

VILNIUS UNIVERSITY
NATURE RESEARCH CENTRE

Rasa Čepulytė-Rakauskienė

POTATO CYST NEMATODES *GLOBODERA ROSTOCHIENSIS* AND *GLOBODERA
PALLIDA*, AND THEIR CHEMOECOLOGICAL INTERACTIONS WITH THE HOST
PLANT

Summary of Doctoral Dissertation
Biomedical sciences, Ecology and Environmental science (03 B)

Vilnius, 2012

The research was carried out at Vilnius University in 2007–2011

Research supervisor:

Prof. Dr Habil. Vincas Būda (Vilnius University, Biomedical sciences, Ecology and Environmental science – 03 B)

The defense of the doctoral dissertation is held at the Council of scientific filed of Ecology and Environmental science at Vilnius University:

Chairman:

Prof. Dr Sigitas Podėnas (Vilnius University, Biomedical sciences, Ecology and Environmental science – 03 B)

Members:

Prof. Dr Habil. Izolda Pašakinskienė (Vilnius University, Biomedical sciences, Ecology and Environmental science – 03 B)

Prof. Dr Habil. Jonas Rimantas Stonis (Lithuanian University of Educational Sciences, Biomedical sciences, Zoology – 05 B)

Dr Raimondas Mozūraitis (Royal Institute of Technology, Sweden, Biomedical sciences, Ecology and Environmental science – 03 B)

Dr Rita Butkienė (National Research Institute for Physical Science and Technology Center, Physical sciences, Chemistry – 03 P)

Opponents:

Prof. Dr Habil. Eugenija Kupčinskienė (Vytautas Magnus University, Biomedical sciences, Ecology and Environmental science – 03 B)

Dr Laima Blažytė-Čereškienė (Institute of Ecology Nature Research Centre, Biomedical sciences, Ecology and Environmental science – 03 B)

The defense of the doctoral dissertation will be held during an open session of the Council in Didžioji auditorium of the Faculty of Natural Sciences of Vilnius University at 2 p. m. on 24th of April, 2012.

Address: M. K. Čiurlionio Str. 21/27, LT-03101 Vilnius-115, Lithuania.

The abstract of the doctoral dissertation was distributed on __ of March, 2012.

The dissertation is available at the libraries of Vilnius University and Nature Research Centre.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GAMTOS TYRIMŲ CENTRAS

Rasa Čepulytė-Rakauskienė

BULVINIAI CISTINIAI NEMATODAI *GLOBODERA ROSTOCHIENSIS* IR
GLOBODERA PALLIDA, JŲ CHEMOEKOLOGINIŲ SAŲVEIKŲ SU AUGALU
ŠEIMININKU TYRIMAS

Daktaro disertacijos santrauka
Biomedicinos mokslai, Ekologija ir aplinkotyra (03 B)

Vilnius, 2012

Disertacija rengta 2007–2011 metais Vilniaus universitete

Mokslinis vadovas:

prof. habil. dr. Vincas Būda (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03 B)

Disertacija ginama Vilniaus universiteto Ekologijos ir aplinkotyros mokslų krypties taryboje:

Pirmininkas:

prof. dr. Sigitas Podėnas (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03 B)

Nariai:

prof. habil. dr. Izolda Pašakinskienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03 B)

prof. habil. dr. Jonas Rimantas Stonis (Lietuvos Edukologijos universitetas, biomedicinos mokslai, zoologija – 05 B)

dr. Raimondas Mozūraitis (Karališkasis technologijų institutas, Švedija, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03 B)

dr. Rita Butkienė (Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Fizinių ir technologijos mokslų centras, fiziniai mokslai, chemija – 03 P)

Oponentai:

prof. habil. dr. Eugenija Kupčinskienė (Vytauto Didžiojo universitetas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03 B)

dr. Laima Blažytė-Čereškienė (Gamtos tyrimų centro Ekologijos institutas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03 B)

Disertacija bus ginama viešame tarybos posėdyje, kuris įvyks 2012 m. balandžio 24 d. 14 val. Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakulteto Didžiojoje auditorijoje.
Adresas: M. K. Čiurlionio g. 21/27, LT-03101, Vilnius-115, Lietuva.

Disertacijos santrauka išplatinta 2012 m. kovo __ d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto ir Gamtos tyrimų centro bibliotekose.

INTRODUCTION

Relevance of the research. Potato (*Solanum tuberosum*) is one of the most economically important plant species in the world. The production of it is the fourth after wheat, maize and rice (Hawkes, 1999). In 2007, over 19 million hectares of cultivable land was planted with potatoes and the harvest of potato tubers estimated 325 million tonnes (FAO, 2008). In addition to human consumption, over 200 different products are produced from potato tubers: ethyl alcohol, adhesives, plastics, acetone, starch, glucose and others.

Golden *Globodera rostochiensis* and pale *Globodera pallida* potato cyst nematodes are one of the most important solanaceous plant (Solanaceae) pests. Considerable yield loss is caused by the following: nematode extreme specialization, close relationship to the host plant, ability to spread and unique adaptation to remain in the soil for a long time without the host plant. It has been estimated that approximately 2t/ha of potatoes are lost for every 20 eggs/g soil (Brown, 1969). Up to 80 % of the crop can be lost when nematode populations are raised to very high levels by repeated potato cultivation. Currently, both species of potato cyst nematodes are included in the Worlds, European and Lithuanian quarantine pest¹ lists (CD, 2000). In Lithuania, State Plant Service under the Ministry of Agriculture is responsible for the import and export as well as observation and liquidation of local hotspots of quarantine pests including *G. rostochiensis* and *G. pallida*.

Identification of potato cyst nematode species by morphological features is time consuming and requires precise work skills as well as special equipment. Moreover, identification of *G. rostochiensis* and *G. pallida* is exposed to morphological similarities and overlapping morphometric measurements between species (Baldwin, Mundo-Ocampo, 1991; Brzeski, 1998; Manduric, Anderson, 2004; Dobosz *et al.*, 2006). In fact, many types of molecular methods are used for more accurate identification of potato cyst nematodes. One of the most commonly used method is polymerase chain reaction with species-specific DNA primers (Fullaondo *et al.*, 1999; Zouhar *et al.*, 2000; Pylypenko *et al.*, 2005). Hence, it is important to apply modern molecular techniques in order to allow reliable identification of potato cyst nematode species in Lithuania.

In favorable environmental conditions, potato cyst nematode second-stage juveniles (J2) hatch from eggs (first-stage juveniles are developing within the eggs) and migrate towards host plant roots (Weischer, 1959). The most important nematode chemoreceptors are paired chemoreceptors – amphids located in the cephalic region of nematodes. Amphids are responsible for sensing chemical stimuli and orienting nematodes in the soil environment (Jones *et al.*, 1994). Potato roots release chemical compounds into the soil which attract nematodes (Weischer, 1959; Clarke, Hennessy, 1984; Devine, Jones, 2003). Unfortunately, none of the potato released active compound (or compounds) is identified yet. For this reason, detailed examination of nematode behavior as well as analysis of bioactive chemical compounds released by potato roots is essential. Identifying the chemical compounds released by potato roots may lead to the

¹ A pest of potential economic importance to the area endangered thereby and not yet present there, or present but not widely distributed and being officially controlled (FAO, 2007).

ability of disturbing normal nematode behavior. In addition, inhibition of nematode amphid activities may also disrupt normal nematode behavior. Accordingly, this knowledge could be applied for biological control of potato cyst nematodes, *i. e.* controlling the spread and reducing damage to potato crops. Hence, deeper knowledge of nematode chemoeological interactions is not only important economically but also fundamentally.

The aim of the research was to establish composition and prevalence of potato cyst nematode species in Lithuania, as well as characteristics of potato cyst nematode chemoeological interactions with the host plant.

The following tasks were set to achieve this aim:

- 1) to isolate and identify potato cyst nematode *G. rostochiensis* and *G. pallida* species from soil samples collected from all 10 counties of Lithuania using morphological and molecular methods, and to determine potato cyst nematode prevalence in Lithuania;
- 2) to determine the toxicity of potato root released non specific metabolite linalool to potato cyst nematodes;
- 3) to determine the impact of potato root released non specific metabolite linalool and specific metabolite α -solanine on the behavior of potato cyst nematodes;
- 4) to carry out comparative analysis of behavioral reactions of *G. rostochiensis* and *G. pallida* associated with responses to host plant;
- 5) to determine if aqueous solution of zinc sulphate inhibits potato cyst nematode behavioral reactions associated with the host plant released chemical compounds;
- 6) to assess if potato roots in the growth phase that is most attractive to potato cyst nematodes release characteristic chemical compounds.

The novelty of the research:

- 1) for the first time in Lithuania, using precise modern molecular technique, it was confirmed that the quarantine nematode *G. pallida* is not present, and the prevalence of *G. rostochiensis* was evaluated;
- 2) the original test was designed to study behavior of potato cyst nematodes;
- 3) for the first time, host plant released chemical compounds attractive to potato cyst nematodes were identified;
- 4) for the first time, it was evaluated that aqueous solution of zinc sulphate inhibit *G. pallida* behavioral reactions to attractive chemical compound;
- 5) for the first time, it was evaluated that in the attractive to nematodes growth phase potato roots release specific chemical compounds.

Scientific and practical significance. The results of the research extend the scarce knowledge about potato cyst nematodes in the field of chemical ecology and behavior. They are important and can be applied:

- 1) to prevent the proliferation of potato cyst nematodes;
- 2) to search for kairomones affecting potato cyst nematodes;
- 3) to search for bioactive chemical compounds in potato root diffusate;
- 4) to select biologically active stimuli for the analysis of potato cyst nematode chemosensory responses using electrophysiological or other techniques;
- 5) to develop environmentally friendly control tools against potato cyst nematodes.

Defended statements:

- 1) only one species of quarantine potato cyst nematode – *G. rostochiensis* is prevalent in Lithuania, *G. pallida* is absent;
- 2) chemical stimuli, both non specific (characteristic to many plant species) and specific (characteristic to a host plant), are important in potato cyst nematode and host plant interactions;
- 3) the responses of morphologically and ecologically closely related potato cyst nematode species to chemical compounds are different.

Approbation of the results. Dissertation results were presented at the 6th scientific conference of Vilnius University "Science in Faculty of Natural Sciences (Vilnius University Botanical Garden, Kairėnai, 2010); at the "26th and 27th Annual Meetings of International Society of Chemical Ecology" (Tours, France, 2010; British Columbia, Canada, 2011). Research results were published in five publications: three scientific articles (one of which is included in the Institute for Scientific Information (ISI WOS) databases with the *impact* factor) and two conference thesis.

Structure of dissertation. The dissertation is presented in the following chapters: Introduction, Literature Review, Material and Methods, Results and Discussion (three subchapters), Conclusions, References (286 sources), List of Publications Where Dissertation Results Were Published and Appendices. The dissertation covers 104 pages; it contains 8 tables and 15 figures. The text of the dissertation is written in Lithuanian with the summary in English.

Acknowledgements. I am sincerely grateful to my scientific supervisor, Professor Dr Habil. Vincas Būda and to all colleagues from Nature Research Centre Institute of Ecology Laboratory of Chemical Ecology and Behavior for the guidance and support showed me throughout my dissertation studies. I am truly thankful to Dr Loreta Taluntytė for the opportunity to carry out the research in Phytosanitary Research Laboratory (State Plant Service under the Ministry of Agriculture). I would also like to thank all my colleagues from this laboratory for the support, comprehension and help, especially to Dr Vaida Jogaitė (former co-worker) for assistance in the application of molecular biology techniques to potato cyst nematodes. I am also thankful to Julius Kühn Institute (Germany) and National Plant Protection Service (France) for the research material. I am very grateful to Silvia Budavičiūtė (University of Helsinki) for access to the research articles as well as to Joseph R. Laroza (University of California) for linguistic improvements on dissertation summary. Lastly, I would like to thank Lithuanian State Science and Studies Foundation for the provided scholarships as well as to Vilnius University for the opportunity to pursue doctoral studies.

LITERATURE REVIEW

This chapter reviews the biology, main morphological features of potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923) Behrens, 1975 and *Globodera pallida* (Stone, 1973) Behrens, 1975 as well as chemoreception of plant parasitic nematodes. Damage potato cyst nematodes induce to potato plants and control tools against these pests is reviewed as well. In addition, potato released chemical compounds, plant parasitic nematode chemoecological interactions (main methods to investigate these interactions, as well as chemical compounds influencing behavior of the

nematodes) and known compounds inhibiting activities of nematode chemoreceptors are discussed.

MATERIAL AND METHODS

Material

a) Potato cyst nematodes for identification of the species. Potato cyst nematode cysts for identification of the species were collected from 2815 soil samples collected from 556 ha field area of all 10 counties of Lithuania – Alytus, Kaunas, Klaipėda, Marijampolė, Panevėžys, Šiauliai, Tauragė, Telšiai, Utena, and Vilnius. Soil samples were collected according to standard procedure and brought to Phytosanitary Research Laboratory (division) (PRL) of State Plant Service (former State Plant Protection Service) under the Ministry of Agriculture for the nematological research. Information about the soil type and the preceding crop was not collected and neither analyzed.

Cysts from soil samples at PRL were washed on filter paper by flotation method (using Schuiling centrifuge, Walker & Zonen, The Netherlands) and identified to the species level using morphological features. Due to morphological similarities and overlapping morphometric measurements between *G. rostochiensis* and *G. pallida*, DNA polymerase chain reaction (PCR) with species-specific primers was carried out for more accurate identification.

b) Potato cyst nematodes for behavioral research. *Globodera rostochiensis* Ro1 (*Ecosse* population) and *G. pallida* Pa2 (*Kalle* population) cysts (supplied by Julius Kühn Institute, Germany) were kept moist at 21 °C for one week. After cysts were crushed and hatched J2s/unhatched eggs were washed by a small amount of distilled water (~50 µL) to Petri dishes (separate for each species) with its bottoms covered by a 1–2 mm thick layer of 1.5 % agar (Carl Roth, Karlsruhe, Germany). In a few hours, water was absorbed and actively moving J2s were used for testing.

Only a small amount of cysts for potato cyst nematode behavioral tests were supplied by Julius Kühn Institute. For this reason, nematodes were reproduced in pots with potatoes (*Solanum tuberosum*) of a variety *Désirée* (France), which is susceptible to potato cyst nematodes in PRL greenhouse chamber used for growing quarantine pests.

Methods

Identification of potato cyst nematode species

a) Identification of nematode species by morphological features. Temporal slides of *Globodera* spp. cyst anal–vulvar cuts, eggs and J2s (if applicable) were made and analyzed under light microscope (magnification 40 × to 1000 ×, BX51, Olympus, Japan) connected to a video documentation system consisting of a digital camera (Nikon Coolpix 4500, Japan) connected to a computer. Images and measures of nematodes were made (Image Pro Plus 3, Media Cybernetics, USA) and species were identified by morphological features.

b) Identification of nematode species by PCR. DNA extraction. Before DNA extraction, cysts from one sample were immersed in distilled water for 24 hours. Following immersion, cysts were transferred to 1.5 mL tubes with 180 µL of lysis solution and crushed with a pestle. Extracted DNA was kept at – 20 °C. DNA amplification. At the beginning of the investigation, DNA primers and PCR conditions according to Fullaondo *et al.* (1999) were used: 5'GCAAGCCCAGCGTCAGCAAC3',

5'GAACATCAACCTCCTATCGG3' – for *G. rostochiensis*;
5'TGTCCATTCTCTCCACCAG3', 5'CCGCTTCCCCATTGCTTTCG3' – for
G. pallida. Preparation of DNA amplification mixtures using these primers is a time
consuming process which requires many materials. For this reason, DNA primers and
PCR conditions according to Pylypenko *et al.* (2005) were used: PITS r3
5'AGCGCAGACATGCCGCAA3' and the forward 5'CGTAACAAGGTAGCTGTA3'
primer for *G. rostochiensis*; sPITS p4 5'ACAACAGCAATCGTTCGAG3' and the forward
5'CGTAACAAGGTAGCTGTA3' – for *G. pallida*. A mixture for DNA amplification
consisting of 25 µL was prepared, containing: 1 × *Taq* buffer with KCl (Thermo
Scientific, Lithuania); 1.5 mM MgCl₂ (Thermo Scientific, Lithuania); 0.2 mM mix of
dNTP (Thermo Scientific, Lithuania); 1 unit of recombinant *Taq* DNA polymerase
(Thermo Scientific, Lithuania); 1.5 µM PITS primer r3 (Biomass, Germany); 1.5 µM
sPITS primer p4 (Biomass, Germany); 1.5 µM forward primer (Biomass, Germany);
5 µL (approximately 20 ng) of cyst DNA; DEPC H₂O (Roth, Germany) was added to the
mixture to obtain final volume of 25 µL; DEPC H₂O was used as a negative control,
G. rostochiensis and *G. pallida* (National Plant Protection Service Nematology
Laboratory, France) – as a positive. Amplification was carried out in thermocycler
(Mastercycler Personal 5332, Eppendorf, Germany). Electrophoresis. DNA amplification
products by adding bromophenol blue (0.3 µg/µL) were analyzed in the horizontal
electrophoresis in 1.5 % agarose gel with ethidium bromide (0.5 µg/µL) 1 × TAE buffer,
in 72 V (6 V/cm). DNA amplification products were analyzed under the UV light, the
length of DNA fragment was determined by the length of DNA marker – GeneRuler™
100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, Lithuania). Gel images were documentation by
gel documentation system (EASY Win 32, Herolab, Germany).

Preparation of host (potato) and non host (sugar beet) root diffusate

In the initial stage of potato cyst nematode behavior analysis, it was important to
determine and evaluate differences between potato cyst nematode responses to aqueous
potato root diffusate, which attracts potato cyst nematodes (Weischer, 1959; Clarke,
Hennessy, 1984; Devine, Jones, 2003) and water (control), which is neutral (neither
attracts nor repulses) using statistical methods. Additionally, an aqueous non host plant
belonging to Chenopodiaceae family – sugar beet root diffusate (which does not attract
potato cyst nematodes) (Rolfe *et al.*, 2000) was chosen to evaluate statistical differences
between nematode responses in this test. Three potato tubers of variety *Désirée*
(separately) and 15 sprouted seedlings (all together) of sugar beet (*Beta vulgaris*) of
variety *Belmonte* (Denmark) were planted in 400 mL pots filled with autoclaved sand
and maintained under 60 % relative humidity, 14:10 hours light: dark and 22 °C in the
PRL greenhouse. After three weeks, potato tubers were pulled out and intact roots were
rinsed with distilled water to remove sand particles. The same process was repeated after
seven weeks with the removal of sand from intact roots of sugar beets. Potato tuber roots
(separately) and sugar beet roots (together) were immersed in 100 mL distilled water for
24 hours in greenhouse. Obtained aqueous diffusates were kept at +4 °C.

Extraction of potato root diffusate

Before chromatographic analysis, potato root released chemical compounds had
to be microextracted from substrate (sand). For this reason, it was important to test if *n*-
hexane (purity 99 %, Fluka, Germany) (an often used solvent for the extraction of
chemical compounds) is suitable to extract these (potato released) chemical compounds

from the substrate. Fifty microliters of aqueous potato root diffusate were extracted with 50 mL of *n*-hexane once for five minutes. *n*-Hexane extract was concentrated to dryness at room temperature and 3 mL of distilled water than were added. The extract than was used in nematode behavioral tests which revealed the suitability of *n*-hexane to extract potato root released chemical compounds.

Quantification of linalool content in potato root diffusate

In the initial stage of searching for which chemical compounds attract potato cyst nematodes, low molecular weight chemical compound – linalool (3.7-dimethyl-1.6-octadien-3-ol; molecular weight 154.25), released by potato roots, was chosen. Light chemical compounds move faster in soil environment, thus, soil organisms in this case – nematodes can sense it from further distances. Linalool content in potato root diffusate used in nematode behavioral tests was evaluated by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. One microliter of aqueous potato root diffusate and 0.3 g of NaCl were added to 10 mL flask. Flask was tightly covered with three layers of aluminum foil and placed in water thermostat at 40 °C. After 15 minutes microextraction thread was inserted in to headspace of flask (65 mm, PDMS-DVB, Supelco, USA). The extraction was performed for 60 minutes at 40 °C. Sorbed compounds were analyzed by gas chromatography (Clarus 500, Perkin Elmer, USA) with FID, column – DB-Wax (30 m × 0.25 mm, sorbent layer thickness – 0.25 µm, Restek, USA). Temperature of evaporator and detector was 240 °C. Temperature of column thermostat was programmed as follows: maintained for two minutes to 40 °C, raised up to 200 °C by 5 °C/min., raised up to 240 °C by 10 °C/min., and maintained for two minutes. The amount of linalool was calculated using external standard method.

Potato cyst nematode behavioral tests

a) Behavioral test to host (potato) and non host (sugar beet) plant root diffusate. A filter paper disk 5 mm in diameter (Schleicher & Schuell MicroScience, Niedersachsen, Germany), was placed on a centre of a Petri dish (32 mm in diameter) with its bottom covered by 1–2 mm thick film of 1.5 % agar (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) (Fig. 1). Fourteen microliters of aqueous potato root diffusate or controls – water or aqueous sugar beet root diffusate were spread on a filter paper (Fig. 1). After two hours, paper was removed and four J2s were placed at equal distances from each other and 1.1 cm from Petri dish centre. After 30 and 60 minutes nematode position was recorded under binocular microscope (magnification 7.5 × to 112.5 ×, Nikon SMZ 1500, Japan). Nematode movement towards chemical stimulus source was counted as a positive response to a chemical compound, and movement in the opposite direction – as a negative response. Four nematodes in five replicates were tested; test was repeated six times to evaluate the effect of potato root diffusate and controls. Attraction to a chemical compound was calculated by comparing relative attractiveness of nematodes moving toward chemical stimulus and the total number of nematodes used in the test; the number was expressed as a percentage.

b) Behavioral test to *n*-hexane extracted potato root diffusate. The test was carried out as indicated in the behavioral test to host and non host root diffusate (Fig. 1). Aqueous potato root diffusate and distilled water were used as controls. After 30 and 60 minutes, nematode position was recorded. Four nematodes in five replicates were tested; test was repeated six times to evaluate the effect of *n*-hexane extracted potato root diffusate and controls.

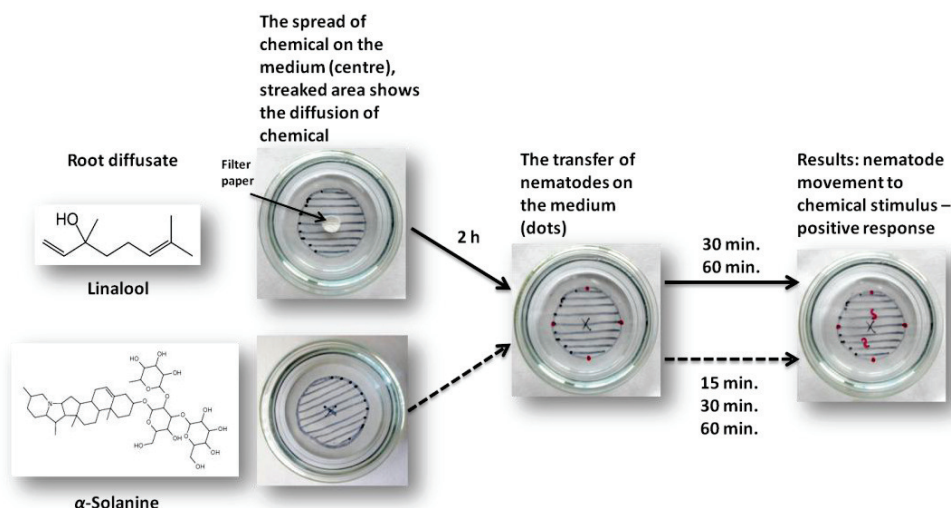


Fig. 1. Scheme of potato cyst nematode behavioral tests to aqueous and *n*-hexane extracted host (potato) and aqueous non host (sugar beet) root diffusate as well as to synthetic chemical compounds (linalool and α -solanine) (Images of Petri dishes – authors).

1 pav. Bulvinių cistinių nematodų elgseninių reakcijų į vandenines ir *n*-heksanu ekstrahuotas augalo šeimininko (bulvių) ir vandenines ne šeimininko (cukrinių runkelių) šaknų nuolpovas bei sintetinius cheminius junginius (linalolį ir α -solaniną) schema (Petri lėkštelių nuotraukos – autorės).

c) Linalool toxicity test. Linalool is known as either attractive compound to few species of plant parasitic nematodes (Hong, Sommer, 2006; Hong *et al.*, 2008; Köllner *et al.*, 2008), or toxic to other nematode species (Chatterjee *et al.*, 1982; Malik *et al.*, 1987; Sangwan *et al.*, 1990; Leela *et al.*, 1992; Walker, Melin, 1996; Ibrahim *et al.*, 2006; Kong *et al.*, 2007) living in the soil. For this reason linalool toxicity test was carried out first.

Fifty *G. rostochiensis* and *G. pallida* J2s were placed in a separate watch glass containing 2 μ L of distilled water. Than 2 mL of linalool (a racemic mixture, purity – 97 %, Sigma–Aldrich, Germany) of 1×10^{-3} M concentration or distilled water (control) were added to watch glasses. Mortality of J2s was recorded daily for 12 days under binocular microscope (magnification $7.5 \times$ to $112.5 \times$, Nikon SMZ 1500, Japan). Mortality percentages were counted from four replicates for each nematode species.

d) Behavioral test to linalool. Tests with some modifications that are listed below were carried out as indicated in the behavioral test to host and non host plant root diffusate. Linalool solutions in distilled water of 1×10^0 M to 1×10^{-6} M concentrations were prepared. One microliter of either known linalool concentration or control (distilled water) was spread on the filter paper disk (Fig. 1). Aqueous potato root diffusate was chosen as another control. This test was carried out as indicated in the behavioral test to host and non host root diffusate (Fig. 1). After two hours, filter paper disk was removed and four J2s were placed on a Petri dish. After 30 and 60 minutes, nematode position was recorded. Four nematodes in five replicates were tested; test was repeated six times to evaluate the effect of different linalool concentrations and controls. Behavioral responses of potato cyst nematode J2s to distilled water was considered and counted as neutral and equaled to 50 %.

e) Behavioral test to α -solanine. Tests with some modifications that are listed below were carried out as indicated in the behavioral test to host and non host plant root

diffusate. α -Solanine (purity about 95 %, Sigma–Aldrich, Germany) – specific potato secondary metabolite (review: Eich, 2008) solutions in absolute ethanol (purity 99 %) of 1×10^{-4} M to 1×10^{-7} M concentrations were prepared. One microliter known α -solanine concentration or control (absolute ethanol) was spread on the Petri dish center (no filter paper was used in this test) and right after this four J2s were placed (Fig. 1). As another control, aqueous potato root diffusate was chosen. This test was carried out as indicated in the behavioral test to host and non host root diffusate (Fig. 1). After 15; 30 and 60 minute intervals, nematode position was recorded. Four nematodes in five replicates were tested; test was repeated 12 times to evaluate the effect of different α -solanine concentrations and controls. Behavioral responses of potato cyst nematode J2s to ethanol was considered and counted as neutral and equaled to 50 %.

f) Nematode chemoreceptor activity inhibition test. It is known that zinc sulphate inhibits receptor activities of either: mammalian olfaction (Alberts, 1974) as well as insect olfaction and taste (Bakakrishnan, Pollack, 1997; Groh *et al.*, 2002; Baužienė, Būda, 2010). For this reason zinc sulphate was tested with potato cyst nematodes. Similar with chemical properties to zinc sulphate, divalent metal salt magnesium sulphate and distilled water were selected as test controls. Due to anatomical, physiological and ecological similarities of *G. rostochiensis* and *G. pallida*, only one species – *G. pallida*, was selected for this study.

Watch glass was filled up with 50 μ L of $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ aqueous solution of 3 mM concentration. Twenty *G. pallida* J2 nematodes were immersed in the solution and stored for intervals of 2; 5; 15 or 30 minutes. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ aqueous solution of 3 mM concentration or distilled water were used as controls. After nematodes were transferred to Petri dishes with α -solanine where behavioral test was carried out as described in the biotest to α -solanine; results were recorded after 15 minutes. Four nematodes in five replicates were tested; the test was repeated six times.

g) Statistical analysis of behavioral test data. Data was analyzed by χ^2 -test using software Statistica 6.0 (StatSoft, Tulsa, USA).

Microextraction and chromatographical analysis of potato root released chemical compounds

a) Microextraction of potato root released chemical compounds. Four pairs of silicone tubes (0.31 mm (outer) \times 0.64 mm (inner) diameter, Helix Medical Europe KG, Germany) of 1 m long were prepared. Syringe (5 mL, Momina Krepsot, Bulgaria) needle was inserted in one end of the tube. Three potato tubers of a variety *Désirée* were planted in autoclaved sand in 1 L glass pots with drainage at the bottom. Silicone tubes were placed in sand as follows: one tube was placed 5 cm above a bottom of a pot, the other – next to potato tuber. Both ends of each tube were left outside the pot. Pots were wrapped with aluminum foil to avoid sunlight. Plants were grown at PRL greenhouse under 60 % relative humidity, 14:10 hours light: dark and at 19 °C. A sand-filled pot lacking potato plant was used as a control.

There is no data when potato roots release attractive to potato cyst nematodes chemical compounds. It is known that the highest percentage of potato cyst nematodes hatch three weeks after potato emergence (Farrer, Phillips, 1983; Rawsthorne, Brodie, 1986). After hatching J2s in 6–11 days reach potato plant roots (Robinson *et al.*, 1987). Hence, it is assumed that three weeks after potato emergence potatoes release chemical compounds that attract potato cyst nematode J2s. For this reason, every week for six

weeks (starting from potato emergence), 500 μ L of *n*-hexane were syringed through each of the tube. Collected extracts were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further analysis.

b) Analysis of potato root released chemical compounds by gas chromatography. Potato root released chemical compounds were analyzed by gas chromatography (Clarus 500, Perkin Elmer, USA) with flame ionization detector (FID), column – DB–Wax (30 m \times 0.25 mm, sorbent layer thickness – 0.25 μ k, Restek, USA). Temperature of detector and injector was $250\text{ }^{\circ}\text{C}$. Temperature of thermostat column was programmed as follows: initial – $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ was kept for two minutes, after $7\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. raised up to $160\text{ }^{\circ}\text{C}$, kept for two minutes and raised up $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. to $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ and than kept for seven minutes. Velocity of the carrying gas (H_2) – $1.5\text{ mL}/\text{min}$.; injection volume – $3\text{ }\mu\text{L}$.

RESULTS AND DISCUSSION

Identification of potato cyst nematode species of Lithuanian population by PCR

Globodera rostochiensis was identified based on morphological features of 2419 cysts from 2815 soil samples collected from all 10 counties of Lithuania (Alytus, Kaunas, Klaipėda, Marijampolė, Panevėžys, Šiauliai, Taragė, Telšiai, Utena and Vilnius). No *G. pallida* cysts were identified. From 187 cysts described as *G. rostochiensis* (from all counties of Lithuania) DNA was extracted and analyzed by PCR. PCR analysis, according to Pylypenko *et al.* (2005) recommended PCR primers and conditions, showed that DNA amplification products were specific to *G. rostochiensis* – 423 bp, while no *G. pallida* species-specific DNA amplification products – 254 bp were obtained (Fig. 2).

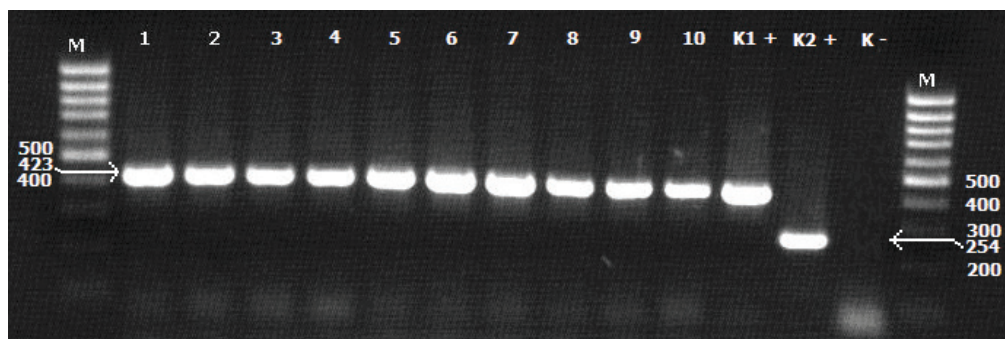


Fig. 2. DNA polymerase chain reaction (PCR) products of *Globodera rostochiensis* cysts. Cysts were collected from 10 counties of Lithuania: 1 – Alytus; 2 – Kaunas; 3 – Klaipėda; 4 – Marijampolė; 5 – Panevėžys; 6 – Šiauliai; 7 – Tauragė; 8 – Telšiai; 9 – Utena; 10 – Vilnius. K1 + – positive control – *G. rostochiensis*; K2 + – positive control – *Globodera pallida*; K– – negative control – DEPC H_2O ; M – DNA marker length. Arrows indicate DNA amplification product mark. PCR primers and conditions were according to Pylypenko *et al.* (2005).

2 pav. *Globodera rostochiensis* cistų DNR polimerazinės grandininės reakcijos (PGR) produktai. Cistos surinktos iš 10 Lietuvos apskričių: 1 – Alytaus; 2 – Kauno; 3 – Klaipėdos; 4 – Marijampolės; 5 – Panevėžio; 6 – Šiaulių; 7 – Tauragės; 8 – Telšių; 9 – Utenos; 10 – Vilniaus. K1+ – teigiama *G. rostochiensis* kontrolė; K2+ – teigiama *Globodera pallida* kontrolė; K– – neigiama kontrolė – DEPC H_2O . M – atitinkamas DNR ilgio žymuo. Rodyklės rodo DNR amplifikacijos produktų žymę. PGR pradmenys ir sąlygos pagal Pylypenko *et al.* (2005).

At the beginning of this investigation, potato cyst nematode DNA PCR was carried out according to Fullaondo *et al.* (1999) recommended PCR primers and conditions. DNA amplification products were also specific to *G. rostochiensis* – 315 bp (Fig. 3) and no *G. pallida* species-specific DNA amplification products – 798 bp (data is not shown in Fig. 3) were obtained.

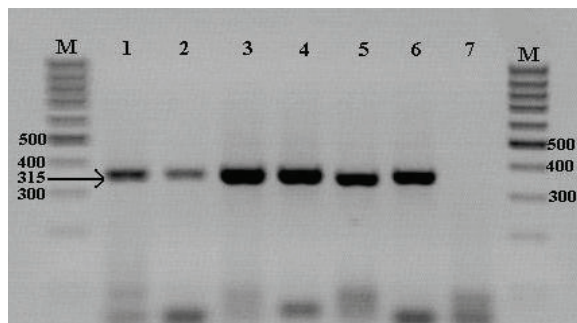


Fig. 3. DNA polymerase chain reaction (PCR) products of *Globodera rostochiensis* cysts. Cysts were collected from five counties of Lithuania: 1 – Kaunas; 2 – Panevėžys; 3 – Telšiai; 4 – Utena; 5 – Vilnius; 6 – positive control – *G. rostochiensis*; 7 – negative control – DEPC H₂O; M – DNA marker length. Arrow indicates DNA amplification product mark. PCR primers and conditions were according to Fullaondo *et al.* (1999).

3 pav. *Globodera rostochiensis* cistų DNR polimerazinės grandininės reakcijos (PGR) produktai. Cistos surinktos iš penkių Lietuvos apskričių: 1 – Kauno; 2 – Panevėžio; 3 – Telšių; 4 – Utenos; 5 – Vilniaus; 6 – teigiama *G. rostochiensis* kontrolė; 7 – neigiama kontrolė – DEPC H₂O; M – atitinkamas DNR ilgio žymuo. Rodyklė rodo DNR amplifikacijos produktų žymę. PGR pradmenys ir sąlygos pagal Fullaondo *et al.* (1999).

DNA amplification was successful only for 80 cysts (42.8%) out of 187 cysts examined (Table 1).

Table 1. Results of polymerase chain reaction (PCR) analysis of potato cyst nematodes collected from all 10 counties of Lithuania.

1 lentelė. Bulvinių cistinių nematodų, surinktų iš visų 10 Lietuvos apskričių, polimerazinės grandininės reakcijos (PCR) analizės rezultatai.

County of Lithuania	Cysts analyzed by PCR, n (%)		
	Total	Positive results	
		<i>G. rostochiensis</i>	<i>G. pallida</i>
Alytus	12	8 (66.7)	0
Kaunas	12	1 (8.3)	0
Klaipėda	15	7 (46.7)	0
Marijampolė	26	10 (38.5)	0
Panevėžys	5	3 (60)	0
Šiauliai	10	5 (50)	0
Tauragė	32	16 (50)	0
Telšiai	19	4 (21)	0
Utena	18	13 (72.2)	0
Vilnius	38	13 (34.2)	0
Total	187	80 (42.8)	0

Reasoning for this is as follows: DNA levels in the examined samples could be too low (Fleming *et al.*, 1998); or examined cysts could be morphologically very similar to other often together with potato cyst nematodes in potato fields dwelling cyst nematode species. These are *Globodera achilleae*, which is parasitizing common yarrow (*Achillea millefolium*) and *Globodera artemisiae*, which is parasitizing common wormwood (*Artemisia vulgaris*). In Lithuania, it is possible that *G. pallida* was not detected due to well selected crop rotation and well implemented phytosanitary measures (Mastauskis, 1955; Кирьянова, 1963; Варшаловича, 1972; Klimakova *et al.*, 1983; VAAT, 1999–2007). In most European countries *G. pallida* is less common than *G. rostochiensis* (Smith *et al.*, 1997; Pylypenko *et al.*, 2005). Hence, this could be another reason why *G. pallida* was not detected in Lithuania. Currently many potato tubers and other plant production are imported to Lithuania from Germany, Holland and Sweden (Lukošiūtė, 2005) where *G. pallida* is already detected (Smith *et al.*, 1997). Recently this quarantine nematode species was detected in Ukraine (Pylypenko *et al.*, 2005). Thus, there is a strong probability of *G. pallida* may enter the Lithuanian territory and proliferate.

Chemoecological interactions of potato cyst nematodes

a) Response of nematodes to host (potato) and non host (sugar beet) plant root diffusate. Aqueous host plant – potato root diffusate was significantly more attractive to *G. rostochiensis* and *G. pallida* J2 nematodes than control – distilled water ($P < 0.05$) both after 30 and 60 minutes of nematode transfer to media with a chemical stimulus (Fig. 4).

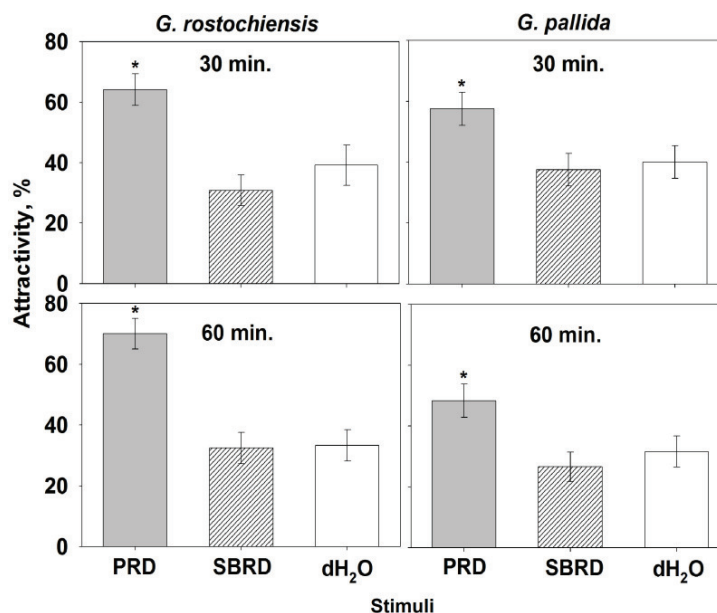


Fig. 4. Reaction of potato cyst nematodes to potato (PRD) and sugar beet (SBRD) root diffusate, and to distilled water (dH₂O) after 30 and 60 minutes of nematode transfer to media with a chemical stimulus. Asterisks above bars indicate statistically significant differences in responses comparing with reaction to distilled water (χ^2 -test, $P < 0.05$).

4 pav. Bulvinių cistinių nematodų reakcija į bulvių (PRD) ir cukrinių runkelių (SBRD) šaknų nuoplovas bei į distiliuotą vandenį (dH₂O) po 30 min. ir po 60 min. nuo nematodų užnešimo ant terpės su cheminiu stimulu. Žvaigždutės virš stulpelių rodo statistiškai patikimus reakcijų į stimulus skirtumus lyginant su reakcija į distiliuotą vandenį (χ^2 -testas, $P < 0,05$).

Potato root released chemical compounds were also significantly more attractive than non host – sugar beet root released ones ($P < 0.05$) after both result recording times (Fig. 4). This study confirms suitability of this behavioral test which is planned for a further search of chemical compounds attractive to potato cyst nematodes because testing of two known stimulus (which both attract and do not attract nematodes) in advance showed that the results were fully consistent with the expected.

b) The effect of linalool to potato cyst nematodes.

Toxicity test. In water, *G. rostochiensis* and *G. pallida* J2s survived for 12 days, *i. e.* during the period of observation with survival up to 99 %. In saturated linalool solution (1×10^{-3} M) during the same period survival of *G. rostochiensis* J2s was 95 ± 2.1 %, and that of *G. pallida* J2s was 97 ± 1.7 %. No statistically significant difference in J2 survival in linalool compared with water control was recorded. The highest concentration of linalool solution (saturated) had no toxic effect to J2 nematodes, therefore, lower concentrations were not tested. The results of this study suggest that linalool is not toxic to potato cyst nematode J2s.

Behavior. Linalool attracted J2s of both species of potato cyst nematodes – *G. rostochiensis* and *G. pallida* (Fig. 5). However, some interspecific behavioral differences were noted in response to linalool. Sensitivity to linalool by *G. rostochiensis* J2s was higher compared with that of *G. pallida* J2s (Fig. 5). The lowest concentration of linalool attractive to *G. rostochiensis* J2s was 1×10^{-4} M after 30 and 60 minutes of nematode transfer to media with a chemical stimulus; J2s exhibited similar response as to potato root diffusate ($P > 0.05$) (Fig. 5). However, a higher concentration of linalool, 1×10^{-2} M, was needed to evoke a positive response to *G. pallida* J2s after 30 minutes and 1×10^{-3} M after 60 minutes, and no significant statistical differences obtained compare to potato root diffusate ($P > 0,05$) (Fig. 5).

The range of linalool concentrations eliciting a positive response of potato cyst nematodes differed as well. *Globodera rostochiensis* J2s responded to linalool concentrations ranging from 1×10^{-2} M to 1×10^{-4} M after 30 and 60 minutes of nematode transfer to media with a chemical stimulus (Fig. 5). While *G. pallida* J2s responded to concentrations ranging from 1×10^{-1} M and 1×10^{-2} M after 30 minutes and 1×10^0 M to 1×10^{-3} M after 60 minutes. In addition, high concentrations of linalool (1×10^0 M; 1×10^{-1} M) did not elicit a positive response to *G. rostochiensis* J2s, as no statistically significant difference was found compared with water control ($P > 0.05$) after both result recording times (after 30 and 60 minutes). The reduced response at very high concentrations of an allelochemical has been reported previously (Diez, Dusenbery, 1989; Stamps, Linit, 1998). In *G. pallida* the same effect (loss of attractivity at higher concentrations) was absent.

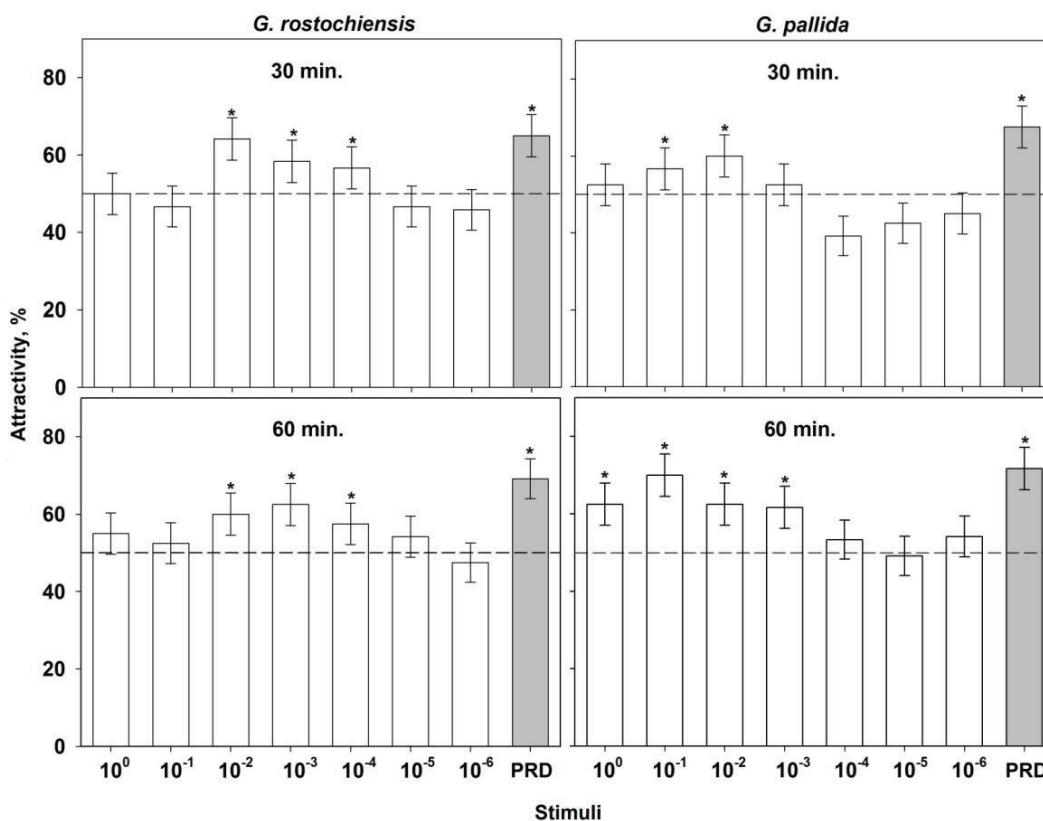


Fig. 5. Reaction of *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* to different concentrations (M) of linalool after 30 and 60 minutes of nematode transfer to media with a chemical stimulus. White columns indicate reaction to linalool, gray – to potato root diffusate (PRD). The dotted line indicates reaction to distilled water, asterisks above columns – statistically significant differences in responses compare with reaction to distilled water (χ^2 -test, $P < 0.05$).

5 pav. *Globodera rostochiensis* ir *Globodera pallida* reakcija į skirtingas linalolio koncentracijas (M) po 30 min. ir po 60 min. nuo nematodų užnešimo ant terpės su testuojama medžiaga. Balti stulpeliai žymi reakciją į linalolį, pilki – į bulvių šaknų nuoplovas (PRD). Punktyrinė linija žymi reakciją į distiliuotą vandenį, žvaigždutės virš stulpelių – statistiškai patikimus reakcijų į stimulus skirtumus lyginant su reakcija į distiliuotą vandenį (χ^2 -testas, $P < 0,05$).

Quantification of a content of linalool in potato root diffusate. Linalool concentration in potato root diffusate used in the behavioral test was 9.7×10^{-6} M (Fig. 6); three times lower than that attractive in the test. However, under natural conditions, roots could emit higher linalool concentrations compared with those obtained in potato root diffusate. Potato root diffusate making procedure included removal of sand by washing, thus leading to some loss of all chemicals on a root surface including linalool.

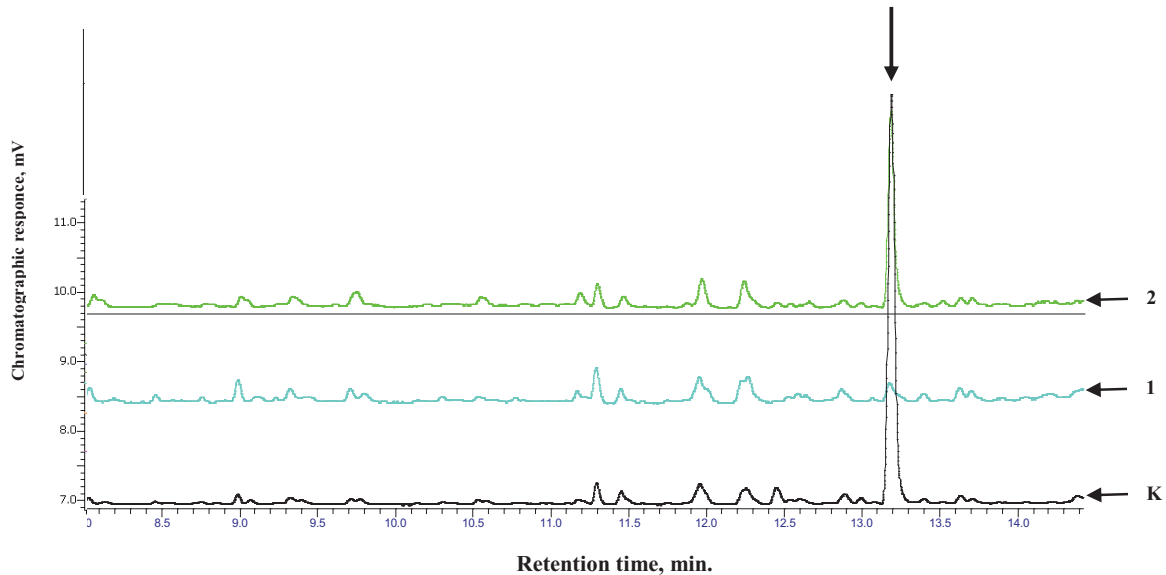


Fig. 6. Fragment of chromatogram of linalool from potato root diffusate. Linalool retention time ~13.2 min. (arrow). K – control – standard of linalool (8.7 ng/μL); 1 – sample I; 2 – sample II. Horizontal line between chromatograms shows position of chromatograms before the outspread of them using computer software (Total Crome Navigator–Clarus 500, Perkin Elmer, USA).

6 pav. Linalolio iš bulvių šaknų nuoplovų chromatogramos fragmentas. Linalolio sulaikymo laikas ~13,2 min. (rodyklė). K – kontrolė – linalolio standartas (8,7 ng/μL); 1 – I mėginys; 2 – II mėginys. Horizontali linija prie chromatogramų rodo chromatogramų padėtį iki jų išskleidimo kompiuterinės programos (Total Crome Navigator–Clarus 500, Perkin Elmer, JAV) pagalba.

After linalool toxicity test it was evaluated that linalool, unlike to other plant parasitic nematodes, was not toxic to potato cyst nematodes. Linalool was attractive both: to *G. rostochiensis* and *G. pallida* J2s. Despite the known chemical compounds that attract potato cyst nematode J2s (Rode, 1965; Evans, 1969), none of the plant origin compounds attractive to this nematode stage has been identified yet. Thus, linalool is the first compound of plant origin to elicit positive response in both potato cyst nematode species. Linalool is released by many plant species (Knudsen *et al.*, 1993). Hence, it could help nematodes to distinguish plants from non plants in the soil environment and may serve as a non specific attractant.

It is known that several fractions of potato root diffusate are attractive to potato cyst nematode J2s (Devine, Jones, 2003). Although no statistically significant differences were obtained between responses to potato root diffusate and linalool (Fig. 5), it may be that a mixture of chemicals released by potato roots is more attractive to potato cyst nematodes than a single compound – linalool. Hence, many other compounds in potato root diffusate could be involved in nematode attraction, thus, increasing response to host specificity.

c) Response of potato cyst nematodes to α-solanine. α-Solanine was attractive to *G. rostochiensis* and *G. pallida* J2s. Both potato cyst nematode species responded to the same α-solanine concentrations: 1×10^{-4} M and 1×10^{-5} M; the reaction significantly differed from that to the solvent – ethanol ($P < 0.05$) (Fig. 7). Besides, some interspecific differences were noted in nematode response to this chemical compound. *Globodera*

pallida responded quickly to α -solanine – after 15 minutes of nematode transfer to media with a chemical stimulus (Fig. 7). However, reaction to α -solanine was short; *i. e.* was absent after 30 and 60 minutes. *Globodera rostochiensis* responded slowly to the compound – after 30 and 60 minutes and the response lasted longer.

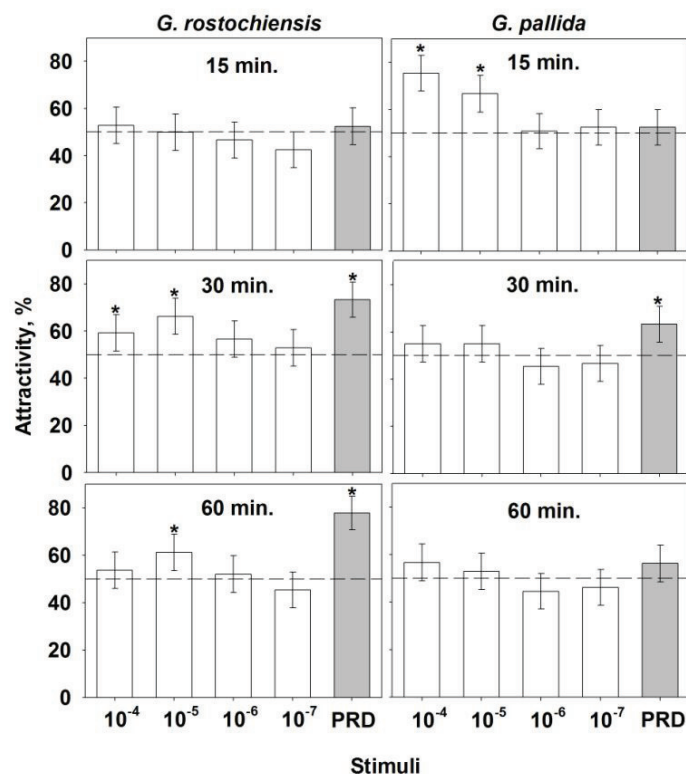


Fig 7. Reaction of *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* to different concentrations (M) of α -solanine after 15; 30 and 60 minutes of nematode transfer to media with a chemical stimulus. White columns indicate reaction to α -solanine, gray – to potato root diffusate (PRD). Dotted line indicates reaction to the solvent – ethanol, asterisks above the columns – statistically significant differences in responses compare with reaction to ethanol (χ^2 -test, $P < 0.05$).

7 pav. *Globodera rostochiensis* ir *Globodera pallida* reakcija į skirtingas α -solanino koncentracijas (M) po 15; 30 ir 60 min. nuo nematodų užnešimo ant terpės su tiriamu chemine medžiaga. Balti stulpeliai žymi reakciją į α -solaniną, pilki – į bulvių šaknų nuoplovas (PRD). Punktyrinė linija žymi reakciją į tirpiklį – etanolį, žvaigždutės virš stulpelių – statistškai patikimus reakcijų į stimulus skirtumus lyginant su reakcija į etanolį (χ^2 -testas, $P < 0,05$).

For the first time within this research, it was discovered, that α -solanine host plant – potato released in to soil environment specific secondary metabolite is attractive to both species of potato cyst nematodes. It is known that some fractions of potato root diffusate are attractive to *G. rostochiensis* and *G. pallida* J2s (Devine, Jones, 2003). Thus, many more compounds in potato root diffusate other than linalool (it's attractivity to potato cyst nematodes was revealed in our earlier research, Fig. 5) and α -solanine could be involved in nematode attraction.

d) Inhibition of potato cyst nematode chemoreceptor activity. Exposure of *G. pallida* J2 nematodes to 3 mM zinc sulphate aqueous solution inhibited nematode response to an attractive chemical compound – α -solanine. This zinc sulphate solution

effect endured the entire range of exposition interval – from two up to 30 minutes and statistically significantly differed from that of distilled water ($P < 0.05$) (Fig. 8). Short – two minute exposure to magnesium sulphate aqueous solution of 3 mM concentration inhibited *G. pallida* response to α -solanine as well (Fig. 8). This nematode response was significantly different ($P < 0.05$) from that to distilled water as well. After increased exposure to magnesium sulphate solution, an increase from five to 30 minutes, the inhibition effect of *G. pallida* disappeared, *i. e.* nematodes adapted to this salt solution effect. Such result could be explained by the effect of stress induced by environmental changes but not by a chemical compound. Nematodes accustomed to magnesium sulphate solution in longer exposure time and no residual effect was observed in nematode response to an attractive chemical compound (α -solanine).

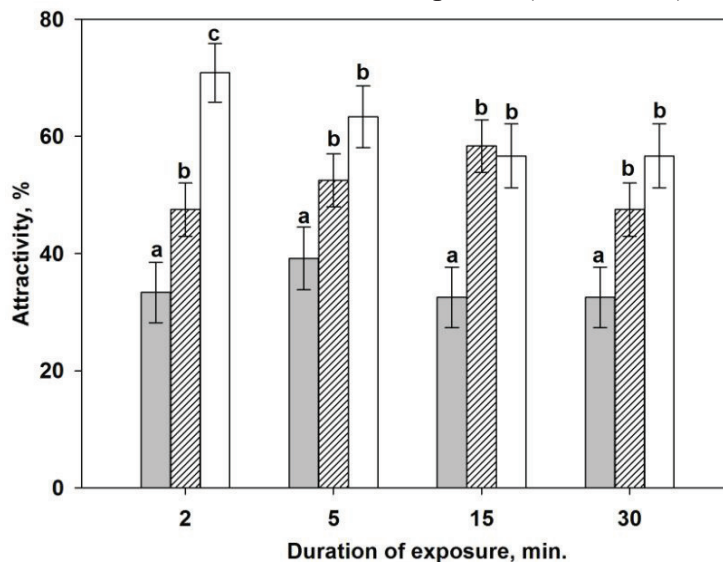


Fig. 8. Reaction of *Globodera pallida* to α -solanine under exposure of zinc sulphate (gray columns) and magnesium sulphate (streaked columns) aqueous solutions, and distilled water (white columns) depending on duration time; statistically significant differences in responses are denoted with different letters (a; b; c) (χ^2 -test, $P < 0.05$).

8 pav. *Globodera pallida* reakcija į α -solaniną po poveikio cinko sulfato (pilki stulpeliai) ir magnio sulfato (dryžuoti stulpeliai) vandeniniais tirpalais bei distiliuotu vandeniu (balti stulpeliai) priklausomai nuo poveikio trukmės. Statistiškai patikimai besiskiriančios atraktyvumo reikšmės pažymėtos skirtingomis raidėmis (a, b, c) (χ^2 -testas, $P < 0,05$).

For the first time, it was determined that zinc sulphate aqueous solution inhibits *G. pallida* response to attractive chemical compound – α -solanine. Compare to magnesium sulphate aqueous solution, zinc sulphate aqueous solution effectively disrupts normal nematode behavior to α -solanine. The inhibition effect is induced both: after short (2 minutes) and longer (from 5 up to 30 minutes) exposure to the salt solution. Due to the fact that potato cyst nematodes species are very close, it is assumed that zinc sulphate aqueous solution could also inhibit activities of *G. rostochiensis* chemoreceptors. Thus, we found that this inhibition effect of zinc sulphate aqueous solution is new and could be used in investigations of electrophysiology and behavior in field trials.

Analysis of potato root released chemical compounds

a) **Verification of suitability of a solvent to extract potato root released chemical compounds from the substrate by nematode behavioral test.** The results of *G. rostochiensis* and *G. pallida* behavioral test recorded after 30 and 60 minutes of nematode transfer to media with a chemical stimulus showed that *n*-hexane extracted potato root diffusate was attractive to both species of potato cyst nematode J2s (Fig. 9). This reaction was statistically significant from that to control – distilled water ($P < 0.05$). Non *n*-hexane extracted, *i. e.* aqueous potato root diffusate was also attractive to *G. rostochiensis* and *G. pallida* J2s (Fig. 9). Statistically significant differences were noted between reactions to aqueous potato root diffusate and distilled water in both response recording times (Fig. 9). No statistical differences between reactions to aqueous and *n*-hexane extracted potato root diffusate were recorded ($P > 0.05$) (Fig. 9), *i. e.* both aqueous and *n*-hexane extracted potato root diffusates were attractive to both species of potato cyst nematodes. Thus, behavioral tests proved that potato root released attractive to *G. rostochiensis* and *G. pallida* J2s chemical compounds can be extracted by *n*-hexane.

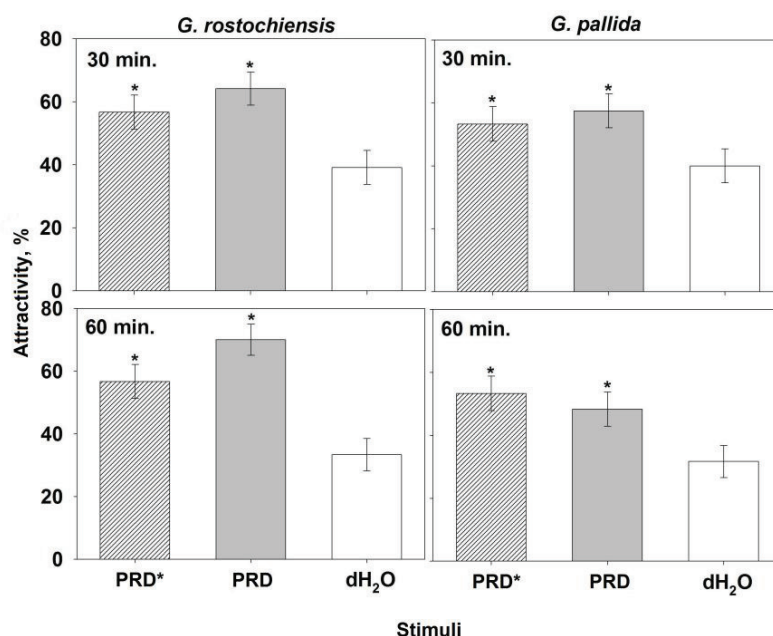


Fig. 9. Reaction of *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* to *n*-hexane extracted (PRD*) and aqueous (PRD) potato root diffusate, and to distilled water (dH₂O) after 30 and 60 minutes of nematode transfer to media with a chemical stimulus. Asterisks above the bars indicate statistically significant differences in responses compared with distilled water (χ^2 -test, $P < 0.05$).

9 pav. *Globodera rostochiensis* ir *Globodera pallida* reakcija į *n*-heksanu ekstrahuotas (PRD*) ir vandenines (PRD) bulvių šaknų nuoplovas bei į distiliuotą vandenį (dH₂O) po 30 min. ir po 60 min. nuo nematodų užnešimo ant terpės su cheminiu stimulu. Žvaigždutės virš stulpelių rodo statistiškai patikimus reakcijų į stimulus skirtumus lyginant su reakcija į distiliuotą vandenį (χ^2 -testas, $P < 0,05$).

b) **Analysis of potato root released chemical compounds by gas chromatography.** Comparative analysis of six week extracts of potato root released in to the substrate chemical compounds showed that among many same chemical compounds observed in 1–6 week chromatograms, extracts of 3–6 week revealed three compounds with the retention time of 28.4; 29.8 and 31.2 minutes (Fig. 10). During this

investigation potatoes emerged in the first week after planting. Therefore we assume that these three compounds already available three weeks after potato emergence could be assessed as potentially bioactive compounds influencing behavior of potato cyst nematode *G. rostochiensis* and *G. pallida* J2s.

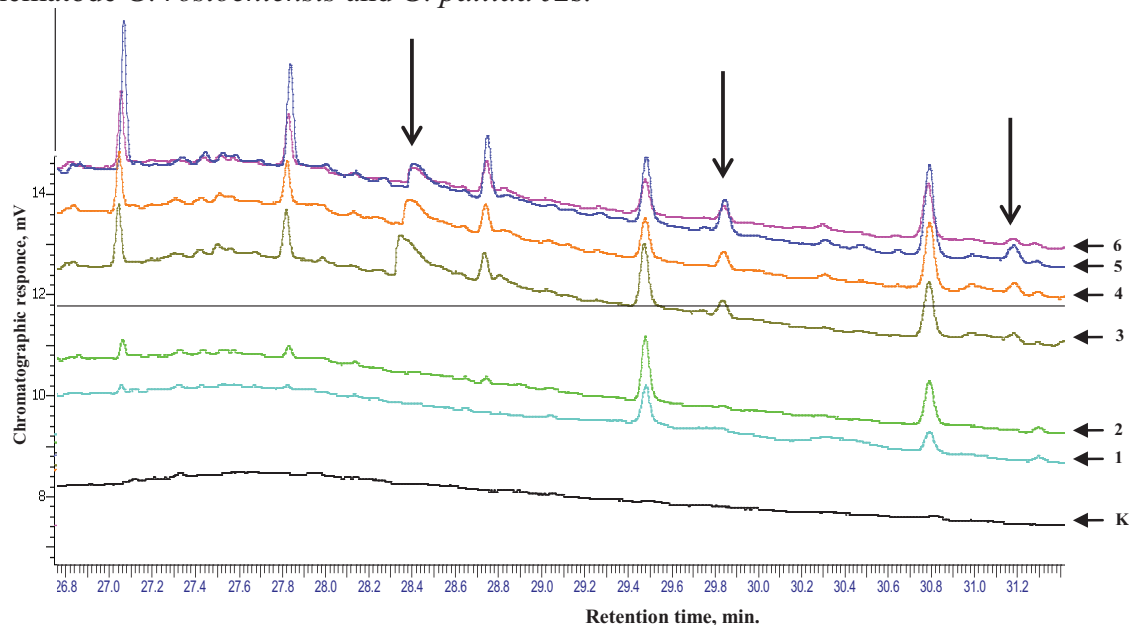


Fig. 10. Fragments of chromatograms of potato root released chemical compound (extracted with *n*-hexane) in to the substrate. Arrows under the chromatograms indicate potentially active compounds with the retention time 28.4; 29.8 and 31.2 minutes. K– control (*n*-hexane); 1–6 denotes week when potato root released chemical compounds were collected. Horizontal line in the chromatograms shows the position of chromatograms before the outspread of them using computer software (Total Crome Navigator–Clarus 500, Perkin Elmer, USA).

10 pav. *n*-Heksanu ekstrahuotų bulvių šaknų į substratą išskiriamų medžiagų chromatogramos dalis, rodyklės virš chromatogramų žymi potencialiai aktyvių cheminių medžiagų sulaikymo laikus ties 28,4; 29,8 ir 31,2 min. K – kontrolė (*n*-heksanas); 1–6 žymi bulvių šaknų išskiriamų medžiagų surinkimo savaitę. Horizontali linija prie chromatogramų rodo chromatogramų padėtį iki jų išskleidimo kompiuterinės programos (Total Crome Navigator–Clarus 500, Perkin Elmer, JAV) pagalba.

Previous studies of this work showed that linalool and α -solanine attracts *G. rostochiensis* and *G. pallida* J2s (Fig. 5; 7). Study of linalool content in potato root diffusate showed that linalool retention time in chromatography column is 13.2 minutes (Fig. 6). α -Solanine cannot be determined by gas chromatography, however, due to its physical properties: the compound melting point is 271–273 °C, and it is higher than that of thermostat column – 250 °C (according to the manufacturer's recommendations). Thus, due to chromatographic profile of the chemicals released by potato roots, three potentially bioactive compounds are other than linalool or α -solanine.

For the first time in our research, silicone tubing for microextraction of potentially bioactive chemical compounds released by potato roots was applied. In order to identify the chemical composition of these chemicals, further tests are need and our research results could contribute to these studies.

CONCLUSIONS

1. Morphological and molecular (PCR) analysis of potato cyst nematodes collected from soil samples from all 10 counties of Lithuania showed that only one species of potato cyst nematodes – *G. rostochiensis* is detected in Lithuania (common in all counties), and *G. pallida* is not detected.
2. Linalool is not toxic to *G. rostochiensis* and *G. pallida*, unlike to other species of plant parasitic nematodes.
3. Potato released non specific metabolite linalool and specific metabolite α -solanine is attractive to *G. rostochiensis* and *G. pallida* J2s.
4. Sensitivity of *G. rostochiensis* to linalool is higher than that of *G. pallida* (threshold concentration 1×10^{-4} M and 1×10^{-3} M accordingly). According to sensitivity threshold to α -solanine no interspecific differences are recorded, however, nematode response in time differs: *G. pallida* responds to α -solanine quickly (after 15 minutes of nematode transfer to media with a chemical stimulus), although, the response is short (is absent after 30 and 60 minutes); *G. rostochiensis* responds to the compound slowly (after 30 and 60 minutes) and the response lasts longer.
5. Exposure time of greater than two minutes of zinc sulphate aqueous solution of 3 mM concentration to *G. pallida* inhibits chemoattraction to α -solanine.
6. Behavioral test showed that potato released chemical compounds responsible for attraction of *G. rostochiensis* and *G. pallida* can be extracted by *n*-hexane.
7. Comparative analysis of gas chromatography of *n*-hexane extracted potato root released chemical compounds showed that at least three chemical compounds in potato emissions occurring in attractive to nematodes growth phase are present. These compounds are other than attractants revealed in this research – linalool and α -solanine, because the retention times of gas chromatography column are different – 28.4; 29.8 and 31.2 minutes.

IVADAS

Darbo aktualumas. Bulvės (*Solanum tuberosum*) – viena ekonomiškai svarbiausių augalų rūšių pasaulyje, jų produkcija yra ketvirta po kviečių, kukurūzų ir ryžių (Hawkes, 1999). 2007 metais bulvėmis buvo apšodinta virš 19 mln. ha dirbamų žemės plotų, iš kurių prikasta daugiau nei 325 mln. tonų bulvių (FAO, 2008). Be vartojimo maistui, iš bulvių gumbų išgaunamų medžiagų pagaminama virš 200 įvairių produktų: etilo spirito, klijų, plastmasių, acetono, krakmolo, gliukozės ir kt.

Vieni iš pavojingiausių bulvinių (*Solanaceae*) šeimos kenkėjų yra cistas ant bulvinių augalų šaknų sudarantys auksinis *Globodera rostochiensis* ir blyškusis *Globodera pallida* bulviniai nematodai. Dėl bulvinių cistinių nematodų ypatingos specializacijos, glaudaus ryšio su augalais šeimininkais, gebėjimo plisti, unikalios adaptacijos ilgą laiką išbūti dirvoje be augalo šeimininko patiriami dideli derliaus nuostoliai. Nustatyta, kad prarandama apytikriai 2t/ha bulvių kiekvienam 20 nematodų kiaušinėlių/g dirvožemio (Brown, 1969), ir net apie 80 % derliaus gali būti prarandama, kai nesiimama jokių prevencijos priemonių. Šiuo metu abi bulvinių cistinių nematodų *G. rostochiensis* ir *G. pallida* rūšys įtrauktos į pasaulio, Europos ir Lietuvos karantininių² organizmų sąrašą (CD, 2000). Lietuvoje už karantininių organizmų, tame tarpe *G. rostochiensis* ir *G. pallida* importą, eksportą ir vietinių karantininių židinių paiešką atsakinga, bei likvidavimą atlieka Valstybinė augalininkystės tarnyba prie Žemės ūkio ministerijos.

Bulvinių cistinių nematodų identifikacija pagal morfologinius požymius reikalauja daug kruopštaus darbo, įgūdžių, specialių darbo priemonių, didelių laiko sąnaudų. Be to, identifikuojant *G. rostochiensis* ir *G. pallida* susiduriama su morfologiniais rūšių panašumais ir morfometrinių matavimų persidengimais (Baldwin, Mundo-Ocampo, 1991; Brzeski, 1998; Manduric, Anderson, 2004; Dobosz *et al.*, 2006). Dėl šios priežasties tikslesniam rūšių identifikavimui taikomi molekuliniai metodai, vienas dažniausiai naudojamų – polimerazinės grandininės reakcijos metodas, panaudojant rūšiai specifinius DNR pradmenis (Fullaondo *et al.*, 1999; Zouhar *et al.*, 2000; Pylypenko *et al.*, 2005). Kadangi tik tokie šiuolaikiniai metodai leidžia tiksliai identifikuoti bulvinių cistinių nematodų rūšis, juos būtina taikyti norint patikimai nustatyti, kokios rūšys aptinkamos Lietuvoje.

Prasidėjus šiltajam metų laikui iš bulvinių nematodų cistose esančių kiaušinėlių ritasi antros juvenilinės stadijos nematodai (pirmos juvenilinės stadijos nematodai vystosi kiaušinėliuose) ir migruoja link augalo šeimininko šaknų (Weischer, 1959). Poriniai chemoreceptoriai – amfidės, išsidėsčiusios nematodų galvinėje dalyje, yra svarbiausi chemoreceptoriniai organai, kurių dėka nematodai jaučia cheminius stimulus ir taip orientuojasi dirvožemio aplinkoje (Jones *et al.*, 1994). Bulvių šaknys išskiria į dirvožemį nematodams patrauklius cheminius junginius (Weischer, 1959; Clarke, Hennessy, 1984; Devine, Jones, 2003), tačiau kol kas neidentifikuotas nei vienas junginys (ar jų mišinys), patrauklus bulviniams cistiniams nematodams. Tam reikalingi ne tik detalūs nematodų elgsenos, bet ir bulvių šaknų išskiriamų bioaktyvių cheminių medžiagų tyrimai. Nustačius šias medžiagas, atsirastų galimybė sutrikdyti įprastą nematodų elgseną – augalo

² Karantininiais organizmais vadinamos tos rūšys, kurios neaptiktos šalyje, tačiau gali būti įvežtos ar savarankiškai patekti į ją, arba ribotai paplitusios šalies teritorijoje, tačiau oficialiai kontroliuojamos, ir kurios gali ženkliai kenkti augalams ar gadinti augalinę produkciją, t. y. - ekonomiškai svarbios (FAO, 2007).

šeimininko šaknų aptikimą. Šią elgseną sutrikdyti būtų įmanoma ir slopinant nematodų amfidžių veiklą. Visa tai galėtų būti pritaikyta biologinei kovai su bulviniais cistiniais nematodais, t. y. atsirastų galimybė įtakoti jų elgseną ir taip kontroliuoti jų paplitimą bei sumažinti daromą žalą bulvių derliui. Tad gilesnis nematodų chemoekologinių sąveikų pažinimas svarbus ne tik fundamentinių žinių, bet ir taikomąja prasme.

Darbo tikslas – nustatyti bulvinių cistinių nematodų rūšinę sudėtį ir paplitimą Lietuvoje bei jų chemoekologinių sąveikų su augalu šeimininku ypatumus.

Darbo uždaviniai:

- 1) iš dirvožemio mėginių, surinktų visose 10 Lietuvos apskrįčių, išskirti nematodų cistas ir morfologiniais bei molekuliniais metodais identifikuoti *G. rostochiensis* ir *G. pallida* rūšis, nustatyti jų paplitimą Lietuvoje;
- 2) nustatyti bulvių šaknų išskiriamo nespecifinio metabolito linalolio toksiškumą bulviniams cistiniams nematodams;
- 3) nustatyti bulvių šaknų išskiriamo nespecifinio metabolito linalolio ir specifinio metabolito α -solanino poveikį bulvinių cistinių nematodų elgsenai;
- 4) atlikti bulvinių cistinių nematodų *G. rostochiensis* ir *G. pallida* chemoekologinių ypatumų, susijusių su reakcijomis į augalą šeimininką, lyginamąją analizę;
- 5) nustatyti, ar cinko sulfatas slopina bulvinių cistinių nematodų elgsenines reakcijas, susijusias su šių nematodų priviliojimu prie augalo šeimininko išskiriamų cheminių junginių;
- 6) įvertinti, ar bulvių šaknys toje augimo fazėje, kuri nematodams atraktyviausia, išskiria minėtai fazei būdingų cheminių junginių.

Darbo naujumas:

- 1) pirmą kartą tiksliai šiuolaikiniu molekulinio metodu patvirtinta, jog karantininės rūšies *G. pallida* Lietuvoje nėra bei įvertintas *G. rostochiensis* paplitimas;
- 2) sukurtas originalus testas bulvinių cistinių nematodų elgsenos tyrimams;
- 3) pirmą kartą nustatytos augalo šeimininko išskiriamos cheminės medžiagos, atraktyvios bulviniams cistiniams nematodams;
- 4) pirmą kartą nustatyta, jog cinko sulfato vandeninis tirpalas slopina nematodų elgsenines reakcijas, susijusias su priviliojimu prie cheminio stimulo;
- 5) pirmą kartą nustatyta, kad bulvių šaknys atraktyviausioje nematodams augimo fazėje išskiria būdingų cheminių junginių.

Mokslinė ir praktinė darbo reikšmė. Darbo rezultatai papildo kol kas labai negausias bulvinių cistinių nematodų cheminės ekologijos bei elgsenos žinias. Jie yra svarbūs ir gali būti taikomi:

- 1) bulvinių cistinių nematodų rūšių plitimo stabdymui;
- 2) bulvinių cistinių nematodų kairomonų paieškai;
- 3) bioaktyvių medžiagų bulvių šaknų nuoplovose tyrimams;
- 4) biologiškai aktyvių stimulų parinkimui bulvinių cistinių nematodų chemosensorikos elektrofiziologiniams ar kitiems tyrimams;
- 5) kuriant ekologiškai nepavojingas kovos priemones su bulviniais cistiniais nematodais.

Ginamieji darbo teiginiai:

- 1) Lietuvoje paplitusi tik viena karantininė bulvinių cistinių nematodų rūšis – *G. rostochiensis*, *G. pallida* Lietuvoje nėra;
- 2) bulvinių cistinių nematodų ir augalo šeimininko sąveikai svarbūs cheminiai stimulai: tiek nespecifiniai (būdingi daugeliui augalų), tiek specifiniai (būdingi tik augalui šeimininkui);
- 3) abiejų morfologiškai ir ekologiškai labai artimų rūšių bulvinių cistinių nematodų reakcijos į cheminius stimulus yra skirtingos.

Darbo aprobavimas ir publikacijos. Disertacijos medžiaga buvo pristatyta VU šeštojoje mokslinėje konferencijoje „Mokslas gamtos mokslų fakultete“ (VU botanikos sodas, Kairėnai, 2010), 26 bei 27 tarptautinėse Cheminės ekologijos draugijos konferencijose (Tours, Prancūzija, 2010; Britų Kolumbija, Kanada, 2011). Tyrimų rezultatai paskelbti penkiose publikacijose: trijuose moksliniuose straipsniuose (vienas iš jų įtrauktas į Mokslinės Informacijos Instituto (ISI WOS) duomenų bazes su *impact* faktoriumi) bei dviejose konferencijų tezėse.

Darbo struktūra. Disertaciją sudaro šie skyriai: Įvadas, Literatūros apžvalga, Medžiaga ir metodai, Rezultatai ir jų aptarimas (skyrius susideda iš trijų poskyrių), Išvados, 286 Literatūros šaltinių sąrašas, autorės Mokslinių publikacijų disertacijos tema sąrašas, Priedai. Disertacijos apimtis – 104 puslapiai, 8 lentelės ir 15 paveikslų. Disertacija parašyta lietuvių kalba, o disertacijos santrauka – anglų kalba.

Padėkos. Nuoširdžiai dėkoju už visokeriopą pagalbą ir patarimus darbo vadovui prof. habil. dr. Vincui Būdai bei visiems Gamtos tyrimų centro Ekologijos instituto Cheminės ekologijos ir elgsenos laboratorijos darbuotojams. Už galimybę atlikti tyrimus Fitosanitarinių tyrimų laboratorijoje (Valstybinės augalininkystės tarnybos prie ŽŪM) esu labai dėkinga buvusiai laboratorijos vedėjai dr. Loretai Taluntytei. Taip pat visiems šios laboratorijos darbuotojams už palaikymą, supratingumą ir pagalbą, ypač dr. Vaidai Jogaitai (buvusiai bendradarbei) taikant molekulinės biologijos metodus bulviniams cistiniams nematodams tirti. Dėkoju Julius Kühn institutui (Vokietija) bei Augalų apsaugos tarnybai (Prancūzija) už medžiagą tyrimams. Taip pat labai dėkoju Silvijai Budavičiūtei (Helsinkio universitetas) už prieigą prie mokslinių publikacijų bei Joseph R. Laroza (Kalifornijos universitetas) už redakcinius anglų kalbos pataisymus. Už suteiktą stipendiją dėkoju Lietuvos valstybiniam mokslo ir studijų fondui bei Vilniaus universitetui – už suteiktą galimybę studijuoti doktorantūroje.

LITERATŪROS APŽVALGA

Šiame skyriuje apžvelgiama bulvinių cistinių nematodų *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923) Behrens, 1975 ir *Globodera pallida* (Stone, 1973) Behrens, 1975 biologija, pagrindiniai morfologiniai bruožai, chemoreceptija (tame tarpe ir kitų augalų parazitinių nematodų), sukeliama žala bulvėms ir kovos būdai su šiais kenkėjais. Literatūros apžvalgoje taip pat aptariamos cheminės medžiagos, kurias išskiria bulvės, augalų parazitinių nematodų chemoekologinės sąveikos (pagrindiniai metodai šioms sąveikoms tirti ir cheminės medžiagos, įtakančios nematodų elgseną) bei žinomos medžiagos, slopinančios augalų parazitinių nematodų chemoreceptorių veiklą.

MEDŽIAGA IR METODIKA

Medžiaga

a) **Bulviniai cistiniai nematodai rūšių atskyrimui.** Rūšių atskyrimui bulvinių cistinių nematodų cistos buvo išrinktos iš 2815 dirvožemio mėginių, paimtų iš 556 ha ploto žemės ūkio paskirties laukų iš visų 10 Lietuvos apskričių – Alytaus, Kauno, Klaipėdos, Marijampolės, Panevėžio, Šiaulių, Tauragės, Telšių, Utenos bei Vilniaus. Dirvožemio mėginiai buvo paimti vadovaujantis standartine procedūra ir pristatyti į Valstybinės augalininkystės tarnybos (buvusios Augalų apsaugos tarnybos) prie Žemės ūkio ministerijos Fitosanitarinių tyrimų laboratoriją (skyrių) (FTL) nematologiniams tyrimams. Informacija apie priešsėlio tipą ir dirvožemį nebuvo renkama, todėl neanalizuota.

Flotacijos metodu (naudojant Schuiling'o centrifugą, Volkers & Zonen, Olandija) cistos iš dirvožemio mėginių FTL buvo išplautos ant filtrinio popieriaus ir apibūdintos iki rūšies pagal morfologinius požymius. Dėl bulvinių cistinių nematodų rūšių morfologinių panašumų ir morfometrinių matavimų persidengimų tikslesnis rūšių identifikavimas atliktas cistų DNR polimerazinės grandininės reakcijos (PGR) metodu panaudojant rūšims specifinius pradmenis.

b) **Nematodai elgsenos tyrimams.** *Globodera rostochiensis* Ro1 (*Ecosse* populiacija) ir *G. pallida* Pa2 (*Kalle* populiacija) cistos (gautos iš Julius Kühn instituto, Vokietija) savaitę laikytos drėgnai 21°C (MIR 253, Sanyo, Japonija). Po to cistos perpjautos vandens laše ant objekcinio stiklelio ir visas cistų turinys su išsiritusiais J2 ir neišsiritusiais kiaušinėliais nedideliu vandens kiekiu (~50 µL) nuplautas į 60 mm skersmens Petri lėkšteles (atskiras kiekvienai rūšiai) su 1,5 % 1–2 mm storio agarų sluoksniu (Carl Roth, Vokietija). Vandeniui susigėrus į agarą (po kelių valandų), aktyviai judantys J2 stadijos nematodai panaudoti elgsenos tyrimuose.

Iš Julius Kühn instituto elgseniniais testams buvo gautas nedidelis nematodų cistų kiekis, todėl nematodai buvo dauginami laboratorinėmis sąlygomis, juos auginant vazonuose su *Désirée* veislės (Prancūzija) bulvėmis (*Solanum tuberosum*), kurios yra neatsparios bulviniams cistiniams nematodams. Nematodai dauginami FTL karantininio šiltnamio kameroje, pritaikytoje karantininių organizmų dauginimui.

Metodai

Bulvinių cistinių nematodų rūšių identifikavimas

a) **Nematodų rūšių identifikavimas pagal morfologinius požymius.** Iš *Globodera* spp. cistų ir iš cistose esančių kiaušinėlių išsiritusių J2 nematodų (jei jų buvo) paruošti laikini preparatai. Jie analizuoti šviesiniu mikroskopu (didinimas 40 × – 1000 ×, BX51, Olympus, Japonija), sujungtu su video dokumentavimo sistema, susidedančia iš skaitmeninės kameros (Nikon Coolpix 4500, Japonija), prijungtos prie kompiuterio. Nematodai nufotografuoti, išmatuoti kompiuterine programa (Image Pro Plus 3, Media Cybernetics, JAV) ir, remiantis morfologiniais požymiais, apibūdinti iki rūšies.

b) **Nematodų rūšių identifikavimas PGR metodu.** DNR išskyrimas iš cistų. Vieno mėginio cistos buvo pamerktos į distiliuotą vandenį 24 val., po to perkeltos į 1,5 mL mėgintuvėlius su 180 µL lizės tirpalu ir sutrintos mikrogrūstuvėliu. Išskirta DNR laikyta – 20 °C. DNR amplifikacija. Darbo pradžioje *G. rostochiensis* ir *G. pallida* cistų DNR amplifikacijai buvo naudoti Fullaondo *et al.* (1999) nustatyti pradmenys bei PGR sąlygos: 5'GCAAGCCAGCGTCAGCAAC3', 5'GAACATCAACCTCCTATCGG3'

– *G. rostochiensis* atveju; 5'TGTCCATTTCCTCTCCACCAG3', 5'CCGCTTCCCCATTGCTTTCG3' – *G. pallida* atveju. Ruošiant mišinį DNR amplifikacijai su šiais pradmenimis sunaudota daugiau medžiagų bei laiko, todėl tolimesniems šio darbo tyrimams pasirinktos Pylypenko *et al.* (2005) nustatytos DNR pradmenų sekos bei PGR sąlygos: PITSr3 5'AGCGCAGACATGCCGCAA3' ir tiesioginis 5'CGTAACAAGGTAGCTGTA3' pradmuo *G. rostochiensis* genomo daliai; sPITSp4 5'ACAACAGCAATCGTCGAG3' ir tiesioginis 5'CGTAACAAGGTAGCTGTA3' – *G. pallida* genomo daliai. DNR amplifikacijai paruoštas 25 µL mišinys, sudarytas iš: 1 × *Taq* buferio su KCl (Thermo Scientific, Lietuva); 1,5 mM MgCl₂ (Thermo Scientific, Lietuva); 0,2 mM dNTP mišinio (Thermo Scientific, Lietuva); 1 vieneto rekombinantinės *Taq* DNR polimerazės (Thermo Scientific, Lietuva); 1,5 µM pradmens PITS r3 (Biomers, Vokietija); 1,5 µM pradmens sPITS p4 (Biomers, Vokietija); 1,5 µM tiesioginio pradmens (Biomers, Vokietija); 5 µL (apie 20 ng) cistos DNR; DEPC H₂O (Roth, Vokietija) pridėta tiek, kad mišinio galutinis tūris būtų 25 µL; neigiama kontrolė – DEPC H₂O; teigiamos kontrolės: *G. rostochiensis* bei *G. pallida* DNR (Valstybinės Augalų apsaugos tarnybos nematologijos laboratorija, Prancūzija). Amplifikacija vykdyta termocikleryje (Mastercycler personal 5332, Eppendorf, Vokietija). Elektroforezė. DNR amplifikacijos produktai, pridėjus bromfenolio mėlio (0,3 µg/µL), analizuoti horizontaliosios elektroforezės metu 1,5 % agarozės gelyje su etidžio bromidu (0,5 µg/µL) 1 × TAE buferyje, 72 V (6 V/cm) įtampoje. DNR amplifikacijos produktai stebėti ultravioletinėje šviesoje, DNR fragmentų ilgis nustatytas pagal DNR ilgio žymenį – GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Thermo Scientific, Lietuva). Gelio vaizdas dokumentuotas gelių dokumentavimo sistema (Easy Win 32, Herolab, Vokietija).

Augalo šeimininko (bulvių) ir ne šeimininko (cukrinių runkelių) šaknų nuoplovų paruošimas

Pradiniame bulvinių cistinių nematodų elgsenos tyrimų etape buvo svarbu aptikti ir statistiniais metodais įvertinti skirtumus tarp reakcijos į vandenines bulvių šaknų nuoplovas, kurios bulviniams cistiniams nematodams yra atraktyvios, ir vandens (kontrolė), kuris nematodus veikia neutraliai (nei vilioja, nei atstumia). Rezultatų įvertinimui statistiniais metodais pasirinktos ir kitos, ne augalų šeimininkų – cukrinių runkelių, priklausančių balandinių (Chenopodiaceae) šeimai, vandeninės šaknų nuoplovas, apie kurias žinoma, kad jos nėra atraktyvios bulviniams cistiniams nematodams (Rolfe *et al.*, 2000). Trys *Désirée* bulvių veislės gumbai (kiekvienas atskirai) ir 15 cukrinių runkelių (*Beta vulgaris*) *Belmonte* veislės (Danija) daigų (visi kartu) buvo pasodinti į 400 mL vazonelius su autoklavuotu smėliu FTL šiltnamyje, kur nustatyta 60 % drėgmė, šviesos ir tamsos ciklai (14:10 val.), palaikyta 22 °C. Po trijų savaičių bulvės, o po septynių – cukriniai runkeliai išrauti. Kiekvienos bulvės šaknys atskirai, o cukrinių runkelių šaknys kartu pamerkti į 100 mL distiliuoto vandens 24 val. šiltnamyje. Paruoštos vandeninės nuoplovas iki naudojimo laikytos +4 °C.

Bulvių šaknų nuoplovų ekstrahavimas

Prieš atliekant bulvių šaknų į substratą (šiuo atveju smėlį) išskiriamų medžiagų analizę dujų chromatografijos metodu, šias medžiagas reikėjo iš substrato mikroekstrahuoti. Šiuo tikslu buvo svarbu patikrinti, ar *n*-heksanas (grynumas 99 %, Fluka, Vokietija) (dažnai naudojamas tirpiklis cheminių medžiagų ekstrakcijai) yra tinkamas ekstrahuoti šias (bulvių šaknų išskiriamas) medžiagas. Penkiasdešimt

mikrolitru vandeninių bulvių šaknų nuoplovų buvo ekstrahuota 50 mL *n*-heksanu vieną kartą 5 min. Heksaninis ekstraktas buvo sukonzentruotas kambario temperatūroje iki sausumo, po to į jį įpilti 3 mL distiliuoto vandens. Gautas ekstraktas naudotas nematodų elgsenos tyrimuose, tokiu būdu nustatytas tirpiklio tinkamumas bulvių šaknų nuoplovose esančių medžiagų ekstrahavimui.

Linalolio kiekio nustatymas bulvių šaknų nuoplovose

Bulvinių cistinių nematodų elgseną veikiančių, bulvių šaknų į aplinką išskiriamų, medžiagų paieškai iš daugelio šio augalo į aplinką išskiriamų medžiagų pasirinkta mažos molekulinės masės cheminė medžiaga – linalolis (3,7-dimetil-1,6-oktadien-3-olis; molekulinė masė – 154,25). Dirvožemyje lengvos cheminės medžiagos juda greičiau ir jas iš tolesnio atstumo gali pajusti aplinkoje esantys organizmai, šiuo atveju – nematodai. Linalolio kiekis bulvių šaknų nuoplovose, kurios buvo naudojamos nematodų elgsenos tyrimuose, buvo nustatytas kietafazės mikroekstrakcijos – dujų chromatografijos metodu. Į 10 mL talpos kolbutę įpilta 1 mL vandeninių bulvių šaknų nuoplovų ir pridėta 0,3 g NaCl. Kolbutė sandariai uždengta trimis sluoksniais aliuminio folijos ir patalpinta į 40 °C vandens termostatą. Po 15 min. į kolbutės viršerdvį įleistas kietafazės mikroekstrakcijos siūlas (65 μm, PDMS–DVB, Supelco, JAV). Ekstrahuota 60 min. 40 °C. Sorbuoti junginiai tuojau pat buvo desorbuojami chromatografo garintuve 1 min. esant 240 °C. Sorbuotų junginių analizė atlikta dujų chromatografu (Clarus 500, Perkin Elmer, JAV) su liepsnos jonizacijos detekcija (FID), kolonėlė – DB–Wax (30 m × 0,25 mm, sorbento sluoksnio storis 0,25 μm, Restek, JAV). Garintuvo ir detektoriaus temperatūra – 240 °C. Kolonėlių termostato temperatūra programuota tokiu būdu: 2 min. laikyta 40 °C, po to 5 °C/min. kelta iki 200 °C, toliau 10 °C/min. kelta iki 240 °C ir tokia palaikyta 2 min. Linalolio kiekis apskaičiuotas išorinio standarto metodu.

Bulvinių cistinių nematodų elgsenos tyrimai

a) Elgseninių reakcijų į augalo šeimininko (bulvių) ir ne šeimininko (cukrinių runkelių) šaknų nuoplovas testas. Ant Petri lėkštelės (32 mm skersmens), užpildytos 1,5 % 1–2 mm storio agarų sluoksniu (Carl Roth, Vokietija), centro uždėtas 5 mm skersmens filtrinio popieriaus gabalėlis (Schleicher & Shuell Microscience, Vokietija). Ant jo užlašinta 14 μL vandeninių bulvių šaknų nuoplovų arba kontrolių: vandens ar vandeninių cukrinių runkelių šaknų nuoplovų (1 pav.). Po 2 val. filtrinis popierėlis buvo nuimamas ir užnešami keturi *G. rostochiensis* arba *G. pallida* J2 nematodai vienodais atstumais vieni nuo kitų ir 1,1 cm atstumu nuo centro. Po 30 min. ir po 60 min. nuo nematodų užnešimo ant terpės su tiriamą chemine medžiaga binokuliariniu mikroskopu (didinimas 7,5 × – 112,5 ×, Nikon SMZ 1500, Japonija) buvo registruojama nematodo padėtis. Nematodų judėjimas link cheminio stimulo šaltinio traktuotas kaip teigimas atsakas į cheminę medžiagą, o judėjimas priešinga kryptimi – kaip neigiamas. Testuota po keturis nematodus penkiose lėkštelėse, eksperimentai pakartoti šešis kartus su bulvių šaknų nuoplovomis ir kontrolėmis. Cheminės medžiagos atraktyvumas įvertintas kiekybiškai lyginant judėjusių link cheminio stimulo nematodų skaičių su visu teste tirtų nematodų skaičiumi jį išreiškus procentais.

b) Elgseninių reakcijų į *n*-heksanu ekstrahuotas bulvių šaknų nuoplovas testas. Bulvinių cistinių nematodų elgseniniai testai į *n*-heksanu ekstrahuotas bulvių šaknų nuoplovas atliktas lygiai taip pat, kaip ir elgseniniame teste į augalo šeimininko ir ne šeimininko šaknų nuoplovas (1 pav.). Kontrolei pasirinktos vandeninės bulvių šaknų nuoplovas ir distiliuotas vanduo. Testo rezultatai fiksuoti po 30 min. ir po 60 min. nuo

nematodų užnešimo ant terpės su tiriamą chemine medžiaga. Testuota po keturis nematodus penkiose lėkštelėse, eksperimentai pakartoti šešis kartus su *n*-heksanu ekstrahuotomis bulvių šaknų nuoplovomis ir kontrolėmis.

c) Linalolio toksiškumo biotestas. Žinoma, kad linalolis dvejopai veikia dirvožemyje gyvenančių nematodų elgseną, vienoms rūšims jis yra atraktyvus (Hong, Sommer, 2006; Hong *et al.*, 2008; Köllner *et al.*, 2008), kitoms – toksiškas (Chatterjee *et al.*, 1982; Malik *et al.*, 1987; Sangwan *et al.*, 1990; Leela *et al.*, 1992; Walker, Melin, 1996; Ibrahim *et al.*, 2006; Kong *et al.*, 2007), todėl pirmiausia buvo tiriamas šios medžiagos toksiškumas bulviniams cistiniams nematodams.

Į vieną laikroдинį stiklėlį su 2 μL distiliuoto vandens buvo sudėta 50 *G. rostochiensis*, į kitą – 50 *G. pallida* J2 nematodų. Po to į šiuos stiklelius su nematodais buvo įpilti 2 mL sotaus 1×10^{-3} M linalolio (raceminis, grynumas – 97 %, Sigma–Aldrich, Vokietija) tirpalo. Kontrolė atlikta su distiliuotu vandeniu. Nematodų mirtingumas stebėtas 12 dienų iš eilės pro binokuliarinį mikroskopą (didinimas $7,5 \times - 112,5 \times$, Nikon SMZ 1500, Japonija). Viso atlikti keturi biotesto pakartojimai kiekvienai nematodų rūšiai. Nematodų mirtingumas skaičiuotas procentais.

d) Elgseninių reakcijų į linalolį testas. Linalolio poveikio bulvinių cistinių nematodų elgsenai tyrimas su tam tikrais pakeitimais, kurie išvardyti žemiau, atliktas taip, kaip ir elgseniniame teste į augalo šeimininko ir ne šeimininko šaknų nuoplovas (1 pav.). Ant filtrinio popierėlio užlašintas 1 μL žinomos linalolio nuo 1×10^0 M iki 1×10^{-6} M koncentracijos vandeninio tirpalo arba kontrolės – distiliuoto vandens. Kaip dar viena kontrolė pasirinktos vandeninės bulvių šaknų nuoplovas, ant agarų terpės jos buvo užneštos taip, kaip nurodyta nematodų elgseninių reakcijų teste į augalo šeimininko ir ne šeimininko šaknų nuoplovas (1 pav.). Po 2 val. filtrinis popierėlis buvo nuimamas ir ant terpės buvo užnešami nematodai. Testo rezultatai fiksuoti po 30 min. ir po 60 min. nuo nematodų užnešimo ant terpės su tiriamą chemine medžiaga. Testuota po keturis nematodus penkiose lėkštelėse, eksperimentai pakartoti šešis kartus su bulvių šaknų nuoplovomis ir kontrolėmis. Bulvinių cistinių nematodų elgseninių reakcijų į linalolį tyrime reakcija į distiliuotą vandenį laikyta neutralia ir prilyginta 50 %.

e) Elgseninių reakcijų į α-solaniną testas. α-Solanino – specifinio bulvių antrinio metabolito (apžvalga: Eich, 2008) poveikio bulvinių cistinių nematodų elgsenai tyrimas su tam tikrais pakeitimais, kurie išvardyti žemiau, atliktas taip, kaip ir elgseniniame teste į augalo šeimininko ir ne šeimininko šaknų nuoplovas (1 pav.). Vienas mikrolitras žinomos α-solanino (grynumas ~95 %, Sigma–Aldrich, Vokietija) absoliutaus etanolio (grynumas 99 %) nuo 1×10^{-4} M iki 1×10^{-7} M koncentracijos arba kontrolės – absoliutaus etanolio užlašinta Petri lėkštelės centre. Šiame teste filtrinis popierėlis nenaudotas. Iš karto po medžiagų užnešimo ant terpės buvo perkeliama ir testuojami nematodai. Kaip dar viena kontrolė pasirinktos vandeninės bulvių šaknų nuoplovas, ant agarų terpės jos buvo užneštos taip, kaip nurodyta nematodų elgseninių reakcijų teste į augalo šeimininko ir ne šeimininko šaknų nuoplovas (1 pav.). Testo rezultatai fiksuoti po 15; 30 ir 60 min. nuo nematodų užnešimo ant terpės su tiriamą chemine medžiaga. Testuota buvo po keturis nematodus penkiose lėkštelėse, eksperimentai kartoti 12 kartų su skirtingomis α-solanino koncentracijomis ir kontrolėmis. Bulvinių cistinių nematodų elgseninių reakcijų į α-solaniną teste reakcija į tirpiklį – absoliutų etanolį laikyta neutralia ir prilyginta 50 %.

f) Bulvinių cistinių nematodų chemoreptorių slopinimo testas. Žinoma, kad cinko sulfatas slopina žinduolių uoslės (Alberts, 1974) ir vabzdžių uoslės bei skonio (Bakakrishnan, Pollack, 1997; Groh *et al.*, 2002; Baužienė, Būda, 2010) receptorių veiklą, todėl šios druskos tirpalas testuotas su bulviniais cistiniais nematodais. Kontrolei pasirinkta kita cheminėmis savybėmis į cinko sulfatą panaši divalenčio metalo sulfato druska – magnio sulfatas bei distiliuotas vanduo. Abiejų cistinių nematodų rūšių *G. rostochiensis* ir *G. pallida* anatomija, fiziologija ir ekologija labai panašios, dėl šios priežasties chemoreptorių slopinimo tyrimams buvo pasirinkta tik viena rūšis – *G. pallida*.

Į laikroдинį stiklėlį įpilta 50 µL 3 mM koncentracijos ZnSO₄·7H₂O vandeninio tirpalo. Į jį buvo perkelta 20 *G. pallida* J2 nematodų. Tirpale nematodai buvo laikomi 2; 5; 15 arba 30 min. Kontrolės atliktos su 3mM koncentracijos ZnSO₄·7H₂O vandeniniu tirpalu ir distiliuotu vandeniu. Po to nematodai iš tirpalų lenkta entomologine adatėle buvo perkeliama į Petri lėkšteles, kur registruota jų reakcija į α-solaniną taip, kaip nurodyta elgseninių reakcijų į α-solaniną teste (1 pav.). Nematodų elgsena fiksuota po 15 min., testuota po keturis nematodus penkiose lėkštelėse, eksperimentai pakartoti šešis kartus.

g) Statistinis bulvinių cistinių nematodų elgseniniu testų rezultatų vertinimas. Nematodų elgseninių reakcijų skirtumų į cheminius stimulus statistinis patikimumas buvo įvertintas χ² kriterijumi, rezultatai buvo apdoroti kompiuterine statistikos programa Statistica 6.0 (SatSoft, JAV).

Bulvių šaknų išskiriamų medžiagų mikroekstrakcija ir chromatografinė analizė

a) Bulvių šaknų į substratą išskiriamų medžiagų mikroekstrakcija. Paruoštos keturios 1 m ilgio silikono vamzdelių (skersmuo – 0,31 mm (išorinis) × 0,64 mm (vidinis), Helix Medical Europe KG, Vokietija) poros. Į vieną vamzdelio galą įverta švirškšto (5 mL, Momina Krepsot, Bulgarija) adata. Trys *Désirée* veislės bulvių gumbai atskirai pasodinti 1 L talpos stikliniuose vazonuose su drenažu dugne į autoklavuotą smėlį. Sodinant į kiekvieno vazono smėlį įdėti du silikono vamzdeliai: vienas vamzdelis įdėtas 5 cm aukštyje nuo vazono dugno, kitas – šalia bulvės gumbo. Abiejų vamzdelių galai ištraukti ir palikti vazono išorėje. Vazonai buvo apsukti aliuminio folija. Augalai auginti FTL šiltnamyje, kur nustatyta 60 % drėgmė, šviesos ir tamsos ciklai (14:10 val.), palaikyta 19 °C. Kontrolei pasirinktas vazonas su autoklavuotu smėliu be bulvės.

Iki šiol nėra duomenų kada bulvės išskiria bulviniams cistiniams nematodams atraktyvias medžiagas. Yra žinoma, kad trečią savaitę po bulvių sudygimo ritasi didžiausi šių nematodų kiekiai (Farrer, Phillips, 1983; Rawsthorne, Brodie, 1986), o išsiritę nematodai per 6–11 dienų pasiekia augalo šaknis (Robinson *et al.*, 1987). Tuo remdamiesi darėme prielaidą, kad trečią savaitę po bulvių sudygimo bulvės išskiria ir J2 stadijos nematodus viliojančias medžiagas. Dėl šios priežasties kas savaitę šešias savaites iš eilės po bulvių pasodinimo iš kiekvieno vazono vamzdelių imti mėginiai. Pro vamzdelius prašvirškšta po 500 µL *n*-heksano. Surinkti ekstraktai laikyti – 20 °C iki tolimesnės analizės.

b) Bulvių šaknų išskiriamų medžiagų analizė dujų chromatografijos metodu. Bulvių šaknų išskiriamos medžiagos analizuotos dujų chromatografu (Clarus 500, Perkin Elmer, JAV) su liepsnos jonizacijos detektoriumi (FID), kolonėlė – DB-Wax (30 m × 0,25 mm, sorbento sluoksnio storis 0,25 µm, Restek, JAV). Detektoriaus ir injektoriaus

temperatūra – 250 °C. Kolonėlės termostato temperatūra programuota tokiu būdu: pradinė – 60 °C palaikyta 2 min., po to 7 °C/min. kelta iki 160 °C, tokia palaikyta 2 min. ir toliau kelta 10 °C/min. iki 250 °C ir dar palaikyta 7 min. Nešančių dujų (H₂) greitis – 1,5 mL/min. Injekcijos tūris – 3 µL.

TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Lietuvos populiacijos bulvinių cistinių nematodų rūšių identifikavimas PGR metodu

Iš visų 10 Lietuvos apskričių surinktų 2815 dirvožemio mėginių rastos ir, remiantis morfologiniais požymiais, identifiкуotos 2419 cistos. Visos jos apibūdintos kaip *G. rostochiensis*, *G. pallida* cistų nenustatyta. Iš apibūdintų 187 *G. rostochiensis* cistų (iš visų Lietuvos apskričių) išskirta DNR ir ištirta PGR metodu. PGR tyrimas, atliktas naudojant Pylypenko *et al.* (2005) rekomenduojamus PGR pradmenis ir sąlygas, parodė, kad tirtų cistų DNR amplifikacijos produktai buvo specifiniai *G. rostochiensis* rūšiai – 423 bp, tuo tarpu *G. pallida* rūšiai būdingų DNR amplifikacijos produktų – 254 bp – negauta (2 pav.). Pradiniame šio tyrimo etape bulvinių cistinių nematodų DNR PGR tyrimas atliktas naudojant Fullaondo *et al.* (1999) rekomenduojamus PGR pradmenis ir sąlygas. Šiuo atveju tirtų cistų DNR amplifikacijos produktai taip pat buvo specifiniai *G. rostochiensis* rūšiai – 315 bp (3 pav.), *G. pallida* rūšiai būdingų DNR amplifikacijos produktų – 798 bp – negauta (3 pav. šie produktai nepateikiami).

Iš 187 tirtų cistų tik 80 cistų (42,8 %) DNR amplifikacija buvo sėkminga (1 lentelė). Tai galėjo lemti šios priežastys: tiriamuose mėginiuose galėjo būti per mažos nematodų DNR koncentracijos (Fleming *et al.*, 1998); tirtos cistos galėjo priklausyti morfologiškai labai panašioms, kartu su bulviniais cistiniais nematodais dažnai dirvoje tarpstančioms nematodų rūšims. Tai – *Globodera achilleae*, kuri parazituoja paprastąsias kraujažoles (*Achillea millefolium*), ir *Globodera artemisiae*, kuri parazituoja paprastuosius kiečius (*Artemisia vulgaris*). Gali būti, kad *G. pallida* Lietuvoje neaptikta dėl teisingai parinktos sėjomainos ir pakankamai gerai vykdomos fitosanitarinės šalyje (Mastauskis, 1955; Кирьянова, 1963; Варшаловича, 1972; Klimakova *et al.*, 1983; VAAT, 1999–2007). Daugumoje Europos valstybių *G. pallida* paplitusi mažiau nei *G. rostochiensis* (Smith *et al.*, 1997; Pylypenko *et al.*, 2005). Tai galėtų būti kita priežastis, kodėl *G. pallida* Lietuvoje aptikta nebuvo. Šiuo metu į Lietuvą importuojama daug bulvių bei kitos augalinės produkcijos iš Vokietijos, Olandijos, Švedijos, Lenkijos (Lukošiūtė, 2005), kur jau yra rasta karantininė *G. pallida* nematodų rūšis (Smith *et al.*, 1997). Neseniai šis cistinis nematodas aptiktas ir Ukrainoje (Pylypenko *et al.*, 2005), tad yra didelė tikimybė *G. pallida* patekti į Lietuvos teritoriją ir čia paplisti.

Bulvinių cistinių nematodų chemoekologinės sąveikos

a) **Nematodų reakcija į augalo šeimnininko (bulvių) ir ne šeimnininko (cukrinių runkelių) šaknų nuoplovas.** Atlikus bulvinių cistinių nematodų *G. rostochiensis* ir *G. pallida* J2 elgseninius testus į augalo šeimnininko – bulvių vandenines šaknų nuoplovas ir į tirpiklį – distiliuotą vandenį pastebėta, kad bulvių šaknų nuoplovas bulviniams cistiniams nematodams buvo žymiai patrauklesnės nei distiliuotas vanduo ($P < 0,05$) (4 pav.). Tokie rezultatai išliko abiem nematodų elgsenos fiksavimo laikais – po 30 min. ir po 60 min. nuo nematodų užnešimo ant terpės su cheminiu stimuliu. Tirtiems nematodams bulvių šaknų išskiriamos medžiagos taip pat buvo žymiai

patrauklesnės nei ne augalo šeimininko – cukrinių runkelių šaknų išskiriamos medžiagos ($P < 0,05$) abiem nematodų elgsenos registravimo laikais (4 pav.). Taigi tyrimo rezultatai liudija, jog šio darbo tolimesniems bulvinių cistinių nematodų elgsenos tyrimams numatomas taikyti testas yra visiškai tinkamas, nes testuojant iš anksto žinomus du skirtingus stimulus (patrauklius ir nepatrauklius nematodams) gauti rezultatai visiškai atitiko laukiamus.

b) Linalolio poveikis bulviniams cistiniams nematodams.

Linalolio toksiškumo bulviniams cistiniams nematodams tyrimas. Distiliuotame vandenyje abiejų bulvinių cistinių nematodų rūšių *G. rostochiensis* ir *G. pallida* J2 išgyveno visą stebėjimo laiką, t. y. 12 dienų. Išgyvenamumas siekė 99 %. Sočiame linalolio tirpale (1×10^{-3} M) per tą patį laikotarpį išgyveno $95 \pm 2,1$ % *G. rostochiensis* ir $97 \pm 1,7$ % *G. pallida* nematodų. Lyginant linalolio ir kontrolės (distiliuoto vandens) poveikį nematodams nenustatyta jokių statistiškai patikimų skirtumų. Tirta linalolio 1×10^{-3} M koncentracija (sotus tirpalas) yra didžiausia galima vandeninė šios medžiagos koncentracija ir ji nematodams nebuvo toksiška. Dėl šios priežasties kitų linalolio koncentracijų toksiškumas nematodams tirtas nebuvo. Apibendrinus šio tyrimo rezultatai galima teigti, kad linalolis nėra toksiškas bulvinių cistinių nematodų J2 stadijai.

Bulvinių cistinių nematodų elgseninės reakcijos į linalolį. Atlikus bulvinių cistinių nematodų elgseninius testus į linalolį, nustatyta, kad linalolis buvo atraktyvus tiek *G. rostochiensis*, tiek *G. pallida* J2. Tačiau skyrėsi abiejų nematodų rūšių reakcijos į šį junginį. Pirmiausia nustatyta, kad *G. rostochiensis* buvo jautresnė linaloliui lyginant su *G. pallida* (5 pav.). Tiek po 30 min., tiek po 60 min. nuo nematodų užnešimo ant terpės su tirpiama chemine medžiaga *G. rostochiensis* mažiausia atraktyvi linalolio koncentracija buvo 1×10^{-4} M, o jos atraktyvumas statistiškai patikimai nesiskyrė nuo bulvių šaknų nuoplovų atraktyvumo ($P > 0,05$) (5 pav.). Tuo tarpu *G. pallida* po 30 min. nuo nematodų užnešimo su testuojama chemine medžiaga mažiausia atraktyvi linalolio koncentracija buvo 1×10^{-2} M, o po 60 min. – 1×10^{-3} M ir taip pat statistiškai nesiskyrė nuo bulvių šaknų nuoplovų atraktyvumo ($P > 0,05$).

Taip pat skyrėsi ir bulviniams cistiniams nematodams atraktyvių linalolio koncentracijų diapazonas. Po 30 min. ir po 60 min. nuo nematodų užnešimo ant terpės su testuojama medžiaga *G. rostochiensis* buvo atraktyvios tos pačios – 1×10^{-2} M – 1×10^{-4} M linalolio koncentracijos (5 pav.). Tačiau *G. pallida* po 30 min. – 1×10^{-1} M ir 1×10^{-2} M, o po 60 min. šis koncentracijų intervalas prasiplėtė tiek į mažesnės, tiek į didesnės koncentracijos sritį ir apėmė koncentracijas nuo 1×10^0 M iki 1×10^{-3} M (5 pav.). Didžiausios koncentracijos linalolio mišiniai (1×10^0 M ir 1×10^{-1} M), atvirkščiai negu *G. pallida* J2 nematodams, *G. rostochiensis* J2 nebuvo atraktyvūs lyginant su kontrole (distiliuotu vandeniu) ($P > 0,05$) abiem rezultatų registravimo laikais (po 30 min. ir po 60 min.). Tai paaiškintina tuo, jog yra žinoma, kad pernelyg didelės cheminės medžiagos dozės slopina įvairių organizmų reakcijas (Diez, Dusenbery, 1989; Stamps, Linit, 1998).

Linalolio kiekio bulvių šaknų nuoplovose nustatymas. Linalolio koncentracija bulvių šaknų nuoplovose, naudotose elgseniniams tyrimams, įvertinta dujų chromatografijos metodu ir nustatyta, kad ji buvo vidutiniškai lygi $9,7 \times 10^{-6}$ M (6 pav.). Ši koncentracija yra 3 kartus mažesnė nei linalolio koncentracijos į kurias bulvinių cistinių nematodų J2 stadija reagavo teigiamai (slenkstinės koncentracijos 1×10^{-4} M ir 1×10^{-3} M). Natūraliomis sąlygomis šaknyse turėtų būti didesnės linalolio

koncentracijos nei bioteste naudotų šaknų nuoplovose, nes bulvių šaknys prieš paruošiant nuoplovas buvo perplaunamos vandenių smėlio dalelėm pašalinti, dėl to kartu buvo pašalinama ir dalis cheminių medžiagų, tame tarpe ir linalolio.

Po linalolio toksiškumo bulviniams cistiniams nematodams tyrimo paaiškėjo, kad, priešingai nei kai kurioms kitoms augalų parazitinių nematodų rūšims, linalolis nėra toksiškas bulviniams cistiniams nematodams. Atvirksčiai, po elgseninio testo į šią medžiagą nustatyta, kad linalolis yra atraktyvus tiek *G. rostochiensis*, tiek *G. pallida* J2 stadijos nematodams. Nepaisant žinomų medžiagų, atraktyvių J2 (Rode, 1965; Evans, 1969), iki šiol nebuvo nustatyta jokia augalinės kilmės cheminė medžiaga, atraktyvi šios stadijos nematodams. Tad mūsų atlikto tyrimo metu pirmą kartą nustatytas *G. rostochiensis* ir *G. pallida* J2 nematodams patrauklus augalinės kilmės cheminis junginys – linalolis. Linalolį į dirvožemio aplinką išskiria ne tik bulvių šaknys, bet ir daugelis kitų augalų rūšių (Knudsen *et al.*, 1993). Taigi linalolis galėtų atlikti nespecifinio atraktanto vaidmenį atskiriant aplinkoje augalus nuo ne augalų.

Yra duomenų apie tai, jog keletas bulvių šaknų nuoplovų frakcijų vilioja bulvinius cistinius nematodus (Devine, Jones, 2003). Be to, atsižvelgiant į mūsų atlikto tyrimo rezultatus, nors statistiškai nepatikima, tačiau gali būti, jog bulvių šaknų išskiriamų cheminių medžiagų mišinys yra patrauklesnis abiem bulvinių cistinių nematodų rūšims nei atskirai paimta medžiaga – linalolis (5 pav.). Tai rodo, kad be linalolio bulvių šaknų nuoplovose turi būti daugiau junginių ar jų mišinių, veikiančių bulvinių cistinių nematodų J2 elgseną ir besiskiriančių specifiskumu.

c) Bulvinių cistinių nematodų elgseninės reakcijos į α -solaniną. Atlikus bulvinių cistinių nematodų elgseninius testus į α -solaniną nustatyta, kad jis buvo atraktyvus tiek *G. rostochiensis*, tiek *G. pallida* J2 stadijai. Abi bulvinių cistinių nematodų rūšys reagavo į tas pačias α -solanino koncentracijas 1×10^{-4} M ir 1×10^{-5} M, reakcija į jas statistiškai patikimai skyrėsi nuo reakcijos į tirpiklį – etanolį ($P < 0,05$) (7 pav.). Be to, buvo nustatyti tarprūšiniai nematodų reakcijų skirtumai į šį cheminį junginį. *Globodera pallida* į α -solaniną reagavo greičiau – po 15 min. nuo nematodų užnešimo ant terpės su chemine medžiaga, tačiau trumpai – vėlesniais rezultatų registravimo laikais – po 30 min. ir po 60 min. *G. pallida* reakcija į α -solaniną išnyko (7 pav.). *Globodera rostochiensis* į junginį reagavo lėčiau – po 30 min. ir po 60 min. ir reakcija išliko ilgiau.

Šio tyrimo metu pirmą kartą nustatyta, kad α -solaninas, augalo šeimininko – bulvių į dirvožemio aplinką išskiriamas specifinis antrinis metabolitas, yra atraktyvus abiem bulvinių cistinių nematodų rūšims. Žinoma, kad keletas bulvių šaknų nuoplovų frakcijų vilioja bulvinius cistinius nematodus (Devine, Jones, 2003), todėl gali būti, kad be linalolio (kurio atraktyvumas nematodams nustatytas mūsų ankstesniuose tyrimuose, 5 pav.) ir α -solanino bulvių šaknų nuoplovose gali būti daugiau ir specifiskesnių medžiagų ar jų mišinių, viliojančių abi bulvinių cistinių nematodų rūšis.

d) Bulvinių cistinių nematodų chemoreptorių slopinimas. Paveikus *G. pallida* J2 stadijos nematodus 3 mM koncentracijos cinko sulfato vandeniniu tirpalu reakcija į atraktyvų junginį – α -solaniną buvo slopinama. Šis cinko sulfato poveikis nematodams išliko visame poveikio druskos tirpalu trukmių intervale – nuo 2 min. iki 30 min. bei statistiškai patikimai skyrėsi nuo distiliuoto vandens poveikio ($P < 0,05$) (8 pav.). Pastebėta, kad trumpai – 2 min. paveikus nematodus tokios pat koncentracijos kaip cinko sulfatas vandeniniu magnio sulfato tirpalu taip pat buvo slopinama *G. pallida* J2 stadijos nematodų reakciją į α -solaniną (8 pav.). Ši nematodų reakcija taip pat statistiškai

patikimai skyrėsi ($P < 0,05$) nuo nematodų reakcijos į α -solaniną veikiant distiliuotu vandeniu. Po ilgesnės ekspozicijos – 5–30 min. magnio sulfato tirpalu nematodų reakcijos į α -solaniną slopinimas išnyko – nematodai adaptavosi šios druskos poveikiui (8 pav.). Toks rezultatas galėtų būti aiškinamas ne pačios cheminės medžiagos, bet aplinkos pasikeitimo, t. y. streso sukeltu poveikiu. Per ilgesnį ekspozicijos laiką nematodai prie magnio sulfato tirpalo priprato ir liekamojo poveikio reakcijoms į atraktyvią medžiagą (α -solaniną) neliko.

Šio tyrimo metu pirmą kartą nustatyta, jog cinko sulfatas vandeninis tirpalas slopina *G. pallida* reakcija į atraktyvų cheminį stimulą – α -solaniną. Lyginant su magnio sulfato tirpalu, cinko sulfato tirpalas efektyviai sutrikdo normalią nematodų elgseną į atraktyvų stimulą. Trikdymo efektas sukliamas tiek po trumpalaikės (2 min.), tiek ir po ilgesnės ekspozicijos (5–30 min.) tirpale. Ryšium su tuo, kad bulvinių cistinių nematodų rūšys labai artimos, manytina, kad cinko sulfatas turėtų slopinti ir *G. rostochiensis* chemoreceptorių veiklą. Mūsų aptiktas slopinamas cinko sulfato tirpalo poveikis yra naujas ir gali būti panaudotas tiek elektrofiziologijos, tiek elgsenos lauko sąlygomis tyrimuose.

Bulvių šaknų išskiriamų medžiagų tyrimas

a) Bulvių šaknų į substratą išskiriamų medžiagų tirpiklio tinkamumo patikra elgseniniu testu. Atlikus bulvinių cistinių nematodų *G. rostochiensis* ir *G. pallida* J2 elgseninius testus į n -heksanu ekstrahuotas bulvių šaknų nuoplovas ir nematodų elgseną fiksuojant po 30 min. ir po 60 min. nuo nematodų užnešimo ant terpės su chemine medžiaga, nustatyta, kad n -heksanu ekstrahuotos bulvių nuoplovos buvo atraktyvios abiem bulvinių cistinių nematodų rūšims (9 pav.). Reakcija į jas statistiškai patikimai skyrėsi nuo reakcijos į kontrolę – distiliuotą vandenį ($P < 0,05$). n -Heksanu neekstrahuotos, t. y. vandeninės bulvių šaknų nuoplovos, taip pat buvo atraktyvios *G. rostochiensis* ir *G. pallida* J2 stadijos nematodams (9 pav.). Nustatyti statistiškai patikimi nematodų reakcijos į vandenines bulvių šaknų nuoplovas ir į distiliuotą vandenį skirtumai ($P < 0,05$) abiem nematodų reakcijos į šias medžiagas fiksavimo laikais. Statistinių skirtumų tarp reakcijos į n -heksanu ekstrahuotas ir į vandenines bulvių šaknų nuoplovas nenustatyta ($P > 0,05$) (9 pav.), t. y. tiek n -heksanu ekstrahuotos, tiek vandeninės bulvių šaknų nuoplovos abiejų rūšių nematodams buvo atraktyvios. Taigi šio elgseninio testo metu nustatyta, kad n -heksanas yra tinkamas tirpiklis ekstrahuoti bulvių šaknų į aplinką išskiriamas ir nematodams atraktyvias chemines medžiagas.

b) Bulvių šaknų į substratą išskiriamų medžiagų analizė dujų chromatografijos metodu. Šešių savaičių bulvių šaknų į substratą išskiriamų medžiagų ekstraktų lyginamoji analizė parodė, jog be daugelio tų pačių junginių, stebimų 1–6 savaitės ekstraktų chromatogramose, 3–6 savaitės ekstraktuose išryškėja trys junginiai, kurių sulaikymo trukmės yra 28,4; 29,8 ir 31,2 min. (10 pav.). Šio, bulvių šaknų į substratą išskiriamų medžiagų tyrimo metu, bulvės sudygo per pirmąją savaitę po pasodinimo. Manytina, jog šie trys junginiai, aptinkami bulvių išskyrose jau nuo trečios savaitės, gali būti vertintini kaip potencialiai bioaktyvūs junginiai, veikiantys bulvinių cistinių nematodų *G. rostochiensis* ir *G. pallida* J2 stadijos elgseną.

Ankstesniuose šio darbo tyrimuose nustatyta, kad linalolis ir α -solaninas yra atraktyvūs tiek *G. rostochiensis*, tiek ir *G. pallida* J2 stadijai (5; 7 pav.). Linalolio kiekio bulvių šaknų nuoplovose chromatografinio tyrimo metu nustatyta, kad linalolio sulaikymo trukmė chromatografo kolonėlėje yra 13,2 min. (6 pav.), o α -solanino

neįmanoma nustatyti dujų chromatografijos metodu dėl jo fizinių savybių. Šio junginio lydymosi temperatūra yra 271–273 °C – aukštesnė nei kolonėlės termostato temperatūra (pagal gamintojo rekomendacijas) – 250 °C. Sprendžiant pagal bulvių šaknų išskiriamų medžiagų chromatografinį profilį, į substratą iš bulvių šaknų išsiskiriami trys potencialiai bioaktyvūs junginiai (10 pav.) yra kiti nei linalolis ar α -solaninas.

Pirmą kartą mūsų darbe silikono vamzdeliai buvo pritaikyti ekstrahuoti bulvių šaknų išskiriamas potencialiai bioaktyvias chemines medžiagas. Norint identifikuoti jų cheminę sudėtį, reikalingi tolimesni tyrimai, kuriems galėtų pasitarnauti mūsų gauti rezultatai.

IŠVADOS

1. Atlikus morfologinę ir molekulinę (PGR) bulvinių cistinių nematodų cistų, surinktų dirvožemio mėginiuose iš visų 10 Lietuvos apskričių, analizę nustatyta, kad Lietuvoje aptinkama tik *G. rostochiensis* rūšis (paplitusi visose apskrityse), o *G. pallida* – neaptinkama.
2. Skirtingai nei kitų augalų parazitinių rūšių nematodams, linalolis nėra toksiškas *G. rostochiensis* ir *G. pallida* J2 stadijos nematodams.
3. Bulvių šaknų išskiriamas nespecifinis metabolitas linalolis ir specifinis metabolitas α -solaninas yra atraktyvūs bulvinių cistinių nematodų *G. rostochiensis* ir *G. pallida* J2 stadijai.
4. *G. rostochiensis* jautrumas linaloliui didesnis yra nei *G. pallida* (slenkstinės koncentracijos 1×10^{-4} M ir 1×10^{-3} M). Pagal jautrumo slenkstį α -solaninui tarprūšinių skirtumų neužregistruota, tačiau skiriasi reakcijos greitis: *G. pallida* į α -solaniną reaguoja greičiau (po 15 min. nuo nematodų užnešimo ant terpės su cheminiu stimulu), tačiau trumpai, vėliau (po 30 min. ir po 60 min.) reakcija į jį išnyksta; *G. rostochiensis* į α -solaniną reaguoja lėčiau (po 30 min. ir po 60 min.) ir reakcija išlieka ilgiau.
5. Cinko sulfato 3 mM koncentracijos vandeninio tirpalo dviejų minučių ir ilgesnė ekspozicija slopina *G. pallida* J2 stadijos chemoatraktyvumą veikiant α -solaninu.
6. Elgseniniu testu nustatyta, jog bulvinių cistinių nematodų *G. rostochiensis* ir *G. pallida* privilegijimą prie augalo šeimininko lemiančias chemines medžiagas galima ekstrahuoti *n*-heksanu.
7. Atlikus bulvių šaknų išskiriamų medžiagų, ekstrahuotų *n*-heksanu, lyginamąją analizę dujų chromatografijos metodu, nustatyta, jog emisijose yra ne mažiau nei trys cheminiai junginiai, kurie atsiranda tuo laikotarpiu, kai bulvių šaknys nematodams yra atraktyviausios. Šie junginiai yra kiti, nei mūsų nustatyti atraktantai – linalolis ir α -solaninas, nes sulaikymo laikai dujų chromatografijos kolonėlėje yra skirtingi 28,4; 29,8 ir 31,2 min.

REFERENCES

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Alberts J. R., 1974. Producing and interpreting experimental olfactory deficits. *Physiology & Behavior* 12: 657–670.
- Balakrishnan R., Pollack G. S., 1997. The role of antennal sensory cues in female responses in the cricket *Teleogryllus oceanicus*. *The Journal of Experimental Biology* 200: 511–522.
- Baldwin J. G., Mundo-Ocampo, 1991. Heteroderinae, cyst- and non-cyst-forming nematodes. In: Nicke W. R. (Ed.), *Manual of Agricultural Nematology*. Marcel Dekker, New York, US: 275–362.
- Baužienė V., Būda V., 2010. Importance of chemical stimuli in precopulatory behavior of black flies *Simulium lineatum* Mg. (Diptera: Simuliidae). *Acta Zoologica Lituanica* 20 (1): 31–36.
- Brown E. B., 1969. Assessment of the damage caused to potatoes by potato cyst eelworm *Heterodera rostochiensis* Woll. *Annals of Applied Biology* 63: 493–502.
- Brzeski M. W., 1998. *Nematodes of Tylenchina in Poland and Temperate Europe*. Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Warsaw, PL: 396.
- CD, 2000. Council Directive 2000/29/EC on protective measures against the introduction into the Community of organisms harmful to plants or plant products and against their spread within the Community, Brussels.
- Chatterjee A., Sukul N. C., Laskar S., Ghoshmajumdar S., 1982. Nematicidal principles from two species of Lamiaceae. *Journal of Nematology* 1 (1): 118–120.
- Clarke A. J., Hennessy J., 1984. Movement of *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) juveniles stimulated by potato root exudates. *Nematologica* 30 (2): 206–212.
- Devine K. J., Jones P. W., 2003. Investigations into the chemoattraction of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* towards fractionated potato root leachate. *Nematology* 5 (1): 65–75.
- Diez J. A., Dusenbery D. B., 1989. Repellent of root-knot nematodes from exudate of host roots. *Journal of Chemical Ecology* 15: 2445–2455.
- Dobosz R., Obrepalska-Stepłowska A., Kornobis S., 2006. *Globodera artemisiae* (Eroshenko, Kazachenko, 1972) (Nematoda: Heteroderidae) from Poland. *Journal of Plant Protection Research* 46: 403–407.
- Eich E., 2008. *Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary metabolites: Biosynthesis, chemotaxonomy, biological and economic significance (a handbook)*. Springer-Verlag, Berlin: 399–447.
- Evans K., 1969. Apparatus for measuring nematode movement. *Nematologica* 15: 433–435.
- FAO, 2007. *Glossary of phytosanitary terms*. ISPM No. 5, Rome.
- FAO, 2008. *Potato world: production and consumption*. FAOSTAT, www.potato2008.org.
- Farrer L. A., Phillips M. S., 1983. *In vitro* hatching of *Globodera pallida* in response to *Solanum vernei* and *S. tuberosum* × *S. vernei* hybrids. *Revue de Nématologie* 6: 165–169.
- Fleming C. C., Turner S. J., Powers T. O., Szalansky A. L., 1998. Diagnostics of cyst nematodes: use of the polymerase chain reaction to determine species and estimate population levels. *Aspects of Applied Biology* 52: 375–382.
- Fullaondo A., Barrena E., Viribay M., Barrena I., Salazar A., Ritter, E., 1999. Identification of potato cyst nematode species *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* by PCR using specific primer combinations. *Nematology* 1: 157–163.
- Groh C., Brockmann R. A., Altwein M., Tautz J., 2002. Selective blocking of contact chemosensilla in *Apis mellifera*. *Apidologie* 33: 33–40.
- Hawkes J. G., 1999. The economic importance of the family *Solanaceae*. In: Nee M., Symon D., Lester R. N., Jessop J. P. (Eds.), *Solanaceae IV – advances in taxonomy and utilization*. Royal Botanic Gardens, Kew: 1–8.
- Hong R. L., Sommer R. J., 2006. Chemoattraction in *Pristionchus* nematodes and implications for insect recognition. *Current Biology* 16: 2359–2365.
- Hong R. L., Svatoš A., Herrmann M., Sommer R. J., 2008. Species-specific recognition of beetle cues by nematode *Pristionchus maupasi*. *Evolution & Development* 10 (3): 273–279.
- Ibrahim S. K., Trabolusi A. F., El-Haj S., 2006. Effect of essential oils and plant extracts on hatching, migration and mortality of *Meloidogyne incognita*. *Phytopathologia Mediterranea* 45 (3): 238–246.
- Jones J. T., Perry R. N., Johnston R. L., 1994. Changes in the ultrastructure of the amphids of the potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, during development and infection. *Fundamental and Applied Nematology* 17 (4): 369–382.
- Klimakova J, Jefremenko V., Žeimantienė E., 1983. *Bulvinė nematoda ir kovos su ja priemonės Lietuvos TSR*. Lietuvos TSR Žemės ūkio ministerija, Vilnius: 3.
- Knudsen J. T., Tollsen L., Bergström G., 1993. Floral scents: A check-list of volatile compounds isolated by head-space techniques. *Phytochemistry* 33: 253–280.

- Köllner T. G., Held M., Lenk C., Hiltbold I., Turlings T. C. J., Gershenzon J., Degenhardt J., 2008.** A maize (*E*)- β -caryophyllene synthase implicated in indirect defense responses against herbivores is not expressed in most American maize varieties. *The Plant Cell* 20: 482–492.
- Kong J.-OK, Park Il-K., Choi K.-S., Shin S.-Ch., Ahn Y.-J., 2007.** Nematicidal and propagation activities of thyme red and white oil compounds toward *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae). *Journal Nematology* 39 (3): 237–242.
- Leela N. K., Khan R. M., Reddy P. P., Nidiry E. S. J., 1992.** Nematicidal activity of essential oil of *Pelargonium graveolens* against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Nematologia Mediterranea* 20: 57–58.
- Lukošiūtė I., 2005.** Bulvės. *Rinkotyra Žemės ūkio ir maisto produktai* 4 (30): 20.
- Malik M. S., Sangwan N. K., Dhindsa K. S., Verma K. K., Bhatti D. S., 1987.** Nematicidal efficacy of some monoterpenes and related derivatives. *Pesticides* 21: 30–32.
- Manduric S., Anderson S., 2004.** The identification of Swedish *Globodera* (Nematoda, Heteroderidae) populations, following comparisons with known populations of *G. artemisiae* (Eroshenko, Kazachenko, 1972) Behrens, 1975. *Russian Journal of Nematology* 12: 39–44.
- Mastauskis S., 1955.** *Lietuvos SSR fitonematodai*. Autoreferatas daktaro disertacijai, Aukštojo mokslo ministerija, Kaunas Lietuvos SSR: 10–11.
- Pylypenko L. A., Uehara T., Phillips M. S., Sigareva D. D., Blok V. C., 2005.** Identification of *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* in the Ukraine by PCR. *European Journal of Plant Pathology* 111: 39–46.
- Rawsthorne D., Brodie B., 1986.** Relationship between root growth of potato, root diffusate production, and hatching of *Globodera rostochiensis*. *Journal of Nematology* 18 (3): 379–384.
- Robinson M. P., Atkinson H. J., Perry R. N., 1987.** The influence of soil moisture and storage time on the motility, infectivity and lipid utilization of second stage juveniles of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Revue de Nématologie* 10: 343–348.
- Rode H., 1965.** Über einige Methoden zur Verhaltensforschung bei Nematoden. *Pedobiologia* 5: 1–16.
- Rolfe R. N., Barrett J., Perry R. N., 2000.** Analysis of chemosensory responses of second stage juveniles of *Globodera rostochiensis* using electrophysiological techniques. *Nematology* 2: 523–533.
- Sangwan N. K., Verma B. S., Verma K. K., Dhindsa K. S., 1990.** Nematicidal activity of some essential plant oils. *Pesticide Science* 28: 331–35.
- Smith I. M., McNamara D. G., Scott P. R., Holderness M., 1997.** *Quarantine pests for Europe, 2nd Edition*. EPPO/CABI, Wallingford, UK: 1425.
- Stamps W. T., Linit M. J., 1998.** Chemotactic response of propagative and dispersal forms of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* to beetle and pine derived compounds. *Fundamental and Applied Nematology* 21: 243–250.
- VAAT, 1999.** *Augalų apsauga*. Lietuvos Respublikos Valstybinė Augalų apsaugos tarnyba, Vilnius: 11.
- VAAT, 2000.** *Augalų apsauga*. Lietuvos Respublikos Valstybinė Augalų apsaugos tarnyba, Vilnius: 10.
- VAAT, 2001.** *Augalų apsauga*. Lietuvos Respublikos Valstybinė Augalų apsaugos tarnyba, Vilnius: 25.
- VAAT, 2002.** *Augalų apsauga*. Lietuvos Respublikos Valstybinė Augalų apsaugos tarnyba, Vilnius: 32.
- VAAT, 2003.** *Augalų apsauga*. Lietuvos Respublikos Valstybinė Augalų apsaugos tarnyba, Vilnius: 55.
- VAAT, 2004.** *Augalų apsauga*. Lietuvos Respublikos Valstybinė Augalų apsaugos tarnyba, Vilnius: 99.
- VAAT, 2005.** *Augalų apsauga*. Lietuvos Respublikos Valstybinė Augalų apsaugos tarnyba, Vilnius: 86.
- VAAT, 2006.** *Augalų apsauga*. Lietuvos Respublikos Valstybinė Augalų apsaugos tarnyba, Vilnius: 84.
- VAAT, 2007.** *Augalų apsauga*. Lietuvos Respublikos Valstybinė Augalų apsaugos tarnyba, Vilnius: 31.
- Walker J. T., Melin J. B., 1996.** *Mentha x piperita*, *Mentha spicata* and effects of their essential oils on *Meloidogyne* in soil. *Supplement Journal of Nematology* 24: 629–635.
- Weischer B., 1959.** Experimentelle Untersuchungen über die Wandenburg von Nematoden. *Nematologica* 4: 172–186.
- Zouhar M., Rysanek O., Kocova M., 2000.** Detection and differentiation of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* by PCR. *Plant Protection Science* 36: 81–84.
- Варшалоновича А. А., 1972.** *Руководство по досмотру и экспертизе растительных и других подкарантинных материалов*. Из. Колос, Москва: 440.
- Кирьянова Е. С., 1963.** *Методы исследования нематод растений, почвы и насекомых*. Издательство академии наук СССР, Ленинград, Москва: 33–38.

LIST OF PUBLICATIONS CONTAINING MATERIAL OF THE DISSERTATION

MOKSLINĖS PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA

1. Būda V. and Čepulytė-Rakauskienė R., 2011. The effect of linalool on second-stage juveniles of potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. *Journal of Nematology* (USA) – in press.
2. Čepulytė R., Būda V., 2010. Augalų parazitinių nematodų chemoekologinės sąveikos. *Mokslas gamtos mokslų fakultete*. Vilniaus universiteto leidykla, Vilnius: 42–61.
3. Jogaitė V., Čepulytė R., Stanelis A., Būda V., 2007. Monitoring of *Globodera* spp. in Lithuania using diagnostic morphometric analysis and polymerase chain reaction. *Acta Zoologica Lituanica* 17 (2): 184–186.

ABSTRACTS OF CONFERENCE REPORTS

KONFERENCIJŲ TEZĖS

1. Čepulytė R., Būda V., 2010. Kairomone attractant of the potato cyst nematodes. *The 26th ISCE Annual Meeting. Meeting Overview*, 31 July – 04 August, Tours, France: 258.
2. Čepulytė-Rakauskienė R., Būda V., 2011. α -Solanine effect on potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* second-stage juveniles. *The 27th ISCE Annual Meeting. Meeting Overview*, 24–28 July, British Columbia, Canada: 94.

CURRICULUM VITAE

Name: Rasa Čepulytė-Rakauskienė

Date and place of birth:

8th of November, 1981, Šiauliai, Lithuania

Education:

2007–2011: PhD studies in Ecology and Environmental Sciences, Vilnius University.

2004–2007: MSc in Ecology and Environmental Sciences, Vilnius University.

2000–2004: BSc in Biology, Vilnius University.

Appointment and position:

2007–present: Senior specialist at Phytosanitary Research Laboratory (Division), State Plant Service under the Ministry of Agriculture.

2010–present: Junior researcher at Laboratory of Chemical and Behavior Ecology of Nature Research Centre Institute of Ecology.

Office address:

State Plant Service under the Ministry of Agriculture

Phytosanitary Research Laboratory (Division)

Sukilėlių Str. 9A, LT-11352

Vilnius-30, Lithuania

Phone: + 370 526 16 801

E-mail: rasacepulyte@gmail.com

Nature Research Centre

Institute of Ecology

Akademijos Str. 2, LT-08412

Vilnius-21, Lithuania

Phone: + 370 527 29 242