infection with X, M, and S viruses and mixed infections (X + S, X + S + M, X + S + M + L viruses) was also demonstrated in field-plot tests with potatoes. It was shown that mixed viral infections reduce the yield of potatoes in 2-3 times. As a result of our investigations, we found that Baermann funnel method is not valid for virus-vector nematodes extraction and decanting and sieving technique should be used in this case.

A STUDY OF BIOLOGICAL AND ECONOMIC EFFICIENCY OF FUNGAL AND BACTERIAL ANTAGONISTS AND THEIR POSSIBLE USE IN PLANT PROTECTION

Romanenko N.D.¹, Perevertin K.A.¹, Metlitskaya K.V.², Zayets V.G.³, Tabolin S.B.¹, Popova E.N., Popov I.O., Petrunya I.V.

¹ Center of Parasitology, IPEE RAS, Leninskii pr., 33, Russia, 119071, Moscow;
E-mail: cenologypathlab@mail.ru

As a result of field, laboratory, and greenhouse experiments, 12 strains of fungi and bacteria showed high antagonistic activities towards pathogenic nematodes, fungi and viruses. Their biological efficiency varied from 80 to 100% and economic efficiency was 1.3 to 6.0 times greater than untreated controls (data for strawberry and black currant plants). Isolated strains of bacterial and fungal antagonists that possess multifunctional activity include nine strains of bacteria were as follows: four strains of *B. thuringiensis*, two strains of *B. polymyxa*, two strains of *Pseudomonas fluorescens*, one strain of *P. aureofaciens*, two strains of the fungus *Trichoderma viride*, and one strain of the predatory fungus *Arthrobotrys oligospora*. They caused significant reduction in the number of plant-parasitic nematodes and inhibition of fungal, viral and oomycete infections.

ON THE DEVELOPMENT OF ENVIRONMENTALLY FRIENDLY PROTECTIVE MEASURES AGAINST PESTS ON STRAWBERRY

Romanenko N.D.¹, Tabolin S.B.¹, Titova A.S.¹

¹ Center of Parasitology, A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Leninsky pr. 33, Moscow, 119071, Russia; E-mail: cenologypathlab@mail.ru

As a result of our studies conducted in the end of 20th and the beginning of the 21st centuries, we proposed environmentally-friendly technology for plant protection in strawberries. The technology includes 1) 48.2 and 48.4 °C hot water treatments of plants for 15 minutes, 2) treatments of roots with bacterial and fungal bioagents to prevent primary infections during planting. For summer treatments, we recommend to use fungal and bacterial bioagents capable of rapid colonization of plant rhizospheres and suppressing nematode, fungal, and oomycete infections. To control mites we suggest to use Acarine in combination with oligofurostanoside for strawberry plants under field and greenhouse conditions.

THE HISTORY OF RUSSIAN NEMATOLOGY: ZOOLOGICAL INSTITUTE ST.PETERSBURG

Ryss A.¹

¹ *Zoological Institute RAS, Universitetskaya nab., 1, St. Petersburg, 199034, Russia;*

E-mail: nema@zin.ru

The history of Russian nematology may be analyzed on example of the Nematode Collection of Zoological Institute RAS (ZIN) with step changes in goals and collection units. 1) foundation (Ivan N. Filipjev, 1912-1933) of the Russian first lower worms collection of microscopic slides and moist fixations, reference collection of PPN and EPN, development the first general nematode classification, identification key books of pathogenic nematodes and faunistic compendia; 2) a development of the academic centres in all the national republics of former Soviet Union (initially ZIN branches) with nematode collections and research teams to study biodiversity, morphology, taxonomy, phylogeny; training of plant protection and biocontrol specialists (1930-1980-thies); 3) technological revolution (from 1990-thies): new types of collection units and research tools: global biodiversity monitoring based on e-technology, digital, molecular and living collections for fundamental research (phylogeny, co-evolution, host-parasite interactions, molecular markers for of pathogenicity, endemic epiphytoticies), applied projects (resistant varieties, biological preparations, the use of nematodes as living models and bioindicators in ecomonitoring). Recently is important the development of the global net of virtual digitized collections. Results of studies of ZIN collection and its branches were published as papers and in book series "Fauna of the USSR/Russia" and the "Keys to Fauna of the USSR/Russia". The role of the ZIN Collection in global collection centres network recently continues to grow with international cooperation in global biodiversity conservation, environment research, agricultural crops management.

NEMATODES OF ANTARCTICA

Ryss A.¹, Andreev M.², Kurbatova L.²

¹ *Zoological Institute RAS, Universitetskaya nab., 1, St. Petersburg, 199034, Russia;*

² *Botanical Institute RAS, St. Petersburg, 199034, Russia; E-mail: nema@zin.ru*

In 2007 – 2012, 180 samples of mosses and lichens were collected from 8 areas (15 stations) around Antarctica. Nematodes were detected in 85% of the moss- and 30% of lichen samples; thus higher moss hydrophily favoring the nematode water film habitats. In ZIN collection 58 species of Nematoda (families: Plectidae, Quitsinematidae, Monhysteridae, Aphelenchoididae, Aphelenchidae, Panagrolaimidae, Cephalobidae (with domination of Plectidae and Cephalobidae) and 3 Tardigrada species were identified. In marine grounds nematodes belonging to Axonolaimidae, Comesomatidae, Leptosomatidae, Oncholaimidae, Desmodoridae, Anticomidae, Enoplidae were found.

Fauna impoverishment is demonstrated along line from South Shetland Islands around the continent. Three succession stages of were recognized: i) polytrophic nematodes of the ord. Plectida on the most poor stone substrates with crustose lichens, ii) omnivores of the ord. Dorylaimida feeding on big organisms – algae, tissues of mosses and invertebrates in micro-environments with domination of foliose lichens, are added to plectids; iii) in organic substrates with fruticose lichens and mosses, nematodes of the ord. Rhabditida (including Tylenchina) and Monhysterida with specialized trophic types: myco-, bacterio- and plant parasitic feeding, are added to roundworms of previous succession stages. The nematodes of ord. Rhabditida и Monhysterida have to obtain the highest Maturity Indices for Antarctic communities. The 3D digitized web-atlas of Antarctic Nematode Collection was developed. Fed. Program "World Ocean", Project N 4 "Estimation of ecosystems in areas of the Russian Antarctic Expedition".

ON THE CONCEPTION OF ENDEMIC VECTOR-BORNE TRANSMISSION INFECTIONS APPLIED TO NEMATODE-CAUSED DISEASES OF PLANTS AND ANIMALS

Ryss A.¹

¹ *Zoological Institute RAS, Universitetskaya nab., 1, St. Petersburg, 199034, Russia;*
E-mail: nema@zin.ru

According to the E.N.Pavlovsky conception of endemic vector-borne transmission infections (TI), the main agent of this type of diseases is the pathogen which may successfully reproduced in phylogenetically unrelated hosts; another important TI conditions are the availability of pathogen vector, endemic infection area with natural reservoir host and incidental recipient host, which are humans or organisms of economic importance. The conception is well developed for parasitic arthropods, ticks and blood-sucking insects. This conception is proved here to be applied to nematode-caused diseases as well. In modern nematology the data on key role of parasitic nematode symbionts in pathogenicity of nematode-bacteria-fungi associations, are accumulated. The TI agent role may be taken by nematodes, as well as their symbionts: bacteria and fungi. Nematodes may serve as TI vectors of agents, insects which transferred nematodes also may be vectors. Natural reservoir host may be mammals, arthropods, nematodes themselves. The complex TI agent of the plant wilt diseases may include an association of pathogens killing plant host and after that destroying dead organic material. These are nematode-bacterial-fungi infections, which are probably originated from the destroying agent complex in detritus food chain. In frames of conception the diseases caused by nematodes of fam. Filariidae, Steinernematidae, Aphelenchoididae, are analysed.

LOW TEMPERATURE SCANNING ELECTRON MICROSCOPIC STUDIES ON THE INTERACTION OF *GLOBODERA ROSTOCHIENSIS* WOLL. AND *TRICHODERMA HARZIANUM* RIFAI

Saifullah A.¹

¹ *Department of Plant Pathology, the University of Agriculture, Peshawar-Pakistan;*
E-mail: abdulkafi.saifullah@gmail.com

Low temperature scanning electron microscopic (LTSEM) studies revealed that *Trichoderma harzianum* infected mature potato cysts nematode eggs by penetrating directly the cyst wall or via natural opening of mouth. Mycelial penetration on cyst wall or egg surface has been seen. The penetration of cyst wall or egg surface was either chemical or mechanical (directly or with appressorium) or both. Freeze fractionation showed the presence of mycelia inside the eggs.

REPRODUCTION OF ROOT-KNOT NEMATODES ON ELEVEN COMMON WEEDS IN POTATO FIELDS IN BULGARIA

Samaliev H.¹, Markova D.², Baicheva O.³

¹ *Agrarian University, 12 Mendeleev Str., 4000 Plovdiv, Bulgaria;*
² *Maritsa Vegetable Crops Research Institute, 4003 Plovdiv, Bulgaria;*
³ *Sofia, Bulgaria; E-mail: baicheva_o@abv.bg*

Weeds enable plant-parasitic nematodes to survive in the presence or absence of a crop, providing a source of nematode inoculum for the following season. Host suitability studies of 11 weed species commonly found in potato fields in Plovdiv and Pazardjik potato growing region in

Bulgaria to two local population of root-knot nematode species (*Meloidogyne hapla* and *M. arenaria*) were conducted under greenhouse conditions. Root-galling index, egg mass per root, eggs per g of root and J₂ in soil per pot were recorded at plant harvest. Reproduction factor (Rf = final population/initial population) was calculated to determine the host status for each plant species. The nematodes density in fallow pots was recorded also. *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album*, *Cynodon dactylon* and *Xanthium strumarium* were not hosts for *M. hapla* as the end of the experiment there were no significant differences between the population in the fallow pots and in these weeds and no egg masses and eggs were observed on these weeds. *Cirsium arvense*, *Echinochloa crus-galli*, *Lamium amplexicaule*. and *Portulaca oleracea*. with few egg mass produced per root plant, but maintaining significantly higher population densities in the soil than were recorded in the fallow pots and is considered a poor host. *Convolvulus arvensis*. *Polygonum convolvulus* and *Solanum nigrum* were hosts of the *M. hapla* with Rf of 1.81, 1.61 and 5.50, respectively. Fourteen weeks after inoculation of fallow pots, only 2.93% of the population of *M. hapla* was still alive. *Amaranthus retroflexus*, *Ch. album*, *P. oleracea* and *X. strumarium* were hosts of *M. arenaria* with multiplication rates of 1.5, 1.1, 1.1 and 2.4, respectively. *Convolvulus arvensis*, *C. dactylon*, *Ech. crus-galli* and *P. convolvulus* was non-hosts as no egg masses and eggs of the target nematode were observed on these weeds. *Cirsium arvense*, *L. amplexicaule* and *S. nigrum* is considered a poor host with Rf < 1, but *C. arvense* and *L. amplexicaule* maintained significantly higher population densities in the soil than were recorded in the fallow pots in variants with. After 14 weeks, in fallow pots 3.24% of the population of *M. arenaria* was still alive.

EVALUATION OF INNOVATIVE TECHNIQUES FOR A SUSTAINABLE CONTROL OF ROOT-KNOT NEMATODES AND *PYRENOCHAETA LYCOPERSICI*

Sasanelli N.¹, Gallo M.², Ciccicarese A.³, Laquale S.¹, Ciccicarese F.², D'Addabbo T.¹

¹ Institute for Plant Protection, C.N.R., Via G. Amendola 122/D 70126 Bari, Italy;

E-mail: n.sasanelli@ba.ipp.cnr.it

² Di.S.S.P.A., University "A. Moro", Via G. Amendola 165/A, 70126 Bari, Italy;

E-mail: marilita.gallo@uniba.it

³ Di.S.A.T., University "A. Moro", Via G. Amendola 165/A, 70126 Bari, Italy;

E-mail: adelaide.ciccicarese@uniba.it

INTRODUCTION

Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) can severely affect tomato (*Lycopersicon esculentum*) root systems and cause relevant yield losses, especially when associated with corky root disease caused by the fungal soilborne pathogen *Pyrenochaeta lycopersici*.

The recent European Legislation has deeply revised and restricted the use of pesticides, mainly fumigants, on which control of nematode pests and soilborne pathogens relied throughout the past decades. Therefore, a wide range of environmentally sustainable alternatives to chemicals have been investigated in the recent years. Biopesticides based on biological control agents, mainly fungi and bacteria, and soil treatments with gaseous ozone or ozonated water are among the most innovative and effective tools available for the control of root-knot nematodes and soilborne pathogens. Previous *in vitro* trials have demonstrated the nematicidal activity of the chitinolytic fungus *Aphanocladium album* isolate MX-95 against root-knot nematodes, as well as a high biocidal effect of ozone treatments has been observed in experiments on tomato and eggplant.

The effectiveness of soil treatments with *A. album* isolate MX-95 (AA MX-95) and gaseous ozone (GO) against a combined attack of the root-knot nematode *M. incognita* and *P. lycopersici* was comparatively assessed in a greenhouse trial on tomato.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was undertaken in a greenhouse, located at Valenzano (province of Bari, Apulia Region), with sandy-soil naturally infested by *M. incognita* and *P. lycopersici*. Soil was deeply ploughed, rotavated and subdivided into 12 m² plots, spaced 1 m each other, and distributed in a randomized block design with four replicates for each treatment. A PVC drip lines (Ø 1.6 cm) sub-irrigation system was placed at 20 cm depth in each plot, to allow different experimental treatments. Treatments in comparison are reported in Table 1. Untreated soil and 600 Kg ha⁻¹ dazomet (DAZ) applied 30 days before transplanting, were used as controls.

Mycelium of AA MX-95 was dissolved in sterile water, sown in PDA in plastic Petri dishes, incubated at 24 °C for 7 days and then homogenized in sterile water with a tensioactive to disperse the strongly hygroscopic conidia. Concentration of fungal inoculum was determined and diluted to obtain a 2×10^7 CFU ml⁻¹ standard conidial suspension. Suspension was then applied by sub-irrigation at a dose of 2.5 L/plot. GO was generated on site by an ozone generator, and adjusted at a 2 ppm concentration by a control panel. One month old tomato seedlings (cv. Super Marmande) were transplanted in each plot in three rows, seven seedlings on each row. Plants were maintained in the greenhouse for three months, providing needed cultural practices throughout the growing season. Tomatoes were harvested from 15 July to 15 October and total marketable crop yield was calculated. Plants from the central row in each plot were uprooted to estimate the root gall index (RGI) caused by nematode attack, according to a 0 - 5 scale (0 no galls and 5 root system completely deformed by large and numerous galls). Corky root severity (CRS) on main and secondary roots was estimated according to another 0 – 5 scale (0 = healthy root; 1 = 1 - 10% affected root surface (a.r.s.); 2 = 11 - 25% a.r.s.; 3 = 26 - 50% a.r.s.; 4 = 51 - 75% a.r.s. and 5 = > 76% a.r.s.). Nematodes were extracted from a 500 ml sub-sample of soil samples collected in each plot, according to the Coolen's method.

Data from the experiment were subjected to analysis of variance (P = 0.05) and means compared by Duncan's Multiple Range Test with PlotIT software.

RESULTS AND DISCUSSION

All treatments with AA MX-95 and GO resulted in a marketable yield significantly higher than the untreated control and not significantly different from chemical control (Table 1).

Compared to untreated control, treatments with AA MX-95 and GO also significantly reduced corky root symptoms and severity of disease both on main and secondary roots, without any significant difference among the treatments. However, the lowest *P. lycopersici* infestation index was observed on main and secondary roots of plants treated with DAZ (Table 1). DAZ was also significantly more effective than AA MX-95 and GO for reducing RGI and final soil population density of *M. incognita* (Table 1). However, GO applied both pre and post-transplant resulted in a RGI not significantly different from DAZ. Significant positive correlations were found between RGI and CRS both on main ($r^2 = 0.871$) and secondary root ($r^2 = 0.964$), as indicating that severity of *P. lycopersici* increases by nematode infestation. Tomato root penetration and infection by *P. lycopersici* may be supposed to be favoured by tissue wounds caused by mechanical action of *M. incognita* juvenile stylet.

Ozone treatments in post transplant, with aeration of the greenhouse, were not phytotoxic on tomato plants and the capacity of the ozone to decompose the soil organic components resulted in an increasing of plant vegetative development caused by the availability of nutritive elements.

In conclusion, AA MX-95 and GO treatments seem to be two effective and eco-friendly tools for the management of simultaneous attacks of root-knot nematodes and *P. lycopersici*. Sub-irrigation application also seems to be technically and economically effective, as ensuring a more homogeneous distribution and reducing costs due to the frequent use of irrigation system for crop practices.

Table 1. Effect of treatments with *Aphanocladium album* isolate MX-95 (AA MX-95) and gaseous ozone (GO) on combined attacks of *Pyrenochaeta lycopersici* and *Meloidogyne incognita* on tomato plants (cv. Super Marmande).

Products	Treatments		Tomato yield (T ha ⁻¹)		Corky root severity (0-5)				<i>M. incognita</i> infestation			
	Pre-transplant	Post-transplant			Main root	Secondary root	RGI (0-5)		Final population (Eggs and J ₂ ml ⁻¹ soil)			
AA MX-95	2.5 L/plot	2.5 L/plot 3 times every 20 dd	94.8*	b**c	2.2	bc	2.0	bc	3.3	bc	10	bc
AA MX-95	-	2.5 L/plot 3 times every 20 dd	94.1	bc	2.5	bc	2.5	bc	3.7	bc	10	bc
GO	2 ppm x 10 hrs	-	83.2	bc	2.9	bc	2.2	bc	3.0	bc	13	bc
GO	2 ppm x 10 hrs	2 ppm x 4.5 hrs x 2	79.7	bc	2.5	bc	1.8	bc	2.1	c	13	bc
DAZ	600 Kg ha ⁻¹ 30 dd b.t.	-	96.2	bc	1.9	c	1.4	c	2.0	c	5	c
Nontr eated	-	-	65.8	abc	4.5	a	4.0	abc	4.9	abc	23	abc

* Each value is an average of 4 replications (21 plants/replication);

** Data flanked in each column by the same letters are not statistically different according to Duncan's Multiple Range Test (P=0.05).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Mr. De Cosmis Pasquale for the excellent assistance.

REPRODUCTION OF MYCOTROPHIC NEMATODES *APHELENCHUS AVENAE*, *PARAPHELENCHUS TRITICI*, *APHELENCHOIDES SAPROPHILLUS* ON FUNGAL MYCELIUM *MICRODOCHIUM NIVALE*(FR.) SAMUELS & I.C. HALLET, A CAUSE OF PINK SNOW MOLD ON WINTER WHEAT

Schhukovskaya A.G.¹, Tkachenko O.B.¹, Shesteporov A.A.²

¹ Main botanical Gardens n.a. N.V. Tsitsin RAS, Moscow 127276, Russia;

E-mail: otkach@postman.ru

² Russian State Agrarian External University, Balashicha, 143900, Russia;

E-mail: zr-kaf@mail.ru

The effect of three temperatures (+5°C, 15°C and 27°C) on the growth, development and nutrition of mycohelminths *Aphelenchoides saprophillus*, *Paraphelenchus tritici* and *Aphelenchus avenae* on fungus *Microdochium nivale* was shown. Temperature +5°C was the most favorable for reproduction of these three nematode species and the total number of nematodes at a temperature of +5°C was about 1.5 times higher than at 15°C and 27°C. Nematodes were able to destroy the entire mycelium during 75 days, whereas at +15°C and +27°C from 20 to 25% of the mycelium remained on the surface of growing medium. Sex and age composition of nematodes at these temperatures vary considerably. Mycohelminth *A. saprophillus* was the most aggressive

towards a low-temperature fungus *M. nivale*. It was able not only to destroy the entire mycelium, and at together with this to achieve high population numbers. This could be explained by a peculiar property of the mycohelminth: its ability to feed and grow at low temperatures. Conditions favorable for the growth and development of mycohelminths, created during the cultivation (optimal temperature, a complete food base), may promote obtaining mass inoculum of these potential biological agents for low-temperature crop pathogens control.

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF NEW ISOLATE OF *HETERORHABDITIS BACTRIOPHORA* POINAR, 1975 BASED ON SEQUENCE OF THE ITS RDNA REGION, FROM SOUTH EAST IRAN

Sedighi, E.¹, Shokoohi, E.², Karimi, J.³

¹ *Young Researchers Society, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran;*

² *Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran; E-mail: eshokoohi@mail.uk.ac.ir*

³ *Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran;*

Entomopathogenic nematodes (EPNs) are among the important biological control agents. During a survey on this group of nematodes, a new isolate belongs to the *Heterorhabditis* genus was recovered from Lalezar region, Kerman province (Iran). After initial characterization, the ITS rDNA gene was amplified, sequenced and used for molecular characterization. The analyses showed that the new *Heterorhabditis* isolate belong to "bacteriophora" species group. The phylogenetic study based on Maximum Likelihood indicated that new Iranian isolate are in a clade among some other populations of *H. bacteriophora*. Pairwise genetic distance analysis revealed no genetic variation between Iranian population and the other populations of *H. bacteriophora*. This is the first record of *H. bacteriophora* from south of Iran.

MORPHOLOGY AND EVOLUTION OF THE LIP REGION OF NEMATODES OF THE FAMILY TOBRILIDAE

Shoshin A.V.¹, Shoshina E.A.²

¹ *Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences, Universitetskaya nab.1, St. Petersburg, 198342, Russia; E-mail: marinema@zin.ru*

² *St. Petersburg State University, Universitetskaya nab.7/9; St. Petersburg, 198342, Russia; E-mail: midsummer92@mail.ru*

Lip region morphology is a feature that has not been used in the description of tobrilids due to complexity of observation. Present study is devoted to the description of the lip region structure of thirteen tobrilid species. Observed variations of the structure can be divided according to the type of symmetry: triradial and hexactinal. The most primitive triradial symmetry of the tobrilid lip region is characteristic to *Asperotobrilus aculeatus*. Hexactinal symmetry with respect to large, fully closing the mouth opening, symmetrically arranged lips, may be considered the basic state of tobrilini and neotobrilini lip area. In these cases, the structure of the mouth parts do not show any, or insignificant features of specialization. Common specialization features of the oral apparatus were revealed in tobrilid with a known type of feeding. Diatomofeeding tobrilids are characterized by the following features: stoma cone, folded, with marked subbuccal mounds, stoma armament is reduced or absent. Lips are spliced into a ring. Macro-predators have the following features: stoma has sclerotized walls and is heavily armed, mouth opening is wide, lips are reduced. Considering the origin of lips, a presumably sister group, belonging to Tripylidae family, should refer to. The latter has triradial symmetry of the lip region. Similar is peculiar to a

representative of the most primitive among tobrilids genus *Asperotobrilus*. Considering the origin of the lips should refer to, presumably, a sister group, family Tripylidae, which has triradial symmetry of the lip region, and about a similar condition can be found in the most primitive genus *Asperotobrilus*.

MORPHOLOGY OF SUPPLEMENT ORGANS OF NEMATODES OF TOBRILIDAE FAMILY

Shoshin A.V.¹, Shoshina E.A.¹

¹ *Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences, Universitetskaya nab.1,
St. Petersburg, 198342, Russia; E-mail: marinema@zin.ru*

² *St. Petersburg State University, Universitetskaya nab.7/9; St. Petersburg, 198342, Russia;
E-mail: midsummer92@mail.ru*

The structure of the supplement organs, as well as the structure of the stoma are basic characteristics of the family tobrilid. Four main types of the tobrilid supplements may be distinguished on the basis of their structure. **Type I** — typical for *Tobrilus*, *Lamuania* and *Semitobrilus*. Supplements are small, external part of the supplement is slightly protrude. There are two variations of the type I supplement structure — “amabilis” and “gracilis”. **Type II** — typical for some *Eutobrilus* (*E. peregrinator*, *E. prodigiosus*, *E. strenuus*, *E. nothus*). These supplements are very similar to type I supplements, but have high protrudes shoulders with numerous microspikes. Bulbus is situated on basis of ampula. **Type III** — typical for some *Eutobrilus* (tribe Tobrilini) — *E. graciliformes*, *E. papilicaudatus*, *E. differtus* and *Mesotobrilus* (tribe Paratrilobini). Supplement have well-defined cap, bulbus is situated on basis of ampula. **Type IV** — observed in most *Eutobrilus*, *Paratrilobus*, *Brevitobrilus*, *Neotobrilus*. This is the most complicated supplement type with mobile cap and upper bulbus.

The process of development of nematode sensory organs from unspecialized setae may be illustrated by the evolution of tobrilid supplements.

ULTRASTRUCTURE OF SPERM DEVELOPMENT IN THE PEANUT-PARASITIC NEMATODE *DITYLENCHUS* N. SP.

Slos D.¹, Ensafi P.¹, Claeys M.¹, Yushin V.V.², Bert W.¹

¹ *Nematology Unit, Department of Biology, Ghent University, K.L. Ledeganckstraat 35, 9000 Ghent,
Belgium; E-mail: DieterG.Slos@ugent.be*

² *A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology, FEB RAS, Vladivostok, Russia;*

The spermatogenesis of the pea-nut parasitic nematode *Ditylenchus* n. sp. has been studied with transmission electron microscopy. Spermatozoa of *Ditylenchus* n. sp. represent an aberrant type of male sperma because of the absence of an axoneme and acrosome, a characteristic shared with other nematodes. The spermatogonia consist of cells with a large centrally located nucleus surrounded by a small amount of cytoplasm. The sperm development includes the formation of complexes of fibrous bodies (FB) and membranous organelles (MO) which appear in the spermatocytes. These complexes start to dissociate in separated MO and FB in the spermatids. Immature spermatozoa are unpolarised cells with a centrally located nucleus surrounded by spherical fibrous bodies and MO located at the periphery. The spermatheca contains chains of mature spermatozoa consisting of amoeboid bipolar cells subdivided in a pseudopod devoid of organelles and a main cell body. The main cell body consists of a centrally located nucleus lacking a nuclear envelope, many mitochondria and MO. The MO are connected to the plasmalemma and open to the intercellular exterior via a pore. The general pattern of spermatozoon is recognized as ‘rhabditid’, a pattern which is rather conserved throughout the order of the Rhabditida. The relevance of our data to study on nematode spermatogenesis in a phylogenetic framework will be discussed.

DISCRIMINATION OF *TRICHINELLA* SPECIES FROM RUSSIAN ARCTIC WITH *Cob* mtDNA SEQUENCES.

Spiridonov S.E.¹, Odoyevskaya I.M.^{1,2}, Bukina L.A.³, Chiljuta N.V.²

¹ Center of Parasitology, Severtsov's Institute of ecology and evolution RAS, Leninskii pr., 33,
Moscow, 199071; Russia; E-mail: s_e_spiridonov@rambler.ru

² Skrjabin's All-Russian Institute of helminthology, Moscow;

³ Vjatka State Agricultural Academy, Kirov;

Cultures of *Trichinella* spp. were established from the biopsy material collected in Russian Arctic through the digestion of muscular tissue samples and inoculation of laboratory animals with obtained juveniles. Samples were obtained from polar bear, seals, wolverines as also stray cat and arctic foxes from fur farm in Russian Arctic. The partial sequences of *Cob* mtDNA were obtained for these *Trichinella* samples using primers *Tricob F1* CAA TCC ATT AGG TAC ACA CTC AC and *Tricob R3* TAA GTA AGA TTT CAA TGG CG (Rosenthal *et al.* 2008). For obtained sequences approx. 985 bp long alignment was combined and used for phylogenetic analysis. Only two sequences of studied cultures belong to *Trichinella spiralis*. Majority of studied trichinellids were clustering with *T. nativa* and *Trichinella* sp. T6. Cultures from Russian Arctic differ from sequences of these two species deposited in NCBI GenBank in 2-14 bp. (Note: *Trichinella* sp. T6 differs in obtained *Cob* mtDNA sequence from *T. nativa* in single nucleotide only). The culture of *Trichinella* sp. established from muscular tissue sample of stray cat (shot on the fur farm in Chukotka peninslula) demonstrated numerous differences with other *Trichinella* sequences: 30-35 bp difference with *T. nativa* and *Trichinella* sp. T6 complex and 47-48 bp with *T. spiralis*. Conclusion: an analysis of nucleotide sequences of *Cob* mtDNA does not reveal significant differences between genotypes *T. nativa* and *Trichinella* sp. T6, considered now as independent species, but demonstrated high level of diversity of *Trichinella* cultures from Russian Arctic.

DNA BARCODING OF PLANT PARASITIC NEMATODES: ACHIEVEMENTS AND PERSPECTIVES

Subbotin S.A.^{1,2}

¹ Plant Pest Diagnostic Center, California Department of Food and Agriculture, 3294 Meadowview
Road, Sacramento, CA 95832, USA;

² Center of Parasitology, A.N. Severtsov Institute Ecology and Evolution, RAS, Leninskii prospect 33,
Moscow, 119071, Russia; E-mail: subbotin@ucr.edu

Summary. The plant parasitic nematodes comprise presently more than two thousand valid species. Species identification of nematodes is mainly based on adult morphology and morphometrics and often difficult for non-experts. DNA barcoding is a taxonomic method that uses one or several standardized DNA markers as species identification tool. This approach does not necessarily require taxonomic expertise. DNA barcoding markers should be variable enough to allow identification of species with a comparatively low level of intraspecific variation, amplified and sequenced with universal primers in one reaction, easily aligned and readily recoverable from degraded DNA including fixed samples. There are many potential uses for DNA barcoding including identification of agricultural nematode pests, inventory and ecological surveys. A fragment of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (*coxI*) gene was initially proposed as a DNA marker. Although the *coxI* gene has already been used with considerable success for barcoding across a range of animal groups and showed that >95% of species possess unique barcode sequences, the data for plant parasitic nematodes is still insufficient. Examples of DNA barcoding using *coxI* gene fragments for several groups of plant parasitic nematodes are given and some problems of

identification at species level are discussed. Development and maintenance of DNA barcoding as a taxonomic tool requires a permanent interaction between traditional morphological and molecular approaches using principles of polyphasic taxonomy.

SOIL NEMATODE COMMUNITIES OF NORTHERN INSULAR BIOCENOSES

Sushchuk A.A.¹, Matveeva E.M.¹

¹ *Institute of Biology of Karelian Research Centre of RAS, Pushkinkaya St., 11, Petrozavodsk, 185910, Russia; E-mail: anna_sushchuk@mail.ru*

Fauna and community structure of soil nematodes of islands situated on Ladoga and Onega Lakes (Republic of Karelia) were studied. There were investigated: 26 islands and 35 different types of habitats: 14 forest (pine, spruce forest, lime, mixed), 15 meadow, 3 transformed, 3 rocky biocenoses. High diversity (79 genera) nematode fauna was peculiar to insular biocenoses. Nematode taxa uncommon for Karelia were identified (*Prodorylaimium*, *Coomansus*, *Discolaimus*, *Cephalenchus*, *Gracilancea* and others). Bacterial-feeders were the predominating trophic group. Fungal-feeders were subdominants in forest habitats, and fungal-feeders or nematodes associated with plants in meadows. The proportion of phytotrophs was usually 15% in forests and 21,7% in meadows. However, the differences between island meadows of two lakes were revealed. The share of phytotrophs in nematode fauna was higher in the southern region of Ladoga Lake compared to islands of Onega Lake (25,8% vs. 13,5%). Soil nematode community structure and ecological indices were similar for the forest and meadow insular biocenoses. Most likely this trend is related to replacement of meadows by woody vegetation, especially in fragmentary lands. Organic matter decomposition by bacteria occurred (CI=25,6 in meadows, 37,3 in forests). Soil food web was characterized by a high level of complexity and structured condition (SI=70,2 in meadows, 74,7 in forests). The study was supported by The Ministry of Education and Science of Russian Federation, project № 8101.

ON THE NEMATODE FAUNA IN SOILS FROM PARKS OF MOSCOW

Tabolin S.¹

¹ *Center of Parasitology, A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, RAS, Leninsky prospekt 33, Moscow, 119071, Russia; E-mail: stabolin@mail.ru*

During the fall of 2011 and the fall of 2012, 130 soil samples were collected from various locations in the Neskuchny garden and the Pokrovskoye- Streshnevo park. Despite the difference of flora in the parks, nematode species composition was similar. Nematode trophic groups were represented by bacterial feeders, fungal feeders, plant parasites, predators, and omnivores. Ring nematodes (*Mesocriconema xenoplax*, *Criconema annuliferum*), virus-vector nematodes (*Longidorus elongatus*, *Trichodorus primitivus*, *Paratrichodorus pachydermus*), reniform nematode (*Rotylenchus robustus*), and spiral nematodes (*Helicotylenchus digonicus*, *H.vulgaris*) were predominant plant-parasitic species in the parks. The most widespread predatory nematodes were *Aporcelaimus pachydermus*, *Anatonchus tridentatus*, *Mononchus truncatus*, *M.aquaticus*, *Clarkus papillatus*, *Coomansus parvus*, *Mylonchulus brachyuris*, *M. sigmaturus*, *M.sexcristatus*, *Prionchulus muscorum*, *Tigronchoides ginglymodontus*, *Discolaimus major*, and *Tripyla affinis*. During the survey, plant parasitic nematode *Hemicycliophora macristhmus* and predatory nematode *Tigronchoides ginglymodontus* were registered for the first time in Russia.

CATENARIA ANGUILLULAE SOROKIN: ITS POTENTIAL AND PROSPECT FOR BIOLOGICAL CONTROL OF PLANT PARASITIC NEMATODESVaish S.S.¹, Singh K.P.¹¹ *Department of Mycology and Plant Pathology, Institute of Agricultural Sciences, Banaras Hindu University, Varanasi- 221 005, India; E-mail:shyam_saran@rediffmail.com*

Use of biological control agents for management of plant diseases offers several benefits over use of chemicals, mainly ecological safety and safe and sustainable better human life. Nature has provided several predaceous fungi to regulate population of nematodes. Among predaceous fungi, *Catenaria anguillulae* seems to play a key role in modulating population of nematodes in soil as it has several attributes of a good biological control agent viz., fast multiplication at high rate, epidemic causing ability, facultative endoparasitic nature as it colonizes plant debris as well as susceptible nematodes with varying degree of virulence. Moreover, *C. anguillulae* is widely distributed and has good compatibility with agrochemical and fertilizers. Therefore, it is suitable for the integrated management of plant diseases caused by nematodes. *C. anguillulae* is a zoosporic nematophagous facultative endoparasitic blastocladian fungus produces sporangia in chain. This fungus can be used as the best educational tool to demonstrate biological control in class room with out any chemical input in water only. Additionally, several techniques for its selective isolation, semi-quantification, rapid virulence test, purification are developed and substrates for its mass culture are known. However, there is a need to screen cheaper and easily locally available substrates. This preliminary work clearly reflects great potential in *C. anguillulae* as an appropriate biological control agent. However, the extensive work on its nutritional requirement, refinement of its mass culture technique including formulation development, ecological aspects and performance evaluation against agriculturally important plant parasitic nematodes is still required for its field application.

TOXICITY OF ALKALOIDS FROM THE CHINESE PLUM YEW (*CEPHALOTAXUS FORTUNEI*) TO *MELOIDOGYNE INCOGNITA*, *PANAGRELLUS REDIVIVUS*, AND *BURSAPHELENCHUS XYLOPHILUS*Wen Y.¹, Meyer S.L.F.², Masler E.P.², Liao J.¹, Chitwood D.J.²² *USDA ARS Nematology Laboratory, 10300 Baltimore Ave., BARC-West, Bldg 10A, Beltsville, MD, 20705, USA*

Cephalotaxus species are known to produce unidentified compounds toxic to nematodes. Therefore, a bioassay-guided chemical fractionation process was utilized to identify the compounds responsible for inhibition of reproduction of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. Inhibitory activity primarily occurred in a fraction containing a mixture of alkaloids; further purification revealed that the alkaloid drupacine was the major inhibitory component. The ED₅₀ of drupacine for inhibition of *B. xylophilus* reproduction was 27.1 µg/ml. In a *Meloidogyne incognita* direct contact assay with second-stage juveniles (J2), the ED₅₀ was 76.3 µg/ml, and immobile J2 did not regain motility when transferred to water. Crude alkaloid extract exhibited greater toxicity to eggs (as indicated by hatching experiments) than J2 of *M. incognita*. In a stylet thrusting/motility bioassay, nematode activity was inhibited fourfold by 20 µg/ml of crude alkaloid extract. Drupacine at 0.3 mg/ml inhibited protease activity in *Panagrellus redivivus* extracts more than crude alkaloid extract applied at the same concentration. Although protease activity in extracts of *M. incognita* was lower than that in *P. redivivus* extracts, it was also significantly inhibited by drupacine. In greenhouse experiments on *Capsicum annuum*, application of 0.5 mg/ml crude alkaloid extract to soil infested with *M. incognita* did not significantly reduce shoot length or weight, but the number of eggs and J2 per root system respectively decreased by

69% and 73%. This research provides the first demonstration of nematotoxicity of crude *Cephalotaxus* alkaloids and the purified component drupacine. Moreover, crude alkaloid extract effectively suppressed root-knot nematode egg and J2 production on plant roots. Although the specific mode of action of drupacine and other cephalotaxine alkaloids against nematodes remains unknown, this is the first demonstration in any nematode that a plant alkaloid inhibits proteolytic activity.

POPULATION CYCLING OF PLANT PARASITIC NEMATODES IN PERENNIAL CROPPING SYSTEMS

Westerdahl B.B.¹

¹ *Department of Entomology and Nematology, University of California, One Shields Ave., Davis, CA 95616 USA; E-mail: bbwesterdahl@ucdavis.edu*

Nematode population cycling in soil and roots is driven by biotic and abiotic factors. In California, USA, nematode population cycling and associated abiotic factors have been monitored over several growing seasons, for dagger nematode (*Xiphinema index*) on grapes; lesion nematode (*Pratylenchus penetrans*) on Easter lilies; ring nematode (*Mesocriconema xenoplax*) on prunes; lesion (*P. vulnus*) and ring nematode on walnuts; and for *Anguina pacificae* and other nematodes on turfgrass. Yearly trends vary by cropping system, but are reasonably consistent for a particular crop. Results have made it possible to improve recommendations for methods to sample vineyards, orchards and golf courses; improved our ability to interpret nematode samples obtained at different times of the year; and initiated additional research on timing of management practices.

MAJOR SPERM PROTEIN (MSP) IN THE NEMATODE SPERMATOZOA

Yushin V.V.^{1,2}, Claeys M.³, Bert W.³

¹ *A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology, FEB RAS, Vladivostok, Russia;
E-mail: vvyushin@yandex.ru*

² *Far East Federal University, Vladivostok, Russia;*

³ *Nematology Unit, Department of Biology, Ghent University, Belgium;*

The nematode spermatozoa represent a highly modified (aberrant) type of male gametes which lack a flagellum but develop ancient crawling type of movement on the basis of the cytoskeletal component known as “major sperm protein” or MSP (nematode specific small protein of 126 amino acids with a molecular weight of 14 kDa). Despite the apparent novelty of MSP and sperm motility, the system can offer insights into the canonical, actin-based mechanism of cell movement. The MSP is also known as an important hormone triggering oocyte maturation and stimulating the oviduct wall contraction to bring oocytes into position for fertilization. MSP seems to be restricted to nematodes, and MSP-based sperm motility appears to be conserved among nematodes. Initially MSP has been identified in *Caenorhabditis elegans*; then the MSP genes were sequenced in many distant nematode taxa. However, direct evidences of MSP localization and fate in spermatogenic cells are rare. New data on MSP presence and localization illustrate form and function of MSP in very diverse spermatozoa of nematodes. MSP begins to assemble in spermatocytes as paracrystalline fibrous bodies (FB) associated with the membranous organelles (MO); assembling continues through the spermatocyte stage; the FB-MO complexes disassemble in the spermatids and upon activation, MSP reassembles into filamentous fibers in the pseudopod. The immunocytochemical observations show presence of MSP in spermatozoa of very distant taxa of nematodes. (Support: RFBR 11-04-00368; FEB RAS 12-III-A-06-098; RF 2010-220-01-180).

SOIL NEMATODES IN PINE FORESTS OF NATURAL RESERVED TERRITORIES OF CHERNIGOV REGION

Zhilina T.M.¹, Shevchenko V.L.¹

¹ *Chernigov National Pedagogical University after T.G. Shevchenko, Chernigov, Polubotka str., 53, Ukraine, 14013; E-mail zhylinat@mail.ru*

Soil nematode fauna in pine forests of natural reserved territories of Chernigov region was studied. 30 species of nematodes belonging to four orders were revealed. Rhabditida and Tylenchida dominated in number. Nematode-saprobionts prevailed in pine forests of region.

ELECTRONIC ACCOUNTING OF PATHOGEN BIOLOGICAL AGENT COLLECTIONS (PBA)

Zhilokov A.¹, Kozhevnikov K.¹

¹ *PACS Analyst, Federal Services Division, Black & Veatch, 16 Marksistskaya St., Moscow, 109147, Russia; E-mail: zhilokov@bv.com, Kozhevnikovk@bv.com*

The issues, which arise at the junction of various spheres of science and activity, have always been the most interesting and frequently complex from the point of view of finding the optimal and elegant solution. Such solution, which would meet the requirements and limitations of all spheres and simultaneously would be clear and available to those, which will apply that solution in their activity. One of such issues is building electronic systems for realisation of the follow-up and control of the pathogens stored in collections of scientific research institutes and laboratories. This issue arises within a bordering region of the scientific, research activity and IT technologies. This article shall, then, relates to solving the similar issue.

To begin with, the basic requirements to such systems have to be outlined. On the one side, the system should provide the required level of security and reliability of PBA data storage, which is being, as a rule, confidential and should correspond to the existing rules on record keeping of biomaterials. On the other side, it has to be simple and convenient to use and to provide additional advantages for operation with the information against the paper records.

The availability of the accounting system on the basis of the paper records, used in all scientific organisations without exception which have the collections of microorganisms, is entailed by the obvious requirement to keep an accurate record of all stored units, their movement and modification of parameters with the purpose of non-spread both bioagents, and the information about them, as well as for complying with the rules and requirements of inspecting services and authorities. For the perennial history, the systems, which base on paper records, have proved to be efficient and reliable. Nevertheless, the development of scientific and technical progress permits to apply new knowledge in area of information technology for the development of electronic systems, which would completely cover the features of the paper means and could grant a number of additional material advantages.

One of the solutions, which meets the above requirements, is the Pathogen Asset Control System (PACS). This system is developed on the basis of Sanitary rules SP 1.2.036-95 "Procedure of accounting, storage, transfer and transportation of microorganisms of the I-IV group of pathogenic power", issued by the State Committee on Sanitary and Epidemiology Surveillance of the Russian Federation, as well as considering the similar statutory acts which regulate the procedure of operation with microorganisms in the CIS countries. Development and system implementation is carried on within the scope of the joint project of the governments of the CIS countries, the Russian Federation, the USA and with the participation of the International Scientific and Technical Centre (ISTC).

PACS constitutes an electronic system for accounting and control of the pathogenic materials, which are kept in PBA collections, with many opportunities to provide realisation of inventory stocktaking and reporting, and provides the high level of security and reliability of the information storage.

The concept of PACS means installation of computer system nodes in all sites where registration, storage and research of the pathogenic microorganisms are effected to support a continuous follow-up chain of the all life cycle of microorganisms. The accounting is made using technology of bar coding the containers with the bioagents.

The Fig. 1 shows schematically the concept of operations and the basic PACS nodes. The system operation implies availability of the central database and client parts of the application in all required sections. Except the laboratories, which work with microorganisms, the system nodes can be installed in pathogen reception point, at the manager and administration of the institution, as well as in the other sections, if necessary.

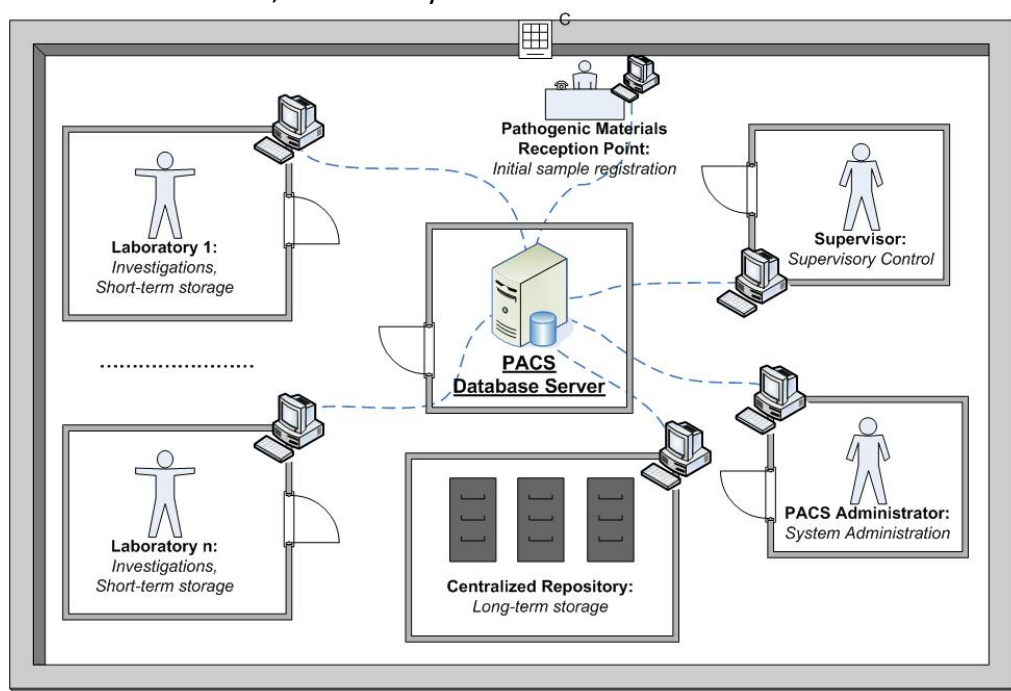


Fig.1. Concept of operations and PACS basic nodes

Within the limits of a single institution from one to more than 30 access points with the possibility of a concurrent working can be installed. The PACS database allows storing the information on more than 5 million containers with the bioagents without any material effect on performance that, as a rule, exceeds considerably the required volume of information. Thus, PACS equally suits for both small narrow profile laboratories and the large-scale scientific organisations, with many sections and the distributed structure of storage of the bioagents.

The system is developed on the basis of .Net technology in the environment of Microsoft Visual Studio 2008 in C Sharp language. The database management system is Microsoft SQL Server 2008. The system designed for running in Microsoft server and workstation operation systems - Windows Server, Windows XP, Windows Vista and Windows 7.

The user interface of the application is modern, simple and convenient to use that allows learning it easily and quickly start working with PACS.

Among the basic PACS features, the following should be noted:

- **Creation of repository detailed configuration.** This feature allows the users to create an exact copy of a repository: premises, refrigerators, shelves, cases, tube adapter tripods and so on up to the individual storage cells inside the cases.

- **Registration of incoming bioagents.** It allows registering all pathogenic materials, which arrive for research and storage, to number them with the unique bar-code numbers, to specify an exact location in storage area and to register all their characteristics and parameters indicated in enclosed documents (covering note, certificate). The electronic forms for accounting the specimens and materials can be therefore customised according to the requirements of a specific institution and types of the accepted bioagents
 - **Parameters customisation for data access.** Using the system of data access on the basis of individual login accounts allows to limit the access to the information for each employee according to its authorities and duties
 - **Collection inventory stocktaking.** The inventory stocktaking feature allows conducting a complete repository verification and to clarify the accuracy and the relevance of the information on the biomaterials, that is stored in the database.
 - **Reporting.** PACS provides the feature of creating both standard reports to be printed (Material Tracking Form, Registration Certificate, etc.), and the customised reports which format can be selected according to the user options.
 - **Control of the employee operations.** Totally all operations of the users are recorded in system events logs that allows to follow up the historical information on access of an employee to some or other data. Besides, the system provides the feature to activate the option of the remote authorisation, requiring preliminary permission of the manager for execution of operations in the system
 - **Data security.** The system has the back up and the data recovery features
 - **Additional operations with biomaterials:** Subculturing, Aliquoting, Movement, Transfer, Destruction, Usage and Dilution

The features set forth above are only a small part of the opportunities provided by PACS to the users. The development of the application continues, the current version is No. 4, and the version 5 is planned to be issued in autumn of 2013. Current PACS version has RFID technology implemented in for vials marking (RFID Labels), for vials tracking (RFID Gates) and for speed up and simplify vials operations (RFID Readers/Antennas).

At the end, a number of the scientific institutes, which successfully use PACS software product, should be noted, as follows:

- All-Russia Scientific Research Institute of Phytopathology, Moscow region, settlement Bolshiye Vyazyomy, the Russian Federation
 - Lawrence Livermore National Laboratory, Livermore, California, USA
 - Northern Arizona University, Flagstaff, Arizona, USA
 - Southeast Poultry Research Laboratory, Georgia, USA
 - Kazakhstan Scientific Centre for the Quarantine of Zoonotic Diseases, Almaty, Kazakhstan
 - National Research Center of Veterinary, Astana, Kazakhstan
 - Research Institute for Biological Safety Problems, Otar, Kazakhstan
 - Republican Anti-Plague Station, Baku, Azerbaijan
 - Scientific Research Institute of the Control of Veterinary Preparations, Baku, Azerbaijan
 - National Centre for Disease Control, Tbilisi, Georgia
 - Ukrainian Research Anti-Plague Institute, Odessa, Ukraine

Moreover, the system is at the stage of trial operation in three scientific institutes of the USA.

The system development continues in close co-operation with users, current and future, to guarantee its being in demand and applicability in the target sphere.

PLANT RESISTANCE TO PARASITIC NEMATODES: MOLECULAR GENETIC AND BIOCHEMICAL ASPECTS

Zinovieva S.V.¹

¹ *Centre of Parasitology, A.N. Severtsov Institute ecology and evolution, RAS, Leninski prospect 33, Moscow, 119071, Russia; E-mail: zivovievas@mail.ru*

Sedentary plant-parasitic nematodes establish long term relationships with their hosts. Gene expression studies of several plant–nematode interactions showed that different defense-related genes are up-regulated upon infection of both susceptible and resistant plants, including genes encoding peroxidase, chitinase, lipoxygenase, extensin, and proteinase inhibitors. Expression of these defense-related genes in both the compatible and the incompatible interaction suggests their role in basal resistance. The main components of plant immunity to plant-parasitic nematodes are specific membrane and cytoplasmic receptors. These receptors possess conserved leucine – rich repeats (LRR) patterns. Membrane-bound pattern recognition receptors play major role in non-specific immune response by triggering necessary reactions in order to fight the pathogen. However the defense response is strong and quick enough to prevent successful nematode infection only in the presence of a functional R protein that can recognize the appropriate AVR protein from the nematode. Nematode resistance genes are members of the LZ-NBS-LRR family. The LRR region plays a role in the signalling process that leads to plant cell death (typical for the hypersensitive response) and that the N-terminal part of the protein controls this cell death. The Hspro1 gene (from wild beet), which confers resistance to *Heterodera schachtii* is different from any other resistance gene cloned from plants. The gene encodes a relatively small protein that does not contain a LRR.

ROLE OF JASMONIC AND SALICYLIC ACIDS IN THE RESISTANCE OF TOMATO TO ROOT-KNOT NEMATODE *MELOIDOGYNE INCOGNITA*

Zinovieva S.V.¹, Udalova Zh.V.¹, Gerasimova N.G.²

¹ *Center of Parasitology, IPEE RAS, Leninsky pr., 33, Moscow, 119071, Russia;*

E-mail: udalova.zh@rambler.ru

² *Bach Institute of biochemistry RAS, Leninsky pr., 33, Moscow, Russia, 119071;*

Salicylic (SA) and jasmonic (JA) acids are the best known mediators of signal systems in plants. Participation and character of interactions between SA- and JA-signals under conditions of the induced and genetic resistance of plants to nematodes were studied. Model system of a tomato (*Lycopersicon esculentum*) and a root-knot nematode *Meloidogyne incognita* was employed. This study demonstrated that application of JA and SA to tomato foliage induced systemic effects that suppressed root-knot nematode infestation, inhibition of nematode reproduction, and also increased activity of LOX and PAL, and the enzymes of biosynthesis of JA and SA. JA treatment did not inhibit Mi-mediated resistance, which suggests a lack of signaling conflicts between these two forms of defense.

SPERMATOGENESIS AND LOCALIZATION OF MAJOR SPERM PROTEIN (MSP) IN FREE-LIVING NEMATODE *PANAGRELLUS REDIVIVUS* (RHABDITIDA, PANAGROLAIMIDAE)Zograf J.K.¹, Yakovlev K.V.¹¹ A.V. Zhirmunski Institute of Marine Biology FEB RAS, Vladivostok, 690059, Russia;
E-mail: zojulia@yandex.ru

Nematode spermatozoa are nonflagelated cells moving by the means of pseudopodium. Molecular composition of the nematode sperm cells has been studied on the example of free-living soil nematode *Caenorhabditis elegans* and parasitic nematode *Ascaris suum*. It was shown that major sperm protein (MSP) comprises 15% of total proteins in the sperm cell and it was not found in any other tissue of nematodes. MSP is able to form filaments that are playing role in the cellular locomotion. Beside the structure and function of MSP has been accurately studied, the presence of the MSP in the nematode spermatozoa has been shown on the little number of species. Localization of the MSP in germ cells of the *Panagrellus redivivus* has been studied using confocal microscopy. During spermatogenesis MSP is first found in the spermatocytes II in granular form and number of granules increasing during cells growth. In spermatids MSP still present in the granular structure and fills almost all cytoplasm. In spermatozoa from the vesicule seminale granules with MSP dissociate and fibers of MSP fills cell cytoplasm. Activated spermatozoa from the female reproductive system are found in two conditions: i) free spermatozoa in the uterus lumen; ii) spermatozoa attached to the uterine wall. In the first case spermatozoa are polarized cells with anterior pseudopodia and posterior main cell body. In this case, fibers of MSP filled pseudopodium cytoplasm. Spermatozoa attached to the uterine wall are not polarized cells and MSP evenly distributed in the cell cytoplasm.

IS A BIOGEOGRAPHY OF FRESHWATER NEMATODES POSSIBLE?Zullini A.¹¹ Department of biotechnology & biosciences, University of Milano-Bicocca, Italy;
E-mail: aldo.zullini@unimib.it

An attempt was made to detect some possible biogeographic patterns in the distribution of freshwater nematodes. The literature concerning 14 geographic areas (in Eurasia, Africa and America) and 8 well studied lakes, was examined, *i.e.* many papers published from 1905 to 2011. After some taxonomic corrections, a total of 1030 nominal species were listed: the richest area was Germany+Australia (301 valid freshwater nematode species) whereas the richest lake was Balaton (143 species). Notwithstanding the ubiquity of most freshwater nematodes, some distributional patterns emerge from a multidimensional analysis: *e.g.* the nematode communities of the European regions are more similar *inter se* in comparison with the other continents. Examining the lakes only, Baikal nematodes appear more different from the other lacustrine nematodes from other parts of the world. It is possible to conclude: (1) that freshwater nematodes communities show some difference at the continental level only, and (2) that the freshwater nematode biota is divided into two parts with the Lake Baikal community on one side, and the rest of the world community on the other.

PECULIARITIES OF FINE MORPHOLOGY OF DESMOSCOLECIDA BY THE EXAMPLE OF TRICOMA ALBIMARIS

Tchesunov A.V.

*Department of Invertebrate Zoology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Moscow, 119991, Russia: AVTchesunov@yandex.ru*

Species of marine free-living nematodes of the order Desmoscolecida have a very unusual appearance. Body of desmoscolecoids usually short, spindle-shaped and consists of very prominent cuticular rings (main rings) alternating with narrow interzones. Number of the main rings often relatively low and constant within a species. Thus, body in most species of *Desmoscolex* consists of 17 main rings. The main rings are coated with rough granulated concretions (or desmen). Most authors (e.g. Timm, 1970; Tchesunov et al., 1996) considered the concretions as a product of a secretory activity of nematodes. However, Riemann & Riemann (2010) basing mainly on own observations of behaviour of live desmoscolecoids conclude that concretions are mineral particle accumulations. Body of live desmoscolecoids are very pliable and their cuticle seems to be soft and slack unlike most other nematodes. Locomotion of the desmoscolecoids is also quite peculiar. *Desmoscolex* species walk on the dorsal body side, stalking with sticky subdorsal setae (Stauffer, 1924).

Besides cuticle and locomotion, desmoscolecoids are featured with a few other peculiar morphological traits. Amphids are bulging vesicular and seemingly covered with a thin cuticle (Lorenzen, 1981). Most if not all desmoscolecoids possess so called ocelli, two lateral yellow-brownish oval bodies at the level of the anterior midgut within the body. But numerous deep-sea desmoscolecoid species are also provided with ocelli despite the fact that they live in aphotic zone within bottom sediment. Pharynx of some desmoscolecoids (*Quadricomoides*) is complicated with an internal dorsal projection (Decraemer, 1976). Many species have rather large round lateral organs on the tail called phasmata, this is also a unique feature of desmoscolecoids.

At the same time, fine structure of desmoscolecoids is almost not known for the time present. Morphological observations are scattered in many taxonomic publications (Decraemer, 1985). Goal of this study is obtaining new data on desmoscolecoid anatomy in order to understand their structures. Particular goal is evaluation of both hypotheses of the nature of concretions and cuticle structure. Main subject of the study is *Tricoma albimaris* Decraemer & Tchesunov, 1996 sampled in the sublittoral zone of the White Sea, Northern Russia. Additional subject is *Quadricoma* sp. from the deepsea Kurile Trench in the north-west Pacific. Methods are TEM and SEM microscopy, SEM detection of element composition.

Results and discussion Body cuticle consists of main rings covered with desms or desmen (thickenings) separated by narrow interzones. The desms are built by grit particles (concretions). The cuticle itself is structurally simple very thin, equally thin in main rings and interzones. Short finger-like projections arise from the cuticle into the desms - probably, the projections function in desm building. However, neither pores or canals in the cuticle nor indications on secretory activity in epidermal cells were revealed. Cuticle has a slightly developed stratification and vestigial radially striation in the subsurface zone. The peculiar evenly thin cuticle with regular broad main rings coated by desms may be connected functionally with unusual mode of crawling by regular stretching and contracting of the body unlike typical nematode coiling locomotion. Desms covering over the main rings look as confused accumulations of irregular amorphous platelets or granules of various shape and size. No glands or any cells with secretory activity were revealed in the subcuticular epidermis. Analysis of element composition reveals clear peaks of silicium, aluminium, and iron that indicates the concretions are mineral accumulations resembling clay. The hypothesis of Riemann & Riemann (2010) is thus supported.

Other results. Large vesicular amphids are covered with thin cuticle which is similar to the body cuticle and covered with a thin discontinuous layer of small concretions. Internal cavity of the amphid is filled with a liquid substance and contains bundles of ciliary processes within. Phasmata, peculiar round paired lateral organs on the terminal tail main ring constitute open pits filled with transparent substance with ciliary processes; a nerve comes out anteriorly from the bottom of the pit. Phasmata of *Tricoma albimaris* rather resemble circular head amphids of other nematodes (e.g. Monhysterida, van de Velde & Coomans, 1992) whereas own amphids of *Tricoma* are quite different. So-called ocelli, other highly peculiar of the most desmoscolecid species incl. deepsea species, consist of electron-dense laminate material with concentric striation. No evident sensory structures are found in or over these organs. Evidently, the ocelli function in a different way, not as photoreceptors. Mouth opening small and round; small cheilostoma is formed by invaginated somatic cuticle and armed with teeth-like structures. Pharynx typical, with triangular internal lumen lined with thin cuticle. Midgut on the cross section consists of only two lateral cells; narrow internal lumen is densely filled with long microvilli arranged along the intestine axis. The study is supported by grant **RFBR N 12-04-00781**.

References

- Decraemer W., 1976. Scientific report on the Belgian expedition to The Great Barrier Reef in 1967. Nematodes VI. Morphological observations on a new genus *Quadricomoides* of marine Desmoscolecida // Australian Journal of Marine and Freshwater Research, 27: 89-115.
- Decraemer W., 1985. Revision and phylogenetic systematics of the Desmoscolecida (Nematoda) // Hydrobiologia, 120: 259-283.
- Lorenzen S., 1981. Entwurf eines phylogenetischen Systems der freilebenden Nematoden // Veröffentlichungen des Instituts für Meeresforschung in Bremerhaven, Supplement 7, 472.
- Riemann F. & Riemann O., 2010. The enigmatic mineral particle accumulations on the cuticular rings of marine desmoscolecid nematodes – structure and significance explained with clues from live observations // Meiofauna Marina, 18: 1-10.
- Stauffer H., 1924. Die Lokomotion der Nematoden. Beiträge zur Kausalmorphologie der Fadenwürmer // Zoologische Jahrbücher. Abteilung für Systematik, Ökologie und Geographie der Tiere, 49: 1-118.
- Tchesunov A.V., Malakhov V.V. & Yushin V.V., 1996. Comparative morphology and evolution of the cuticle in marine nematodes // Russian Journal of Nematology, 4(1): 43-50.
- Timm R.W., 1970. A revision of the nematode order Desmoscolecida Filipjev, 1929. University of California Publications in Zoology, 93: 1-115.
- Van de Velde M.-C. & Coomans A., 1992. The ultrastructure of the anterior sensory anatomy of the marine monhysterid nematode *Geomonhystera disjuncta* // Fundamental and applied Nematology, 15(3): 209-221.

SOIL NEMATODE COMMUNITIES OF POTATO CROP UNDER HEAVY METAL POLLUTION

Diyeva D.S., Matveeva E.M., Sushchuk A.A.

Institute of Biology of Karelian Research Centre of RAS, Pushkinkaya St., 11, Petrozavodsk, 185910, Russia, e-mail: dania_22@mail.ru

Soil nematode fauna and community structure of functioning and former potato fields were studied. Soil samples were taken in the plots which are supposed to be polluted by heavy metals (Pb, Cu, Zn, Ni) with wide range of concentrations (Petrozavodsk, Republic of Karelia). Functioning potato fields were characterized by the high quantity of nematodes (2500-3500 ind./100 g soil), a high proportion of plant parasites in the community structure (they were

subdominant in the fauna) and the prevalence of nematodes genus *Rhabditis* (23-25%) with c-p-1 value (Bongers, 1990). The soil was infested by specialized parasite of potato crop - *Globodera rostochiensis* Woll. Ecological indices (maturity index MI, channel index CI, structure index SI and enrichment index EI of soil food web) indicated the stable and developed soil food web with the inputting of large amounts of organic matter, which are decomposed by bacteria. Cessation of potato growing was led to a restructuring of nematode community (omnivorous nematodes became subdominant trophic group, population density and index EI were reduced). Heavy metal contaminated plot (Pb – 53 mg/kg soil, Cu – 87 mg/kg) had plant parasites as dominated ecotrophic group (40,9%) and high share of *Paratylenchus nanus* in the fauna (21,1%). Productivity of potato crop was sharply reduced and the field was taken out of agricultural lands. Thus, the obtained data confirm the pattern, previously established by Suchchuk, Gruzdeva (2012): soil ecosystem transformation connected with environment pollution is led to increase in the number of plant parasites in the nematode fauna. Research was partially supported by Programme of Fundamental Research of Biology Department, RAS.

SAPROPHYTIC NEMATODES AS BIO-INDICATORS IN SOIL ANALYSES

Coosemans J.

Laboratory of Phytopathology, Dept. Biosystems KULeuven, de Croylaan 42, B3001 Leuven, Belgium; email: jef.coosemans@biw.kuleuven.be

Summary. Soil analyses to find out the causes for poor plant development are mostly based on chemical or biological data. Among biological data plant parasitic nematodes receive the most attention. However saprophytic nematodes contain important information as bio-indicators of the ecosystem. Based on numerous soil analyses, this study illustrates the benefits of including the total number of saprophytic nematodes, and even better, additionally in the analytical procedure, splitting up this group in colonisers and/or persisters or based on their trophic diversity.

Nematodes have many characteristics that make them adapted indicators: the high diversity of free living terrestrial species, their abundance in the soil and the relative easy sampling methods. They are in close contact with the soil water solvents by their permeable cuticula and are trophic heterogeneous groups.

In general, the number of saprophytic nematodes fluctuates between an equilibrium of 3000 to 5000 per 100 ml of soil. Numbers above and below this range are strong indications that external elements disturbed the ecosystem. Examples of soil analyses to find out the cause for poor plant development illustrate how the absence of saprophytic nematodes were the first indication of e.g. abundant use of fertilisers, pesticides or the use of immature compost or green manure. They are useful indicators about the efficiency of soil treatments against plant parasitic nematodes. Related to the trophic groups, fungal and bacterial feeders, opposite to the number of tylenchidae, are indicators of a high biological soil activity.

THE PROSPECTS OF NON-CHEMICAL OF PLANT PARASITIC NEMATODES IN ISFAHAN, IRAN

M. Nasr Esfahani^{*}, L. Motieeyan and N. Helalat

Plant Protection rResearch Institute, Center for Agricultural and Natural Resources Research Isfahan, Iran; E-mail: m_nasresfahani@yahoo.com

Abstract The plant parasitic nematodes are one of the major pests of fields and horticultural crops, causing considerable damages and limitations in growth and developments. The root knot,

Meloidogyne species including *M. javanica* and *M. incognita* and cyst nematodes, *Heterodera shactii* are the most important ones among the plant parasitic nematodes with a world wide distribution and a very wide host ranges. Nematicides are hazardous to man and Nature, also high cost and not largely applicable and killing almost all and every nematodes, including saprophytic and useful ones. Where as, the nonchemical controls are more effective, economical with a very large scales application, enhance biological control and plant growth response and keep the soil biodiversity and biological equilibrium safe. The experiments on the root-knot and the cyst nematode by using organic matters including farm manures, composts, waste cabbage leaves, and also, heat treatment, soil mulching by transparent polyethylene sheets and in integration with farm manures were studied. Biological control agents such as *Paecilomyces lilacinus* were screened against both the root-knot and cyst nematodes and also the screening of the germ plasm for the sources of the resistance and or tolerance to these nematodes were conducted. The results from all these experiments indicating the effective control of these parasitic nematodes, and promising the applicable methods almost wherever there is plant production, with a various degrees of control respectively. The farm manure including cow dung and chicken manure in integration with polyethylene tarping were the most effective treatments with more than 90% reduction of root-knot and cyst nematodes, followed by the application of these manure alone respectively, where there was increase in saprophytic nematode populations, which may lead to establishment of biological control indirectly.

The biodiversity and severity of the root-knot nematodes on some of the growing medicinal plants (MP) were assessed on the basis of galling scale and number of eggs and juveniles in roots and soil. In Isfahan, Iran. The results indicated that, there are species of the MP infected to RKN, *Meloidogyne javanica*, including Pot marigold, Horehound (*Marabium vulgare* L.), Starflower (*Echium amoenum*), Borage, Klamath weed (*Hyperium perforatum* L.), Absinthium (*Artemisia absinthium* L.), Meadow salsify (*Tragopogon pratensis*), Camomile, Garden thyme, Greaterer burdock (*Arctium lappa*), Common sage, Jerusalem Artichoke, *Pelargonium*, Rosemary, Milk thistle (*Silybium marianum*), Lemon balm (*Melissa officinalis* L.), Madder (*Rubia tinctorum* L.), Yarrow, Common lavender, Alehoof (*Nepeta hederacea*) and Celery to varying degrees in Isfahan areas. Whereas, in Najafabad regions, the infected MP species were Common rue (*Ruta graveolens* L.), Syrian beancaper (*Zygophyllum* sp.), Greater burdock, Pot marigold and Hempseed (*Cannabis sativa* L.) to *M. javanica*. And, the species in Kashan, were of Common lavender, Yarrow, Wormweed (*Lavandula angustifolia* L.), Black mulberry (*Morus nigra*), Terracotta gazania (*Gazania* sp.) and Century (*Agave* sp.) to *M. incognita*. Most of the medicinal plants in these studies are reported to be new host records for *M. javanica* and *M. incognita*. While four species (fennel, spearmint, valerian and yarrow) in Isfahan, fifteen species (Aniseed, Blueweed (*Echium* sp.), Cardoon (*Cynara drancunculus*), Dragonhead (*Dracocephalm kotschy*), Wild basil, Salad burnet (*Sanguisorba minor*), Hyssop, Iris, Klamath weed, Lambs ear (*Stachys byzanthina*), Milk thistle, Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.), Motherwort (*Leonurus cardiaca*), Oregano and Peanut were free from these nematodes (RKN). Whereas, six species were free from *M. incognita*.

The screening for the sources of resistance in tomato varieties and cultivars as a congenial host and also horticultural root stalks, indicating the presence of resistance and or tolerance sources to root-knot nematodes. Also, the biological control by the fungus, *Paecilomyces lilacinus*, and the bacterium *Bacillus thuringiensis* on both of the root-knot and cyst nematode species had already shown a significant control effects by parasiting the eggs and larvae and also females, which now is in commercial status and produced in mass in a very special forms available for application, wherever there is nematode problems. Consideration of the outcome of these type of control strategy lead us to a point that we may get the use of integrated pests management strategy (IPM), in order to keep the view for biodiversity of the soil and avoid chemical hazards, which threads the human being life and the nature directly and indirectly.

Introduction: The soil originates from alluvial sandy or loamy cultivated soils may be infested with soilborne plant pathogens, including plant-parasitic nematodes. Plant-parasitic nematodes associated with vegetable crops in growing areas in Isfahan and other parts of Iran include ring (*Mesocriconea xenoplax*), root-knot (*Meloidogyne javanica*, & *M. incognita*.) and root-lesion (*Pratylenchus* spp.) nematodes. Root-knot and root-lesion nematodes reduce growth of vegetable crops specially cucumber (Lamberti & Baines, 1969; Nico *et al.*, 2003). Therefore, in the system of vegetable production in Isfahan, soil for growth of vegetable crops in perlite should be analysed and disinfested before use. Soil solarization has successfully controlled soilborne fungi (Katan, 1980,1981), bacteria (Raio *et al.*, 1997), and plant-parasitic nematodes (Stapleton & Heald, 1991). Soil is solarized by covering level, finely tilled soil at field capacity with transparent plastic sheets. Solarization of small piles of nursery substrates used as potting mixtures for glasshouse-grown plants is a novel approach for the management of soilborne plant pathogens (Stapleton *et al.*, 1999). The efficacy of this specific use of soil solarization for the control of soilborne pathogens, particularly plant-parasitic nematodes, requires testing because disinfestations may be incomplete in deep layers of soil, or where the piles of soil are in shadow. Sometimes, *Meloidogyne* spp. are heat-tolerant and difficult to control by soil solarization (Katan, 1987). The gelatine of *Meloidogyne* egg masses protects against desiccation (Orion, 1995) and possibly against high temperatures. Soil solarization, a method of hydrothermal soil disinfestations using solar energy to heat moist soil covered by polyethylene film has controlled several fungal plant diseases and weed pests. and reduced population densities of a wide range of soilborne microorganisms. A few reports of phytoparasitic nematode control by this method have been made as well as other reports of inconclusive or negative results (Katan, 1980, 1981, 1987). The use of heat as a method of killing nematodes is well established. And hot water treatments for controlling nematodes in seed and planting stock are routine (Most of the information on nematode response to solarization. However, has been restricted to endoparasitic phytonematodes. Also, soil sampling for determination of nematode response has been confined to the upper 30 cm or less (Stapleton & Heald, 1991; Stapleton *et al.*, 1999).

This 2-yr study examined the response of soil nematodes. particularly phytoparasites to soil solarization over a wide range of experimental parameters, including nematode genera and feeding habit, extent of soil heating and depth of nematode populations in soil. In addition, the use of unde composted farm manure (cow dung) was added to the study at some sites, to test for increases of nematode control when combined with solarization, and as an indicator of control by solarization alone.

Materials and Methods:

Field treatment application. Two field sites in the Isfahan counties of Dastgerd and Raran were used. All sites were prepared by disking and rolling, or floating the soil to seedbed consistency. Effective depth of pretreatment preparation was usually 20-30 cm. Soil was either prorogated, or flooded under the clear polyethylene film (0.025 mm thickness), which was used at both the sites, with 5-15 cm of water, which was sufficient to wet the soils throughout the selected sampling depths. When Farm manure was applied approximate full (40 T. ha) for each particular treatment was used. Application depth of Farm manure was normally 20-25 cm. and treated soil was sealed by irrigation water and or polyethylene film when combined with solarization or mechanical compaction. Three replications of each treatment was used at each field site and replications were normally a minimum of 3 x 6 m. Air and soil temperatures were monitored during most experiments.

Temperature monitoring: Temperatures inside (soil) and above (air) a pile were recorded at 2 days intervals in a week using thermometers and the values averaged over each period. Thirteen thermometers were used to monitor temperatures: one for air temperature, three inside solarized soils at the same locations in the various depths, three inside soils at the same locations

in the nonsolarized control soils at locations corresponding to those described for solarized soils. The average temperature for each period for the whole of the solarization period was calculated.

Nematode sampling and assays. Immediately following the removal of the polyethylene film, soil samples were taken. Additional samples were taken at some sites 3 mo after treatment. Normally, four to eight cores (25 mm in diameter), randomly spaced, per replication were taken to the desired sampling depth with a standard soil tube bulked by replication and depth in polyethylene bags and returned to the laboratory in ice chests. Nematodes were extracted from soil by mixing the samples thoroughly, and subjecting 250 ml of soil to the centrifugal flotation extraction, or the sieving and Baermann funnel method. Root tissue samples were extracted by dicing the roots and incubating them under warm, intermittent mist (Vrain, 1978). Extracted nematodes were then enumerated under a stereo dissecting microscope and identified. The numbers of egg masses were enumerated according to the egg mass indexes (0-5) on cucumber root from every replicate and the means were calculated accordingly.

Statistical analysis: Data were subjected to ANOVA using Statistix 7-0 (NH Analytical Software, Roseville, MN, USA). For each period of solarization, means were compared using Fisher's protected least significant difference test (LSD) at $P = 0.05$. Orthogonal single degree of freedom contrasts were computed to test the effect of selected treatment combinations (Gornez & Gornez, 1984). Treatment comparisons were made in a sequence of a hierarchical classification of the different sources of variation in the experiment (i.e. in order of position, and solarization treatment). When no significant effect could be assigned to a source of variation, the corresponding data were pooled and used for further analysis. Regression analyses were performed with three replicates for each treatment combination. The percentage final relative egg hatch and final nematode population were transformed to arcsine-square root before analysis of variance (Gornez & Gornez, 1984).

Nematode culture: Field population of *M. javanica* (Treub) Chitwood, after identification based on perineal pattern characters and North Carolina host differential test, was purified by single eggmass inoculation of young tomato seedlings and sub-culturing was done subsequently by inoculating new tomato seedlings with at least 15 eggmasses obtained from pure culture in order to maintain sufficient inoculum for the experiment (Taylor & Sasser, 1978).

Fungal culture: The activated culture of *Paecilomyces lilacinus* on *M. javanica* in sterilized pots on tomato roots was recultured under a set of defined conditions to produce aerial spores on agar plates and then, was grown in a liquid medium. Czapek's liquid medium was used for its culturing in order to obtain mycelium for blending to make mycelial suspension for inoculations.

Plant culture: Seedlings of tomato *Lycopersicon esculentum* cv. Pusa Ruby were grown in sterilized soil after surface sterilization of the seeds. Three-week-old seedlings were transplanted (one/pot) in 30 cm clay pots filled with autoclaved field soil.

Inoculations: Inoculations of the seedlings in pots with the nematode and the fungus were done simultaneously as well as sequentially, according to the following treatment scheme:

T1 = Control (without any inoculation).

T2 = Inoculated with *M. javanica* alone.

T3 = Inoculated with *P. lilacinus* alone.

T4 = Inoculated with *M. javanica* and *P. lilacinus* simultaneously.

T5 = Inoculated with *M. javanica* followed by *P. lilacinus*, after one week.

T6 = Inoculated with *P. lilacinus* followed by *M. javanica*, after one week.

The level of inoculum of *M. javanica* was 2000 (freshly hatched J2/pot) and of *P. lilacinus* 1g mycelium/pot (in the form of suspension). In control pots, no organism was added. All the treatments were replicated five times. After inoculations, pots were kept in a greenhouse (25-27°C) in randomized block design. Plants were allowed to grow for 2 months.

Parameters: Sixty days after inoculations, plants from each treatment were uprooted and the roots were washed. The following plant parameters and nematode indexes were considered.

1. Plant length (root + shoot); 2. Plant fresh weight (root + shoot); 3. Plant dry weight (root + shoot); 4. Gall index; 5. Eggmass index and 6. Percentage of eggs infected (IE) with *P. lilacinus*.

Plant length and fresh and dry weights (IGR) were determined by standard methods and mean values were calculated. Gall index (GI) and eggmass index (EMI) were rated on 0-5 scale (Taylor & Sasser, 1978).

For determining the percentage of eggs infected with *P. lilacinus*, randomly selected eggmasses from the roots of plants in T4, T5 and T6 were stained with cotton-blue in lactophenol. Eggmass was transferred gently onto a clean glass slide and a drop of sodium hypochlorite was added. The eggmass was pressed under a coverslip, so that the eggs were separated and spread. The number of eggs infected with *P. lilacinus* was counted under a light compound microscope and percentage of infected eggs calculated. In addition, deformity and abnormal development of juveniles and their infection in the eggs were also observed and recorded.

The data were subjected to analysis of variance, and mean comparison was conducted using the LSD test. The Pearson's correlation coefficients were calculated on the plant parameters (IGR) and nematode indexes. Regression analysis was inducted on plant parameters as dependent variables. The data were also subjected to cluster analysis according to Ward's minimum variance method, using the cluster procedure of SAS computer software (SAS Institute, 1996).

Results and Discussion:

Air and soil temperatures. The overall air temperatures during the experiments periods are given in figure 2 (Fig. 1). Air temperature data are taken from those collected by the National Oceanic and Atmospheric Administration climatologically station nearest each field plot. These data are included to indicate proximate air temperatures only. Actual field plot temperature have varied somewhat from those reported here.

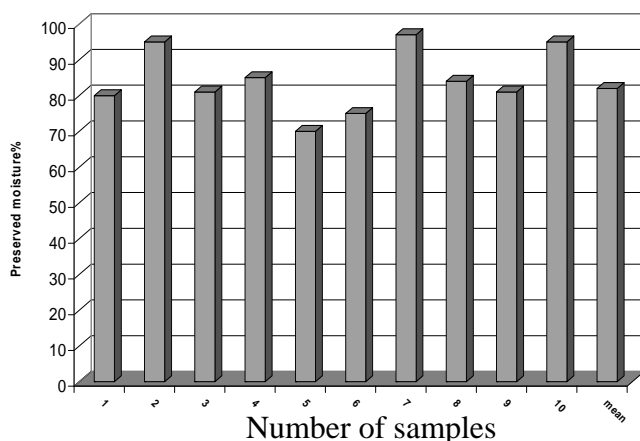


Fig. 1. Preserved moisture under polyethylene

Soil temperatures inside and outside polyethylene sheets at a given burial depth and location differed by less than 0-5°C, irrespective of the time, day and treatment. Temperatures at 15-00 h indicated cycles of warming and cooling over the whole period of the experiment, and the temperature range between the warmest and coolest days was 7°C. Soil temperature also showed cyclic fluctuations, though to a lesser extent than air temperature. All mean daily temperatures inside the solarized soils were higher than in the air in both the years, The moisture content of the soil under polyethylene sheets was preserved upto 82 percent during the solarization periods in overall, indicating the prevailing micro-organism in the solarized soils (Fig. 2).

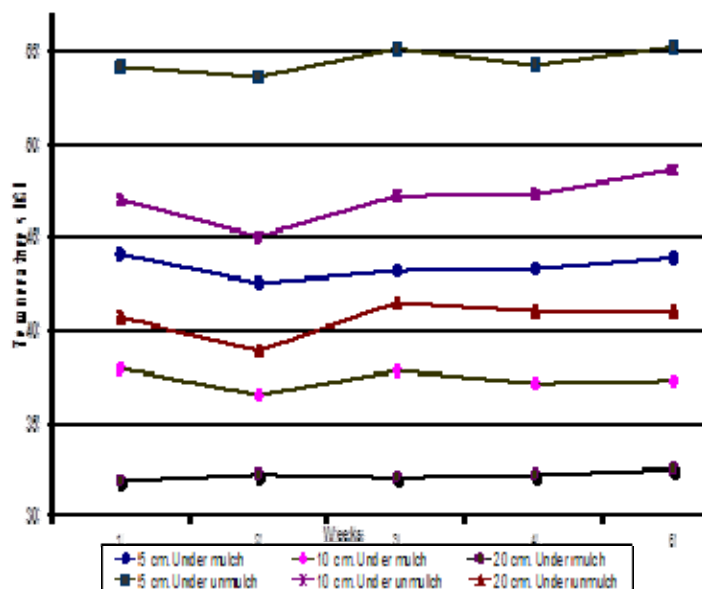


Fig. 2. Temperatures in solarized soils and controls.

Nematodes populations. Population densities of phytoparasitic nematodes, including *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Pratylenchus*, *Paratrichodorus*, *Tylenchus*, *Helicotylenchus*, *Xiphinema*, and *Paratylenchus* spp. were significantly reduced by soil solarization or manuring and solarization plus Farm manures in both the experimental sites respectively (Table 4). In experiments where nematodes were assayed, population density reductions in solarized plus manured plots were often greater significantly than when compared immediately with solarized and / or manured plots treatment alone. Therefore, organic matter effects lethal to nematodes are evident following soil solarization. These effects may be related to the fact that reductions in nematode population densities occurred. Direct heating may not have been as important here as other effects such as possible induced biological control or accumulated volatiles (Fig 3). Significant yield increases in greenhouse-and field-grown plants usually occurred in soil treated by solarization or 1.3-D plus film covering, heated or not: but not in soil treated with 1.3-D alone by our application methods. Growth increases following soil solarization were consistent with those reported previously (Stepleton et al., 1999). No significant increased growth responses were observed in orchard trees when surrounding soil was solarized and/ or treated with 1.3-D Growth data was monitored for only 1 yr following treatment, however, which may be insufficient for measuring growth effects on perennial plants. Previous studies have shown both low and high rates of phytoparasitic nematode recolonization after soil solarization (Katan, 1987). Although no comprehensive data was obtained for the relative soil recolonizing abilities of the various nematodes encountered in this study, one genus stood out from the rest. *Paratylenchus* spp. consistently recolonized solarized soil very quickly, often to levels much higher than in control soil. No definitive data were obtained during these experiments to indicate which phytoparasitic nematodes, if any were most susceptible to soil solarization, due to the diversity of nematode genera and test conditions at the various sites.

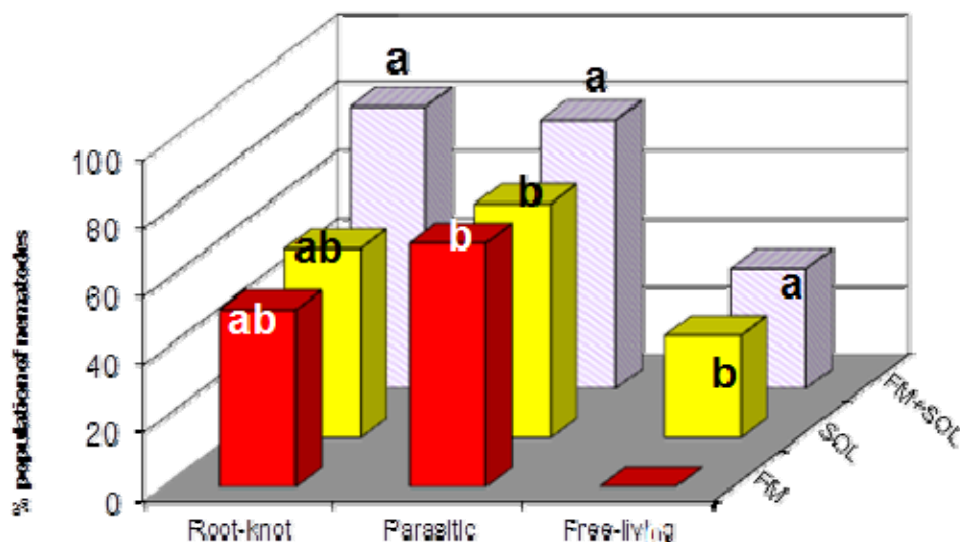


Fig 3. Percent decrease/increase in egg-masses and population of parasitic and free living nematodes

In the two experiments utilizing treatments of moist plastic covered and/or manuring, decreases in nematode population densities were approximately half those obtained in the soil solarization plus manure treatments. This indicated that a significant part of the nematicidal effect of soil solarization may be directly or indirectly due to maintaining a high soil moisture content for several weeks changes in soil gas composition, and or accumulated volatiles. These findings are consistent with population density comparisons of other soilborne microorganisms between solarized and plastic covered (Katan, 1987).

Table 1. Effects of organic amendments and fertilizers on root-knot and other nematodes and IGR in cucumber in the field condition.

Treatments**	No. of eggs/J2*		Nematodes pop. In 200 ml		IGR***		
	ml. Soil	gr. root	Parasites	free-living	Height (cm.)	Fresh wt.(g.)	Dry wt.(g.)
(CNPk)	0.16C	0.39 c	311 ab	1466 a	55.6 a	629 a	92 a
(CYM)	0.24 C	2.18 bc	377 ab	1061 abc	52.4 ab	462 ab	76 ab
(FNPk)	0.33 C	3.44 bc	307 ab	1222 ab	45.3 abc	629 a	89 a
(FYM)	0.66 bc	6.79 abc	296 ab	844 bcd	43.1 bc	392 b	53 bcd
(GNPK)	0.72 bc	5.80 abc	155 abc	1005 abc	40.7 bc	509 ab	71 abc
(G)	1.41 abc	9.13 abc	466 ab	566 dc	39.0 c	457 ab	47 dc
(CO)	1.49 abc	10.90 abc	444 ab	944 bc	42.1 bc	524 ab	53 bcd
(N)	1.49 abc	14.49 ab	477 ab	550 dc	36.0 c	394 b	37 d
(P)	2.08 ab	15.01 ab	444 ab	733 bcd	36.4 c	444 ab	45 dc
(K)	2.08 ab	17.42 a	443 ab	544 dc	34.9 c	448 ab	42 d
(C)	3.19 a	17.68 a	699 a	377 d	33.0 c	345 b	34 d

-Values followed by the same letters are not significantly different (P=0.05)

*- The number of eggs and larvae of root-knot nematodes were 807.63 (4.03/g.soil), parasitic 520.70 and free-livings 445.54/200ml. of soil before the experiments.

** - CNPK= Integration of poultry manure (40t/ha.) and NPK (500kg./ha-each); CYM= poultry manure (40t/ha.); FNPk=Integration of Farm manure (60t/ha.) and NPK, FYM= Farm manure (60t/ha.), CNPK= Integration of cabbage waste leaves (40t/ha.) and NPK, ; G=Waste cabbage leaves, CO= Compost (40t/ha.) ; N=Urea (500kg/ha.); P=Ammonium phosphate(500kg/ha.); K=Potassium sulphate (500 gk/ha.)and C= Control.

*** - Increased Growth response.

Table 2. Effects of *Paecilomyces lilacinus* on the growth parameters of tomato and nematode indexes (*Meloidogyne javanica*).

Treatments	Plant parameters			Nematode indexes		
	Length (cm)	fresh weight (g)	dry weight (g)	GI	EMI	Infected eggs (%)
Control	69.0 a	41.8 a	6.5 a	0	0	0
<i>M. javanica</i>	46.0 e	25.0 c	2.5 c	5	5	0
<i>P. lilacinus</i>	63.8 b	38.9 ab	6.0 a	0	0	0
Simultaneous inoculation						
<i>M. javanica</i> + <i>P. lilacinus</i>	59.3 c	35.7 b	4.8 b	2	1	68
Sequential inoculation						
<i>M. javanica</i> + <i>P. lilacinus</i> *	48.6 d	28.3 c	2.8 c	4	4	55
<i>P. lilacinus</i> + <i>M. javanica</i> **	59.3 c	36.8 b	5.1 b	2	1	72
L.S.D.P = 0.05	1.1	4.3	1.02			

GI= Gall index EMI= Egg mass index

*= *M. javanica* preceded *P. lilacinus* by one week**= *P. lilacinus* preceded *M. javanica* by one week**Table 3.** The Pearson correlation coefficient of plant parameters and nematode indexes

Parameters	Plant length	Plant fresh weight	Plant dry weight	Gall index	Egg mass index	Infected eggs
Plant length	1.000	0.992**	0.993**	-0.977	-0.968	-0.170
Plant fresh weight		1.000	0.991**	-0.975**	-0.985**	-0.067
Plant dry weight			1.000	-0.985	-0.978**	-0.178
Gall index				1.000	0.970**	0.211
Egg mass index					1.000	0.006
Infected eggs						1.000

**- Correlation is significant at the 0.01 level (2- tailed).

Table 4. Determination of increase/decrease in infection of root-knot nematodes on cucumber roots and total nematode populations in the soil.

Treatments	Root-knot nematodes on roots total nematode populations in the 250 ml soil								
	Egg-mass index (Mean)			Parasite*			Free living **		
	Site 1	Site 2	Mean	Site 1	Site 2	Mean	Site 1	Site 2	Mean
Solarization	2.33ab	0.36a	1.34ab	44.33c	136.00b	90.16b	750b	394a	572a
Farm yard manure	1.76a	0.73a	1.24ab	120.00b	77.66b	98.83b	8..b	777b	805a
Solarization+Farm									
Yard manure	0.66a	0.30a	0.48a	0.00d	133.33b	66.66b	1466	433a	949a
Control	3.53b	2.06a	2.79b	170.33a	462.00a	316.00a	750b	489a	

-In a column, the means followed by the same letter are not significantly different at the 5 % level, according to Duncan Multiple Range Test (DMRT).

*-The parasitic nematodes were to be the genus, *Aphelenchoides*, *Helicotylenchus*, *Heterodera*, *Paratylenchus*, *Tylenchus*.**- The free living nematodes were to be the genus, *Aphelenchus*, *Cephalobus*, *Rhabditis*.

In the field experiments, soil treatment with full recommended doses of manure alone by our application methods did not reduce nematode population densities as much as solarization. Plus manure. Manure treated soil without solar heating, however, increased the control of nematodes over solarization alone. No information was obtained that would suggest significant synergistic action when solarization and manuring were combined. Studies shown that the nematicidal efficacy of manuring was increased when treated soil was covered by plastic film. The application of large volumes of water to soil is necessary for the optimum effect of soil solarization. However, the efficacy of manure in very moist soil is probably increased. The effect of irrigation following with 1.3-D has been studied (Katan, 1987) That practice was found to result in leaching of the fumigant down from the placement zone, increasing the depth of control, but reducing nematode control near the soil surface. Since maximal reduction of nematode population densities following solarization was usually near the soil surface, some downward movement of an added manure might be beneficial to the efficacy of the combined treatments.

Whether or not soil solarization alone is a cost-effective method of eliminating nematodes from soil, was not determined. A successful nematicide should theoretically eradicate nematodes, partially. The benefit health and growth gained by partial reduction of phytoparasitic nematodes in soil likewise was determined: correlation coefficients between reduction of nematodes and plant growth in the field were significant for any of these experiments. The data from existing orchard sites were not indicative of satisfactory postplant nematode control, possibly due to protection afforded to nematodes by living roots in the soil during solarization. Solarization as a postplant treatment has been shown to be effective against *Verticillium* wilt in pistachio groves (Katan, 1987); Lopez & Blanco, 2001). Although control of phytoparasitic nematodes was satisfactory near the soil surface, population density reductions decreased with increasing soil depth. These findings are consistent with others employing hot water treatment of soil to eliminate phytoparasitic nematodes. Previous studies (Stapleton & Heald, 1991) have reported effective control of specific nematodes by soil solarization throughout crop growing seasons, while others have reported ineffective control. This study, while not including any field experiments where plant-parasitic nematodes were likely to be the limiting factor of plant growth. Resulted in examples of both good and poor nematode control. Therefore, increases of plant growth reported after solarization cannot be attributed solely to reduction of nematode numbers. Additional data is needed on specific crop nematode interactions to define the limits and extent of control in the field.

The use of manure with solarization significantly increased the degree of nematode control in these experiments. In addition, increased plant growth responses were usually numerically greatest, when the two treatments were combined. Due to the relatively high cost of treating soil by solarization plus manure, studies on the cost effectiveness of these treatments are needed with adaptable cropping systems. Soil solarization with or without an added manure, would especially lend itself to several cropping situations. Treatment during a summer fallow prior to fall planting: of shallow soils or prior to shallow-rooted crops: where phytoparasitic nematodes (eg. cyst nematodes) are not deeply distributed in soil: or where control of a wide range of pathogens and or pests is desired (fungi, bacteria, nematodes, soil borne insects, and weed seeds), may prove to be economically advantageous where climatically applicable.

Present study demonstrate that solarization plus manuring of the soil provides adequate control of *M.javanica* and *M. incognita* eggs, free or in masses, at various depths after about 30 days of treatment, even in the less heated areas. These results are in agreement with those reported for the use of solarization of confined volumes of substrate for the control of plant parasitic nematodes (Giblin-Davis & Verkade, 1988; Stapleton *et al.*, 1999). Free eggs and egg masses both serve as inocula of *Meloidogyne* spp. in nursery substrates. Therefore, the efficacy of solarization for disinfestations must be assessed on both types of inoculums. The gelatinous matrix

aggregating *Meloidogyne* egg masses protects against desiccation (Orion, 1995) and other stress factors, such as freezing (Vrain, 1978), high temperatures (Daulton & Nusbaum, 1961), microbial parasitism (Orion & Kritzman, 1991), enzymatic degradation (Punja & Zhang, 1993) and synthetic nematicides (Mojtahedi *et al.*, 1991). Data from the study reported here showed that the gelatinous matrix protected egg masses at 20 cm depth in nonsolarized treatments only. Egg masses did not determine a differential survival for eggs located at the same depth in nonsolarized soil, thus suggesting that solarization plus manuring may be used as an appropriate control method. Also, these results are in agreement with those reported by Walker (.1962), where 48°C for a time period longer than 6 min was shown to be the thermal death threshold of eggs and egg masses of *Meloidogyne* spp., as well as those reported by Gokte & Mathur (1995). Soil solarization was particularly suitable for the control of soilborne pathogens, e.g. *Verticillium dahliae* (Melero- Vara *et al.*, 1995; Lopez-Escudero & Blanco-Lopez, 2001). In the present study, mean daily air temperature was rather similar in both sites, suggesting comparable environmental conditions in both the years. (Lopez- Escudero & Blanco-Lopez, 2001), and higher than those obtained at similar soil depths in Texas (Heald & Robinson, 1987), northern India (Gaur & Dhingra, 1991) and central northern Chile (Herrera *et al.*, 1999). In conclusion, solarization in summer is appropriate for optimizing production of *Meloidogyne* plants under the conditions at Isfahan and other similar parts of Iran.

Plant growth: Tomato plants inoculated with *M. javanica* showed significant reduction in their growth. Plant length and fresh and dry weights were significantly poor ($P= 0.05$) in comparison to uninoculated control. When tomato plants were inoculated with *P. lilacinus*, there was no significant difference in length and fresh and dry weights of the plants in comparison to uninoculated control. In simultaneous inoculation of *P. lilacinus* and *M. javanica*, plant length did not differ ($P= 0.05$) from control. When compared to plants inoculated with *M. javanica* alone, the plant length was significantly greater. When *P. lilacinus* was preceded *M. javanica* by one week, plant lengths did not differ significantly from control. But, when *M. javanica* preceded *P. lilacinus*, significant reduction occurred and the length did not differ from plants inoculated with *M. javanica* alone (Table 3). There is a high correlation ($P=0.01$) between plant length (pl) and nematode indexes (Table 3), as regression also shows a linear relationship as in the following model.

$$Y_{pl} = 66.4 - 1.14 GI - 2.94 EMI - 0.02 IE \quad R^2_{adjusted} = 91 \%$$

The fresh and dry weights of plants in various treatments showed similar trend for length. Significant reduction occurred in fresh and dry weights due to infection of *M. javanica*. Inoculation of *P. lilacinus* did not cause adverse effect on fresh and dry weights of plants. When *M. javanica* and *P. lilacinus* were inoculated simultaneously, fresh and dry weights of plants were significantly greater than plants inoculated with *M. javanica* alone and the weights did not differ significantly from control. In sequential inoculations, when *M. javanica* was inoculated one week prior to *P. lilacinus*, fresh and dry weights of plants did not differ from plants inoculated with *M. javanica* alone. On the other hand, when *P. lilacinus* preceded *M. javanica*, fresh and dry weights were significantly greater than in plants inoculated with *M. javanica* alone or *M. javanica* followed by *P. lilacinus* (Table. 2). There is also a high correlation between fresh (p_{fw}) and dry weights (p_{dw}) and nematode indexes ($P=0.01$) (Table 2&3), and a high linear relationship as in the following models.

$$Y_{p_{fw}} = 40.34 - 1.39 GI - 1.68 EMI + 0.005 IE \quad R^2_{adjusted} = 94 \%$$

$$Y_{p_{dw}} = 6.25 + 0.0002 GI - 0.75 EMI - 0.008 IE \quad R^2_{adjusted} = 97 \%$$

Root-galling and eggmass production: Inoculation of *P. lilacinus* reduced root-galling and eggmass production of the nematode as indicated by GI and EMI values. In simultaneous inoculation of *M. javanica* and *P. lilacinus* GI / EMI were 2/1 in comparison to 5/5 in *M. javanica* inoculated plants. Similar reduction in GI and EMI values were observed, when *P. lilacinus*

preceded *M. javanica* in sequential inoculation. In other sequential inoculation, when *P. lilacinus* followed *M. javanica* GI / EMI were slightly reduced (4/4) (Table 1).

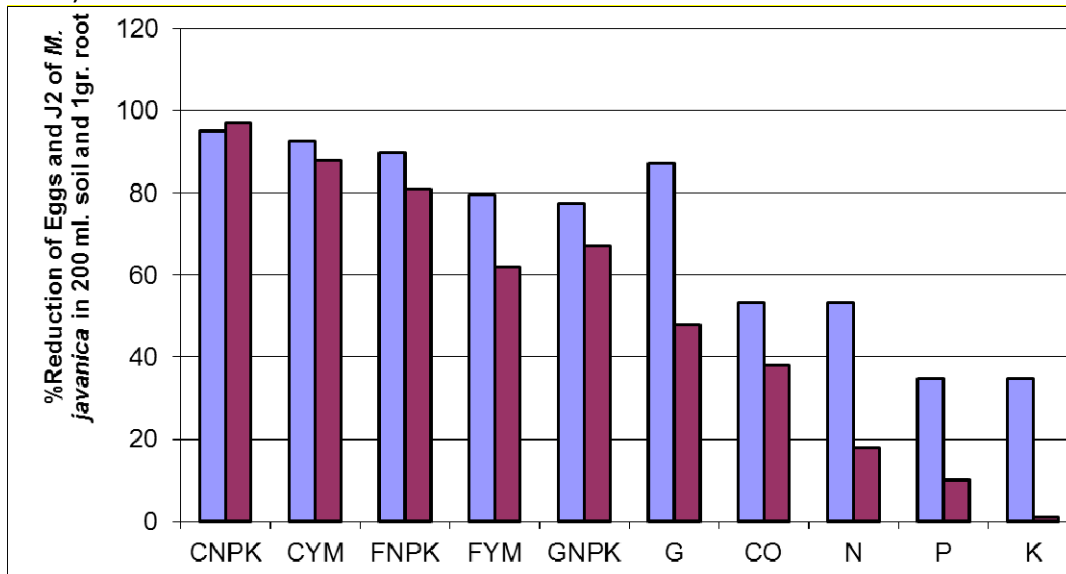
Infection of eggs: In all the treatments, where *M. javanica* and *P. lilacinus* were added simultaneously or sequentially, a large number of eggs were infected with *P. lilacinus*. Highest percentage of infected eggs (72%) was found, when *P. lilacinus* was added earlier to *M. javanica*. It was followed by the treatment, where both were added simultaneously (68%). Lowest percentage of infected eggs (55%) was noticed when *M. javanica* was followed by *P. lilacinus* in sequential inoculation.

Infected eggs contained mycelium inside as well as over their surface. Most of the infected eggs were devoid of juveniles. In some eggs, juveniles were present, but showed various degree of deformity and abnormal development. A number of juveniles that emerged from eggs were infected and showed mycelial growth over their body.

The roots of tomato plants were also tested in the treatments, in which the fungus *P. lilacinus* were inoculated and the fungal hyphae were never detected within the roots, though occasionally arose from the root surface as a protectent.

The Pearson's correlation coefficient of plant parameters and nematode indexes (Table 2) showed a very high significant correlations ($p= 0.01$), and results of regression analysis indicated that, GI and EMI had the most effects on plant parameters. Cluster analysis classified the treatments according to plant parameters and nematode indexes into two distinct groups, in which simultaneous and sequential inoculations were placed in a group and the rest in another group (Fig. 1). *M. javanica* readily infected tomato cv. Pusa Ruby, retarded its growth and reduced fresh and dry weight of the plants. In simultaneous inoculations, the adverse effects of *M. javanica* were greatly reduced and plant growth was as good as uninoculated plants. Apparently, *P. lilacinus* was effective in suppressing *M. javanica*, but application timing was important. The statistical analysis also showed that, GI and EMI having a very high linear relationships on plant parameters. Insignificant galling and eggmass production indicated that, the fungus was effective in reducing the resultant population of *M. javanica*. This proves the capacity of *P. lilacinus* as a biocontrol agent of *M. javanica*. The performance of plants in relation to root-galling and eggmass production was significantly better in simultaneous inoculation or in inoculation, where *P. lilacinus* preceded *M. javanica*. Prior inoculation of *M. javanica* followed by *P. lilacinus* was not that effective. This variation indicated towards application timing of *P. lilacinus*. *P. lilacinus* is an egg parasite (Jatala, 1986). Its presence in the rhizosphere of roots at the time of penetration may reduce the number of juveniles that could ingress the roots. This finding is in agreement with the statement of other workers, that *P. lilacinus* colonises the root and protect the root surface from the root knot nematodes attack (Holland, *et al.*, 2001). It also reduced the number of viable eggs and juveniles of the second generation during the experimental period. There is also a very high significant ($p= 0.01$) correlation between the plant parameters and nematode indexes (Table 3). Therefore, it is plausible to expect that, presence of *P. lilacinus* before attack of the nematode would offer greater protection to plants. *P. lilacinus* a saprophytic soil-inhabitant is not expected to cause any harm to plant roots in general and is not a plant endophyte, as was true in these trails too. But, when *M. javanica* eggs, egg masses and juveniles were present, it attacked and destroyed them to a great extent (Fig. 2 & 3), thereby ameliorating the plant growth. Though, primarily an egg parasite, it attacks juveniles of root-knot and other nematodes as well (Jatala, 1986; Sterling, 1991; Sikora, 1992). It is clear that, fungal hyphae of *P. lilacinus* penetrate eggshells of *M. javanica* with enzymes and pressure following the formation of a simple appressorium. The entire contents of the egg are then used as a food resource by the fungus, completely destroying the embryo/larva in the process. Eggs containing embryos or larvae can become infected by the fungus (Alamgir khan *et al.*, 1997).

There are also reports on effectiveness of *P. lilacinus* biproducts; MeloCon WG (Bioact 251), indicating the equivalent results to Vapam in controlling root knot nematodes (*M. javanica*) in tomato and cucumber fields (Schenck, 2004). For any microbial biocontrol agents, its level of specificity to the target pathogen is important. For *P. lilacinus* to be used successfully against plant parasitic nematodes, it should not parasitise other organisms in the soil environment to which it is applied. In confirming this statement, the genetic relationships of many isolates of *P. lilacinus* were explored, using the technique of long primer random amplified polymorphic DNA analysis. A large amount of variation was detected among the tested, with no correlation between site of isolation and genetic relatedness. But, none caused any mortality to the soil invertebrates (Holland, *et al.*, 2001).



- CNPK= Integration of poultry manure (40t/ha.) and NPK (500kg./ha-each); CYM+ poultry manure (40t/ha.); FNPk=Integration of Farm manure (60t/ha.) and NPK, FYM= Farm manure (60t/ha.), CNPK= Integration of cabbage leaves waste (40t/ha.) and NPK, ; G= Cabbage leaves waste, CO= Compost (40t/ha.) ; N=Urea (500kg/ha.); P=Ammonium phosphate(500kg/ha.); K=Potassium sulphate (500 kg/ha.) and C= Control.

Fig 5. percent increase/decrease in infection of root-knot nematodes on cucumber roots in roots and soil.

In the present studies, it was found to penetrate the eggs and develop profusely inside and over the eggs completely inhibiting juvenile development. Some juveniles were attacked and deformed. This happened also when *M. javanica* preceded *P. lilacinus* in sequential inoculation. A high percentage (55%) of egg masses were infected, though the root-galling and egg mass production were not poor, primarily because the fungus was not present in the soil at the time the juvenile penetrated the roots. Consequentially, plant growth suffered, but the population growth of the nematode was suppressed (Table 2&3).

It is also important to know that, what will happen to a biocontrol agent after it has been applied into the soil. The persistence of *P. lilacinus* after application to the soil has been estimated and results indicated that, levels fall after application until after a few months, it is difficult to isolate the fungus from the soil. This suggests that, *P. lilacinus* will only cause a short-term disturbance to the soil biota and will not have any long-term effect as other biocontrol agents do (Kerry & De Leig, 1992; Lacky *et al.*, 1994). Therefore, the fungus is a potential biocontrol agent attacking the infective units of the root-knot nematodes, checking the initiation of the disease and reducing the inoculum potential for successive crops. This two-pronged effect of the fungus is its most significant attribute.

Among the 25 medicinal plant species grown in Dastgerd, 21 species, namely pot marigold, horehound, starflower, borage, klamathweed, absinthium, meadow salsify, camomile, garden thyme, greater burdock, common sage, Jerusalem artichoke, Pelargonium, rosemary, milk thistle,

lemon balm, madder, yarrow, common lavender, alehoof and celery were infected by *M. javanica*, Out the infested plants, pot marigold, klamathweed, absinthium, camomile, garden thyme, common sage, rosemary, lemon balm and celery were severely infected as they had 100 galls per root and a gall index of 5. Instead no infection was observed on the roots of valerian, yarrow, spearmint and fennel.

In Najafabad station, out of twenty medicinal plants, five species, namely common rue, Syrian beancaper, great burdock, pot marigold and hempseed were infected by *M. javanica* with great burdock being the most severely infected (more than 100 galls per root and gall index of 5) and Syrian beancaper the least infected (one gall and gall index 1). There were no galls on the roots of other plants, nor were eggs and juveniles extracted from them, indicating that these medicinal plants are non host for *M. javanica*. Although there was no gall formation on the roots of common rue, nevertheless, they contained eggs and second stage juveniles.

Razzaz Hashemi (2005) obtained almost the similar results and has already reported infection of pot marigold by *M. javanica* in Ghazvin province. In our study, spearmint, *Mentha spicata*, was not infected by *M. javanica*, while Barooti (1987) reported infection of *Menta loglolia* by *M. javanica* and Akhiani *et al.* (1972) that of *M. javanica* on spearmint but without mentioning the species. Also, similar results were obtained with the two different yarrow species, which showed various levels of sensitivity to *M. javanica*.

Earlier studies have shown that hempseed was infected by *M. javanica* in Naeen in Isfahan province (Akhiani *et al.*, 1972) and pot marigold by the same species in Ghazvin regions (Razzaz Hashemi, 2006).

Out of thirteen, seven medicinal plants species, namely common lavender, yarrow, wormseed, black mulberry, terracotta gazania and century plant were infected by *M. incognita* in Kashan station, despite eggs and juveniles of this nematode were not extracted from any of these plants. Common lavender with 58 galls and a gall index 4 had the most infection rate, while yarrow and century plant with 2 galls and gall index 1 had the least infection by *M. incognita*.

Lack of infection yarrow (*Achillea millefolium* L.) by *M. incognita* and poor infection by *M. javanica* (one gall and gall index 1) was observed in Dastgerd in Isfahan (Table II). This would indicate that this medicinal plant is a weak host for these nematodes. Maciel and Ferraz (1996) also reported yarrow (*A. millefolium* L.) as a poor host for *M. javanica* and *M. incognita*. Common lavender and species of wormseed were identified as very good hosts for *M. incognita* in Kashan. There are other studies reporting infection of *M. incognita* race 3 on common lavender and Absinthium (Walker, 1995). Although Fennel (*Foeniculum vulgare* L.) was infected by *M. incognita* race 3, this cultivated plant was not considered as a sensitive host to this nematode in Kashan.

The differences in the host status of the same medicinal plants to root-knot nematodes in different areas, can be due to differences in nematode species and race (or virulence group) and environmental conditions. In this study, most of the cultivated medicinal plants were identified as new hosts for *M. javanica* and *M. incognita* in Iran. Knowledge on the host status of the mentioned medicinal plants is important to design appropriate production programmers, especially for crop rotations in order to avoid and or reduce the nematodes population, after a well planning program.

References

- Barranco D, 1999. Variedades y patrones. In: Barranco D, Fernandez-Escobar R, Rallo L, eds. El Cultivo Del Olivo. Madrid, Spain: Ediciones Mundi-Prensa, 63-89.
- Caballero JM, del Rio C, 1999. Metodos de multiplicacion. In: Barranco D, Fernandez-Escobar R, Rallo L, eds. El Cultivo Del Olivo. Madrid, Spain: Ediciones Mundi-Prensa. 91-115,
- Campbell CL, Madden LV, 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. New York, USA: John Wiley.

- Daulton AC, Nusbaum CJ, 1961. The effect of soil temperature on the survival of the root-knot nematodes *Meloidogyne javanica* and *M. hapla*. *Nematologica* 6, 280-94.
- FAO, 2002. Faostat Database Collections. (<http://apps.fao.org/page/collections>).
- Gaur HS, Dhingra A, 1991. Management of *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchus reniformis* in nursery-beds by soil solarization and organic soil amendment. *Revue de Nematologie* 14,189-95.
- Giblin-Davis RM, Verkade SD, 1988. Solarization for nematode disinfestation of small volumes of soil. *Annals of Applied Nematology* 2,41-5.
- Gokte N, Mathur VK, 1995. Eradication of root-knot nematodes from grapevine rootstocks by thermal therapy. *Nematologica* 41,269-71.
- Gornez KA, Gornez AA, 1984. Statistical Procedures for Agricultural Research. New York, USA: John Wiley.
- Heald CM, Robinson AF, 1987. Effects of soil solarization on *Rotylenchulus reniformis* in the Lower Rio Grande Valley of Texas. *Journal of Nematology* 19, 93-103.
- Herrera R, Aballay E, MontealegreJR, 1999. Efecto de una solarizacion prolongada en la sobrevivencia del nematodo del nudo (*Meloidogyne incognita*) en un suelo con monocultivo de tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Fitopatologia* 34,63-8.
- Hussey RS, Barker KR, 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57, 1025-8.
- Katan J, 1980. Solar pasteurization of soils for disease control: status and prospects. *Plant Disease* 64, 450-4.
- Katan J, 1981. Solar heating (solarization) of the soil for control of soilborne pests. *Annual Review of Phytopathology* 19, 211-36.
- Katan J, 1987. Soil solarization. In: Chet I, ed. *Innovative Approaches to Plant Disease Control*. New York, USA: John Wiley, 77-105.
- Lamberti F, Baines RC, 1969. Pathogenicity of four species of *Meloidogyne* on three varieties of olive trees. *Journal of Nematology* 1, 111-5.
- Lopez-Escudero FJ, Blanco-Lopez MA, 2001. Effect of a single or double soil solarization to control *Verticillium* wilt in established olive orchards in Spain. *Plant Disease* 85,489-96.
- Melero-Vara JM, Blanco-Lopez MA, Bejarano-Alcazar J, 1995. Control of *Verticillium* wilt of cotton by means of soil solarization and tolerant cultivars in southern Spain. *Plant Pathology* 44,250-60.
- Mojtahedi H, Santo GS, Pinkei-tonJN, 1991. Efficacy of ethoprop on *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi* and enhanced biodegradation in soil. *Journal of Nematology* 23,372-9.
- Nico AI, Jimenez-Diaz RM, Castillo P, 2003. Host suitability of the olive cultivars Arbequina and Picual for plant parasitic nematodes. *Journal of Nematology* 35, 29-34.
- Nico AI, Rapoport HF, Jimenez-Diaz RM, Castillo P, 2002. Incidence and population density of plant-parasitic nematodes associated with olive planting stocks at nurseries in southern Spain. *Plant Disease* 86,1075-9.
- Orion D, 1995. Structure and function of the root-knot (*Meloidogyne* spp.) gelatinous matrix. *Nematologica* 41, 395-7.
- Orion D, Kritzman G, 1991. Antimicrobial activity of *Meloidogyne javanica* gelatinous matrix. *Revue de Nematologie* 14,481-3.
- Punja ZK, Zhang Y, 1993. Plant chitinases and their roles in resistance to fungal diseases. *Journal of Nematology* 25, 526~0.
- Raio A, Zoina A, Moore LW, 1997. The effect of solar heating of soil on natural and inoculated agrobacteria. *Plant Pathology* 46,320-8.
- Stapleton JJ, Ferguson L, McKenry MV, Doughty DS, Stapleton SC, 1999. Using solarization to disinfest soil for olive nursery production. In: Metzidakis IT, Voyiatzis DG, eds. *Proceedings of*

- III Congress of the International Society of Horticultural Sciences, International Symposium on Olive Growing. Leuven, Belgium: International Society of Horticultural Sciences, 589-91.
- Stapleton JJ, Heald CM, 1991. Management of phytoparasitic nematodes by soil solarization. In: Katan J, DeVay JE, eds. Soil Solarization. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 51-9.
- Sutter EG, 1994. Olive cultivars and propagation. In: Ferguson L, Sibbett GS, Martin GC, eds. Olive Production Manual. University of California Publication 3353. Oakland, USA: University of California, 23-9.
- Vrain TC, 1978. Influence of chilling and freezing temperatures on infectivity of *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne hapla*. Journal of Nematology 10, 177-80.
- Walker JT, 1962, The sensitivity of larvae and eggs of *Meloidogyne* species to hot-water treatments. Nematologica 7,19-24.
- Whitehead AG, 1998. Plant Nematode Control. Wallingford, UK: CAB International.

Научное издание

**Материалы 10 Международного нематологического симпозиума
с элементами школы по теоретической и прикладной нематологии для
молодых ученых, аспирантов и студентов**

Сборник статей

Печатается по решению Ученого совета
Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии

Издано в авторской редакции

Сдано в печать 29.05.2013 г. Формат 60x84^{1/8}
Бумага офсетная. Гарнитура Calibri. Печать офсетная.
Уч.-изд. л. 10. Усл. печ. л. 13,0. Тираж 150. Изд. № 204
Заказ № 000

Издательство РС-Дизайн
2-Донской проезд, д. 10, стр. 3 121170 Москва,
Телефон:+7 495 926-29-52
Факс:+7 495 708-48-52
pc-press@yandex.ru