

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Rasa Čepulytė-Rakauskienė

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

Daktaro disertacija

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)

## TURINYS

<b>ĮVADAS</b> .....	5
<b>1. LITERATŪROS APŽVALGA</b> .....	11
1.1. Bulvinių cistinių nematodų biologija .....	11
1.2. Bulvinių cistinių nematodų pagrindiniai morfologiniai požymiai .....	14
1.3. Augalų parazitinių nematodų chemorecepcija .....	18
1.4. Bulvinių cistinių nematodų sukeliama pažeidimai bulvėms ir kovos būdai su šiais kenkėjais .....	21
1.5. Bulvių išskiriamos medžiagos .....	23
1.6. Augalų parazitinių nematodų chemoekologinės sąveikos .....	24
1.6.1. Augalų parazitinių nematodų elgseniniai testai chemoekologinėms sąveikoms nustatyti .....	26
1.6.2. Kairomonai, jų poveikis ir cheminė sudėtis .....	28
1.6.3. Ritimosi veiksniai, jų poveikis ir cheminė sudėtis .....	29
1.6.4. Feromonai, jų poveikis ir cheminė sudėtis .....	32
1.7. Augalų parazitinių nematodų chemoreceptorius slopinančios medžiagos .....	34
<b>2. MEDŽIAGA IR METODIKA</b> .....	35
2.1. Medžiaga .....	35
2.2. Metodai .....	37
2.2.1. Bulvinių cistinių nematodų rūšių identifikavimas .....	37

2.2.2. Augalo šeimininko (bulvių) ir ne šeimininko (cukrinių runkelių) šaknų nuoplovų paruošimas .....	39
2.2.3. Bulvių šaknų nuoplovų ekstrahavimas .....	41
2.2.4. Linalolio kiekio nustatymas bulvių šaknų nuoplovose .....	41
2.2.5. Bulvinių cistinių nematodų elgsenos tyrimai.....	42
2.2.6. Bulvių šaknų išskiriamų medžiagų mikroekstrakcija ir chromatografinė analizė.....	47
<b>3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....</b>	<b>50</b>
3.1. Lietuvos populiacijos bulvinių cistinių nematodų rūšių identifikavimas PGR metodu .....	50
3.2. Bulvinių cistinių nematodų chemoekologinės sąveikos .....	53
3.2.1. Nematodų reakcija į augalo šeimininko (bulvių) ir ne šeimininko (cukrinių runkelių) šaknų nuoplovas .....	53
3.2.2. Linalolio poveikis bulviniams cistiniams nematodams .....	55
3.2.3. $\alpha$ -Solanino poveikis bulviniams cistiniams nematodams .....	60
3.2.4. Bulvinių cistinių nematodų chemoreptorių slopinimas.....	63
3.3. Bulvių šaknų išskiriamų medžiagų tyrimas .....	66
<b>5. LITERATŪRA.....</b>	<b>72</b>
<b>MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS .....</b>	<b>92</b>
<b>PRIEDAI.....</b>	<b>93</b>
1 Priedas .....	93
2 Priedas .....	95

## ĮVADAS

### Temos 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 apsodinta 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 šeimnininkais, gebėjimo plisti, unikalios adaptacijos ilgą laiką išbūti dirvoje be augalo šeimnininko 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 karantininių<sup>1</sup> organizmų sąrašą (CD, 2000). Lietuvoje už karantininių organizmų, tame trape *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

---

<sup>1</sup> 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).

(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 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  $\alpha$ -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 šeštojoje VU 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 metodika, 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 Jogaitei (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.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Bulvinių cistinių nematodų biologija

Bulvinių cistinių nematodų *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923) Behrens, 1975 ir *Globodera pallida* (Stone, 1973) Behrens, 1975 gyvenimo ciklas susideda iš 6 stadijų: kiaušinėlio, 4 juvenilinių (jaunatvinių), tarp kurių vyksta kutikulės nėrimasis, ir suaugėlio. Bulviniai cistiniai nematodai yra skirtalyčiai. Maisto medžiagų kiekis aplinkoje įtakoja lyčių vystymąsi: esant jų pakankamai – formuojasi daugiau patelių, esant trūkumui – patinų (Trudgill, 1967). Dirvožemyje žiemoja nebegyvos patelės – cistos, kurių viduje būna keli šimtai kiaušinėlių.

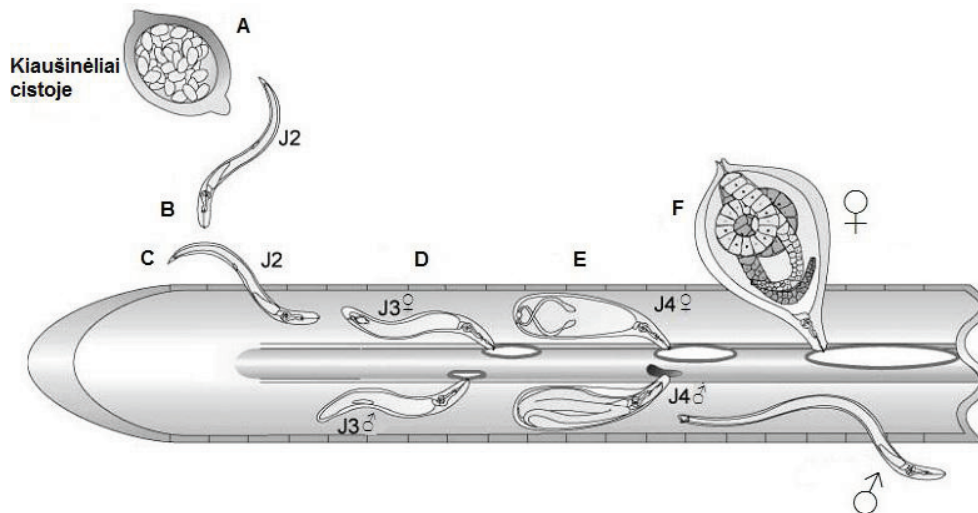
Pirmos juvenilinės stadijos (J1) nematodai išsivysto dar kiaušinėlyje. Po J1 nėrimosi, iš kiaušinėlio išsivysta antros juvenilinės (J2) stadijos nematodai. Paprastai ritimasi stimuliuoja bulvinių (Solanaceae) šeimos augalų šaknų išskiriamos medžiagos, daugiausia jų išskiria šaknų galiukai (Rawsthorne, Brodie, 1986). Išsivysta apie 80 % cistos nematodų (Fenwick, 1949). J2 gali rintis spontaniškai – nesant augalui šeimininkui, tačiau esant pakankamai drėgmės ir tinkamai dirvožemio temperatūrai (virš 10 °C) (Ferris, 1956), tada ritimasis siekia 30 % (Oostenbrink, 1950; Devine *et al.*, 1999).

Nustatyta, kad bulvių šaknų nuoplovos stimuliuoja ne tik ritimąsi, bet ir J2 judėjimą (*movement*) bei migraciją (Weischer, 1959; Clarke, Hennessy, 1984; Devine, Jones, 2003). Chemoreceptoriais pajutę augalo šeimininko šaknų išskiriamas patrauklias chemines medžiagas (Jones *et al.*, 1994), bulvinių cistinių nematodų J2 migruoja iš cistos link augalo šeimininko šaknų ir į jas įsiskverbia. Šios stadijos nematodai nesimaitina, todėl per 6–11 dienų turi surasti augalą šeimininką, antraip, išnaudoję endogeninius energijos šaltinius, gali žūti (Robinson *et al.*, 1987a). Dėl to, kad J2 nesimaitina, dar kitaip yra vadinami invazinės stadijos nematodais.

J2 patenka į augalą per šaknies galiukus pradurdami stiletu (burnoje esančia tuščiavidure vamzdelio formos struktūra) epidermio ląsteles. Patekę į

augalą nematodai audiniais keliauja link žievės, periciklio ar endodermio ląstelių ir neriasi. Nematodų lytis apsprendžiama J2 stadijos gale. Trečios juvenilinės (J3) stadijos nematodai maitinasi pradūrę ląsteles (žievės, periciklio ar endodermio) stiletu ir siurbdami jo pagalba maistingas medžiagas. Dėl nematodų išskiriamų fermentų pradurtos bei jos šonuose esančių ląstelių sienelės lizuojasi ir susiformuoja viena didelė daugialąstė maitinančioji ląstelė vadinama *syncytium*. Ketvirtos juvenilinės (J4) stadijos patelių kūno forma keičiasi – apvalėja. J4 patinai lieka kirmėliškos formos, nustoja maitintis, jų suformuotas *syncytium* pradeda nykti. Augantis suaugėlės patelės kūnas praplėšia žievę ir išlenda į šaknies paviršių, šaknyje lieka tik kaklas ir galva. Išlindę į šaknies paviršių J4 patinai neriasi, virsta suaugėliais ir apvaisina pateles. Patinai gyvena apie 10 dienų (Evans, 1970). Apvaisintų patelių kutikulės dangalas sustorėja, keičiasi jo spalva: *G. rostochiensis* iš pradžių būna baltas, vėliau – geltonas (auksinis) ar rudas; *G. pallida* – iš baltos spalvos virsta tiesiai į rudą (Carta *et al.*, 2005). Apvaisintos patelės miršta, jų kutikulė virsta apsaugine cista su 200–500 kiaušinėliais. Cistos atitrūksta nuo šaknies ir taip žiemoja. Schematizuotas cistinių nematodų gyvenimo ciklas pavaizduotas 1.1.1 paveiksle.

Vystymosi trukmė nuo J2 ritimosi iki suaugėlio trunka 38–45 dienas (Spears, 1968). Cista dirvožemyje be augalo šeimininko gyvybinga gali išlikti iki 20–30 metų (Turner, 1996). Per vieną vegetacijos periodą išsivysto viena nematodų karta, nes nematodams prieš išsiritant iš cistos, būtinas ramybės periodas (Turner, Evans, 1998).



**1.1.1 pav.** Cistinių nematodų (dvelyčių) gyvenimo ciklo schema skersiniame šaknies pjūvyje (Lilley *et al.*, 2005). **A.** Dirvožemyje žiemoja cista su jos viduje esančiais kiaušinėliais. **B.** Esant palankioms aplinkos sąlygoms išsiritę iš kiaušinėlių antros juvenilinės stadijos (J2) nematodai migruoja link augalo šeimininko šaknų. **C.** J2 įsiskverbia į šaknį ir migruoja ląstelėmis link žievės, periciklio ar endodermio ląstelių. **D.** Trečios juvenilinės (J3) stadijos nematodai suformuoja maitinimosi ląsteles – *syncytium*. **E.** Ketvirtos juvenilinės (J4) stadijos patelių kūno forma keičiasi – apvalėja, o J4 patinai lieka kirmėliškos formos, nustoja maitintis, jų suformuoti *syncytium* pradeda nykti. **F.** J4 patinai prasiskverbia į šaknies paviršių, neriasi ir apvaisina pateles, kurių kūnai būna išlindę į paviršių (išskyrus kaklą ir galvą). Kiaušinėliai formuojasi patelės kūne, kuris patamsėja ir virsta cista.

Bulviniai cistiniai nematodai skirstomi į patotipus pagal jų gebėjimą daugintis ant bulviniams cistiniams nematodams atsparių *Solanum* genties augalų, turinčių atsparumą lemiančius genus ar jų kompleksus. Atsparumo nematodams genai nustatyti Andų laukinėse ir kultūrinėse bulvėse. Atsparumu pasižyminčios augalų šaknys išskiria tokias pat atraktyvias nematodams medžiagas kaip ir neatsparios veislės, tačiau nematodai negali ant šių augalų šaknų vystytis, nes *syncytium* nekrotizuojasi, ko pasekoje nematodai žūsta (Rice *et al.*, 1987). Pastebėta, kad kai kurie *G. rostochiensis* ir *G. pallida*

nematodai gebėjo daugintis ant atsparių nematodams bulvių. Taip ilgalaikė koevoliucija su augalais šeiminkais suformavo rūšies viduje genetiškai ir virulentiškai besiskiriančius *G. rostochiensis* ir *G. pallida* patotipus. Šiuo metu skiriami penki *G. rostochiensis* patotipai (Ro1–Ro5) ir trys *G. pallida* patotipai (Pa1–Pa3) (Canto Saenz, de Scurrah, 1977; Kort *et al.*, 1977). Pasaulyje labiausiai paplitęs *G. rostochiensis* Ro1 ir *G. pallida* Pa2 patotipai (Turner, Evans, 1998). Iki šiol Lietuvoje nustatytas tik *G. rostochiensis*, užregistruotas 1948 metais (Mastauskis, 1955; Кирьянова, 1963), ir identifikuotas jo Ro1 patotipas (Саботников, 1986).

Augalai šeiminkai – vienas svarbiausių biotinių veiksnių, įtakančių bulvinių cistinių nematodų paplitimą bei populiacijos gausumą. Kiti biotiniai veiksniai, tokie kaip ligas sukeliantys organizmai, parazitai ir plėšrūnai, dar nėra pakankamai ištirti. Bulvinių cistinių nematodų paplitimas ir gausumas taip pat priklauso nuo daugelio abiotinių veiksnių: temperatūros – *G. rostochiensis* tiek ritasi, tiek dauginasi geriau esant šiltesnėms (15–25 °C) aplinkos sąlygoms, o *G. pallida* – vėsesnėms (10–21 °C) (Franco, 1979; Robinson *et al.*, 1987b); drėgmės; dirvožemio tipo – geriausia tarpsta smėlinguose dirvožemiuose (Dekker, 1969) ir kt. Nematodai plinta prisitvirtinę ant bulvių gumbų, taip pat su užkrėstu dirvožemiu, žemės ūkio padargais, juos gali pernešti gyvūnai, žmonės, tekantis vanduo, vėjas. Tad, net jei ir imamasi apsaugos priemonių, nematodų plitimas – sunkiai stabdomas procesas.

## **1.2. Bulvinių cistinių nematodų pagrindiniai morfologiniai požymiai**

Bulvinių cistinių nematodų rūšys paprastai skiriamos pagal cistų ir J2 stadijos nematodų morfologinius požymius. Būtent cistos su jose esančiais kiaušinėliais ir J2 (jei yra išsiritusių) aptinkamos dirvožemio mėginiuose (kurie renkami pavasarį arba rudenį), paimtuose tirti šių nematodų paplitimą.

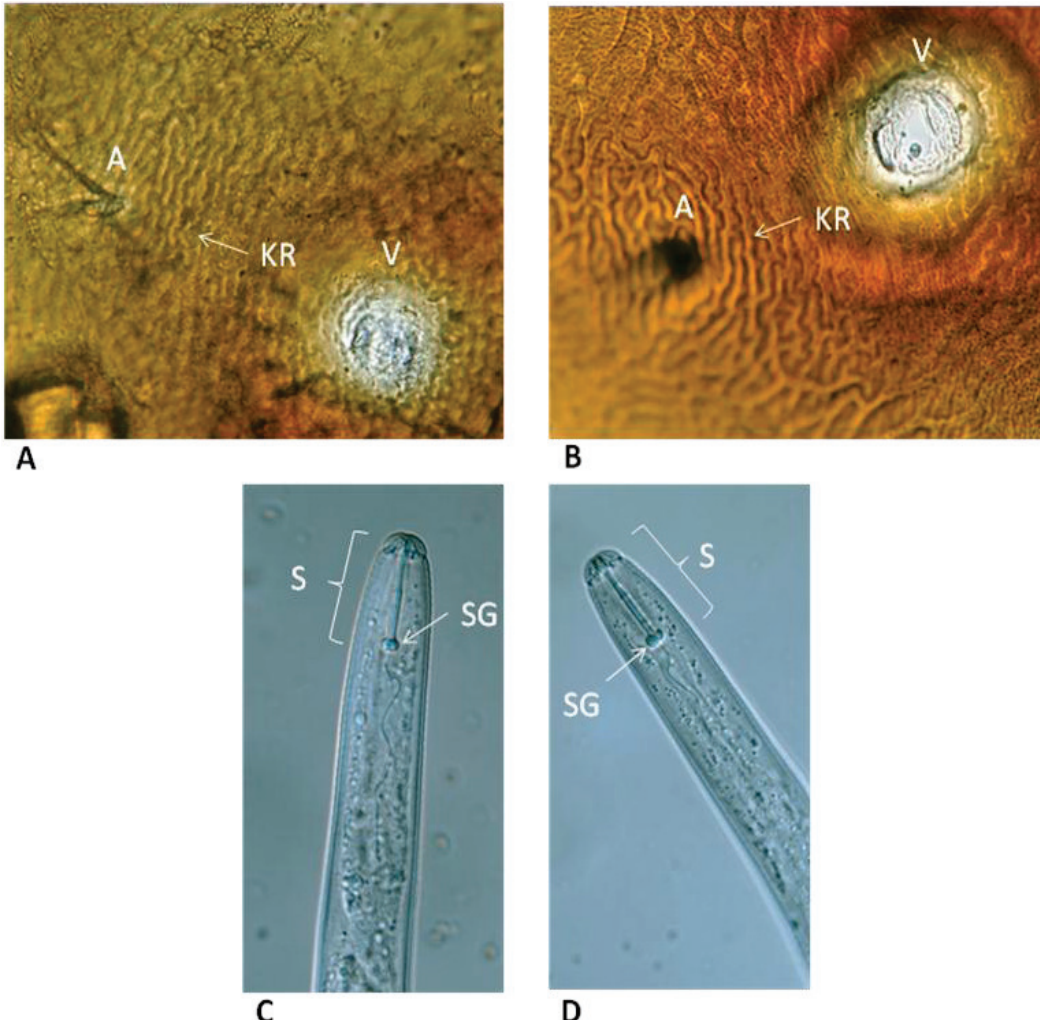
Bulvinių cistinių nematodų cistos (patelės) rutuliškos, kartais kriaušės formos su kyšančia cefaline dalimi, apie 450 µm skersmens (Baldwin, Mundo-Ocampo, 1991). Cistos kutikulė su aiškiomis zigzago formos raukšlėmis,

analinė anga ir vulva išsidėstę greta. Cistos viduje esantys kiaušinėliai yra apie 100 µm ilgio, 4 µm skersmens (Baldwin, Mundo-Ocampo, 1991). J2 kūnas kirmėliškas, į galus smailėja, kūno ilgis – 445–510 µm (Stone, 1973).

Svarbiausi bulvinių cistinių nematodų rūšių skiriamieji požymiai yra (skliausteliuose pažymėtos vidutinės vertės) (1.2.1 pav., 1 lentelė) (Baldwin, Mundo-Ocampo, 1991; Brzeski, 1998; Manduric, Anderson, 2004; Dobosz *et al.*, 2006):

- ✓ cistos kutikulės raukšlių skaičius tarp analinės angos ir vulvos – *G. rostochiensis* – 16–31 (>14); *G. pallida* – 8–20 (<14);
- ✓ Granek'o indeksas, skaičiuojamas dalinant atstumą nuo analinės angos iki artimiausio vulvos kraštelio iš vulvos skersmens – *G. rostochiensis* – 1,3–9,5 (>3) µm; *G. pallida* – 1,2–3,5 (<3) µm;
- ✓ J2 kūno ir stileto ilgis – *G. rostochiensis* – 425–505 (468) µm ir 19–23 (21,8) µm; *G. pallida* – 440–525 (484) µm ir 22–24 (23,8) µm;
- ✓ stileto pagrindo gumbelių (stileto sustorėjimai, prie kurių tvirtinasi stileta judinantys raumenys) forma ir plotis – *G. rostochiensis* – nuo priekyje suplotų iki apvalių, 3,2–4,0 µm; *G. pallida* – nusitęsę į priekį, 4–5 µm.

Pasaulyje žinoma 13 *Globodera* genčiai priklausančių nematodų, parazituojančių įvairias augalų rūšis. Visos jos morfologiškai labai panašios, o kai kurių rūšių požymiai persidengia, tai apsunkina jų identifikaciją. Europoje bulvių laukuose be bulvinių cistinių nematodų sutinkamos dar trys *Globodera* rūšys, kurios apsunkina bulvinių nematodų identifikaciją. Tai – *Globodera achilleae*, *Globodera artemisiae* (paplitusios šiaurinėje Europos dalyje) bei *Globodera tabacum* (paplitusi pietinėje Europos dalyje) (1 lentelė) (Baldwin, Mundo-Ocampo, 1991; Brzeski, 1998; Manduric, Anderson, 2004; Dobosz *et al.*, 2006). Tačiau tik *G. tabacum* gali parazituoti bulves, kitų dviejų rūšių augalai šeiminiškai yra paprastoji kraujažolė (*Achillea millefolium*) ir paprastasis kietis (*Artemisia vulgaris*).



**1.2.1 pav.** Bulvinių cistinių nematodų *Globodera rostochiensis* (**A**, **C**) ir *Globodera pallida* (**B**, **D**) cistų analinio–vulvarinio pjūvio vaizdas ( $\times 1000$ ) (**A**, **B**) ir antros juvenilinės stadijos priekinė kūno dalis ( $\times 1000$ ) (**C**, **D**) (autorės nuotraukos). A – analinė anga; V – vulva; KR – kutikulinės raukšlės; S – stiletas; SG – stileto gumbeliai.



**1 lentelė.** *Globodera rostochiensis*, *Globodera pallida*, *Globodera tabacum*, *Globodera achilleae* ir *Globodera artemisiae* cistų ir antros juvenilinės stadijos (J2) pagrindiniai skiriamieji morfologiniai ir morfometriniai bruožai, skliausteliuose pažymėtos vidutinės matavimų reikšmės (Baldwin, Mundo-Ocampo, 1991; Brzeski, 1998; Manduric, Anderson, 2004; Dobosz *et al.*, 2006).

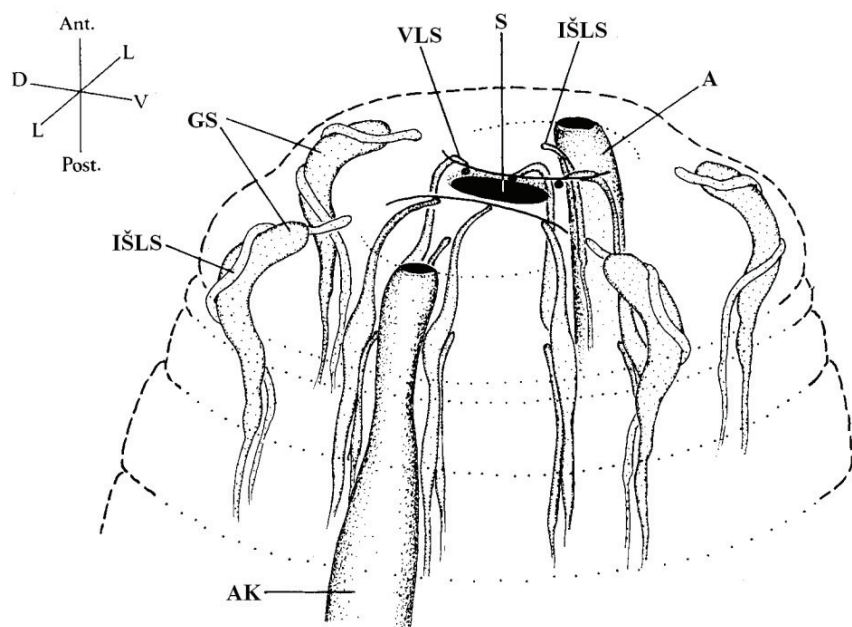
<b>Rūšys</b>	<b>J2 kūno ilgis (µm)</b>	<b>J2 stiletto gumbelių plotis (µm)</b>	<b>J2 stiletto gumbelių forma</b>	<b>J2 stiletto ilgis (µm)</b>	<b>Kutikulinių raukšlių skaičius tarp analinės angos ir vulvos*</b>	<b>Granek'o indeksas (µm)</b>
<i>G. rostochiensis</i>	425–505 (468)	3,2–4,0	Nuo priekyje suplotų iki apvalių	19–23 (21,8)	16–31 (>14)	1,3–9,5 (>3)
<i>G. pallida</i>	440–525 (484)	4–5	Nusitęsę į priekį	22–24 (23,8)	8–20 (<14)	1,2–3,5 (<3)
<i>G. tabacum</i>	410–527 (477)	4–5	Apvalūs	23–24	10–14	1–4,2 (<2,8)
<i>G. achilleae</i>	472–515 (492)	4–5	Nuo apvalių iki inkaro formos	24–26 (25)	4–11 (<10)	1,3–1,9 (1,6)
<i>G. artemisiae</i>	357–490 (413)	3–5	Apvalūs, į priekį plokštėjantys, kartais truputį dantyti	18–29 (23)	5–16	0,8–1,7 (1,0)

\*Kai kuriais atvejais kutikulinės raukšlės gali būti neįžiūrimos.

Identifikuojant bulvinių cistinių nematodų rūšis molekuliniai metodai yra patikimesni. Vienas labiausiai paplitusių būdų rūšims atskirti yra tarprūšinių DNR grandinės skirtumų nustatymas polimerazinės grandininės reakcijos (PGR) metodu, panaudojant rūšiai specifinius DNR pradmenis (Fullaondo *et al.*, 1999; Zouhar *et al.*, 2000; Pylypenko *et al.*, 2005). Šis metodas skirti bulvinių cistinių nematodų rūšis Lietuvoje dar netaikytas.

### 1.3. Augalų parazitinių nematodų chemorecepcija

Pagrindiniai augalų parazitinių nematodų chemoreceptoriniai organai yra burnos šonuose išsidėsčiusios porinės struktūros, vadinamos amfidėmis (Jones *et al.*, 1994). Be amfidžių, nematodų galvinėje dalyje yra išsidėsčiusios šešios išorinės ir vidinės lūpų sensilės bei keturios galvos kutikulines sensilės (1.3.1 pav.).



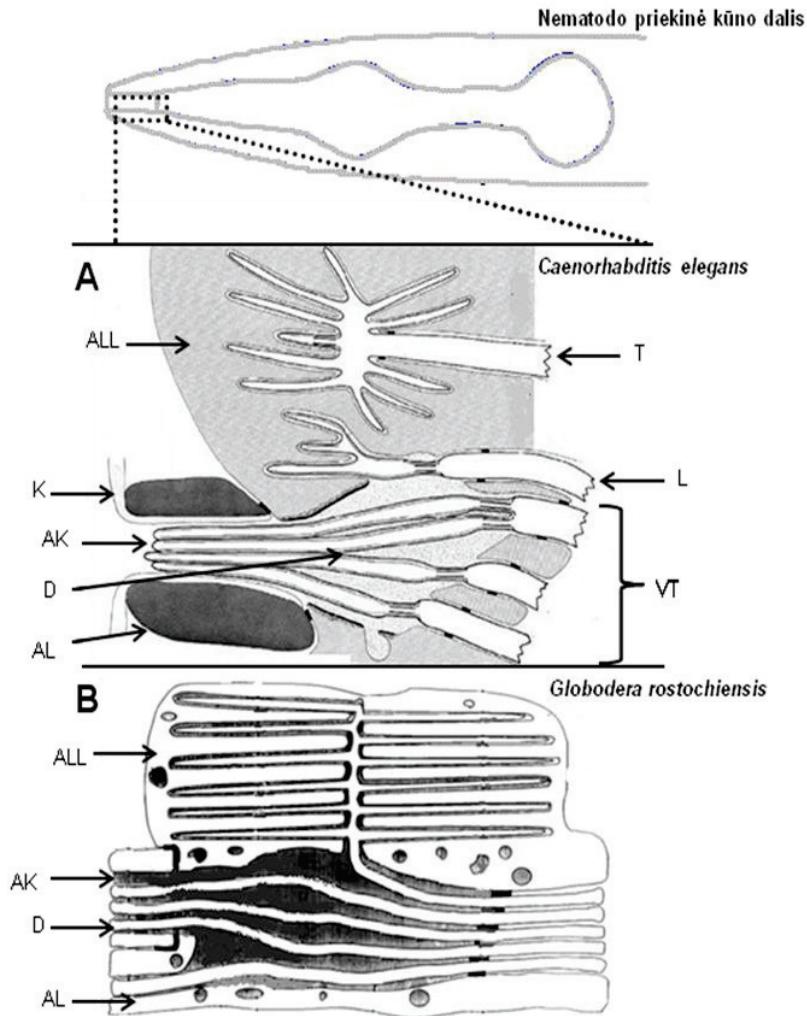
**1.3.1 pav.** Daugelio augalų rūšių endoparazito *Pratylenchus penetrans* suaugėlio priekinės kūno dalies sensilių išsidėstymo schema (Trett, Perry, 1985a). A – amfidė; AK – amfidės kanalas; GS – galvinės sensilės; VLS – vidinės lūpų sensilės; IŠLS – išorinės lūpų sensilės; S – stoma.

Vidinės lūpų sensilės savo sandara panašios į amfides ir, manoma, taip pat atlieka chemosensorinę funkciją (Wright, 1983; Jones, 2002). Nematodai iš Secernentea klasės (jai priklauso ir bulviniai cistiniai nematodai) turi lytinių feromonų receptorius – fazmides, kurios yra išsidėsčiusios uodegos šonuose (Wang, Chen, 1985). Jos savo sandara taip pat panašios į amfides.

Kiekviena amfidė atsiveria į išorę aiškiai matoma pora kutikulėje, per kurią amfidėje išsidėstę chemoreceptoriai sąveikauja su aplinka (1.3.1 pav.). Amfidės sudarytos iš apvalkalinių liaukinių (*sheath cell*) ir atraminių (*socket cell*) ląstelių, kurios sudaro amfidės kanalą bei į amfidės kanalą nusitęsusių neuronų dendritų – chemoreceptorių (1.3.2 pav.). Dendritus gaubia apvalkalinės liaukinės ląstelės, kurių išskyrų pagalba molekulės keliauja link chemoreceptorių. Skirtingų nematodų rūšių dendritinių ataugų skaičius skiriasi. Dauguma augalų parazitinių nematodų turi 7 dendritus, nusitęsčius iš skirtingų neuronų, ir 2–5 dendritus – iš vieno neurono, tačiau pastarųjų funkcija kol kas nenustatyta, t. y. nėra aišku, kaip ji susijusi su chemoreceptcija (Wergin, Endo, 1976; Trett, Perry, 1985a; Jones *et al.*, 1994).

Tiek *G. rostochiensis*, tiek *G. pallida* amfidžių anatomija per gyvenimo ciklą nesikeičia (Jones *et al.*, 1994). Elektrofiziologiniais tyrimais įrodyta, kad *G. rostochiensis* amfidės yra atsakingos už chemosensorinę funkciją (Riga *et al.*, 1996; Rolfe *et al.*, 2000). Be to, nustatyta, kad dėka amfidžių, šios rūšies patinai atskiria patelių išskiriamus feromonus (Riga *et al.*, 1996, 1997).

Daugumos augalų parazitinių nematodų rūšių: gėlus ant šaknų sukeliančio *Meloidogyne incognita* (Baldwin, Hirschmann, 1973; Wergin, Endo, 1976), sojos cistinio *Heterodera glycines* (Baldwin, Hirschmann, 1975; Endo, 1980), *G. rostochiensis* (Jones *et al.*, 1994) J2 stadijų, ir *M. incognita*, *H. glycines* bei daugelio augalų rūšių endoparazito *Pratylenchus penetrans* suaugėlių amfidžių sandaros panašios (Baldwin, Hirschmann, 1973, 1975; Trett, Perry, 1985a) (1.3.1 pav.).



**1.3.2 pav.** Schematizuotas išilginis laisvai dirvožemyje gyvenančio ir bakterijomis mintančio *Caenorhabditis elegans* (A) (pagal Perkins, 1986) ir *Globodera rostochiensis* (B) (pagal Jones *et al.*, 1994) amfidės pjūvis. ALL – apvaskalinė liaukinė ląstelė (*sheath cell*); AL – atraminė ląstelė (*socket cell*); AK – amfidės kanalas; K – kutikulė; D – dendritai; VT – dendritai, kurie reaguoja į vandenyje tirpias chemines medžiagas; L – dendritai, kurie reaguoja į lakias medžiagas; T – dendritai, kurie reaguoja į temperatūrą (termoreceptoriai).

Augalų parazitinių nematodų amfidžių sandara panaši ir į kitų ekologinių grupių nematodų. Pavyzdžiui, į laisvai dirvožemyje gyvenančio bei

bakterijomis mintančio nematodo *Caenorhabditis elegans*. Yra žinoma, kad *C. elegans* amfidėje yra išsidėstę 8 dendritai, kurie reaguoja į vandenyje tirpias chemines medžiagas, t. y. atsakingi už skonio jutimą bei 6 dendritai, reaguojantys į lakias medžiagas – atsakingi už kvapo jutimą (O'Halloran *et al.*, 2006) (1.3.2 pav.). Manoma, kad augalų parazitinių nematodų amfidės ir savo funkcijomis panašios į kitų ekologinių grupių nematodų amfides (Jones *et al.*, 1994), t. y. augalų parazitiniai nematodai skiria ir skonį, ir kvapą. Be to, analizuojant *G. pallida*, *M. incognita* ir *H. glycines* genomą nustatyta, kad šie nematodai turi panašius į vabzdžių genus, kurie atsakingi už baltymo, pernešančio kvapų molekules link receptorių, sintezę (Jones *et al.*, 1992).

#### **1.4. Bulvinių cistinių nematodų sukeliama pažeidimai bulvėms ir kovos būdai su šiais kenkėjais**

Bulviniai cistiniai nematodai yra obligatiniai bulvinių šeimos parazitai, parazitaujantys bulves, pomidorus, baklažanus ir dar apie 90 šios šeimos atstovų. Tačiau bulvės (*Solanum tuberosum*) yra vienos iš pagrindinių ir ekonomiškai svarbiausių bulvinių cistinių nematodų augalų šeimininkų (Twomey, 1995).

*Globodera rostochiensis* ir *G. pallida* pažeidimų simptomai bulvėms nespecifiški ir gali būti klaidingai priskiriami kitų patogenų pažeidimams. Nematodai pažeidžia augalo šeimininko šaknų sistemą, sutrikdydami vandens ir maistingų medžiagų absorbciją, ko pasekoje sutrinka fotosintezė, augalai blogai auga ir vystosi. Užsikrėtę bulviniais cistiniais nematodais augalai būna žemesni, apvytusiais ir pageltusiais lapais, išauga tik keli stiebai (1–3), formuojasi maži stiebagumbiai ir jų būna mažiau (Klimakova *et al.*, 1983). Rudenį ant užkrėstų augalų šaknų susiformuoja aiškiai matomos nematodų cistos. Pažeisdami bulvių šaknis, nematodai atveria kelius ir kitiems patogenams: bakterijoms, grybams, virusams. Gausus užkrėtimas nematodais atsiranda tuomet, kai kasmet tame pačiame lauke auginami bulvinių šeimos augalai (Marshall, 1993).

Dabar abi bulvinių cistinių nematodų rūšys įrašytos į pasaulio, Europos ir Lietuvos karantininių organizmų sąrašus (CD, 2000). *Globodera rostochiensis* paplitusi 65 pasaulio šalyse, o *G. pallida* – 41 (Smith *et al.*, 1997). Pagal paskutinius – 2008 m. publikuotus duomenis, Lietuvoje bulviniais cistiniais nematodais užkrėsta virš 7000 ha dirvožemio plotų (VAAT, 2008).

Pagrindiniai kovos su bulviniais cistiniais nematodais būdai yra sėjomaina, jiems atsparių bulvių veislių auginimas bei nematocidų taikymas (Klimakova *et al.*, 1983; Smith *et al.*, 1997). Kontrolės efektyvumui padidinti dažniausiai naudojami keli metodai iš karto.

Lietuvoje, kaip ir daugelyje pasaulio šalių, nematocidai nenaudojami bulviniams cistiniams nematodams kontroliuoti, nes esami cheminiai preparatai yra toksiški aplinkai bei brangūs, nors ir efektyvūs.

Sėjomaina, kai užkrėstame nematodais lauke auginami ne augalai šeimnininkai, pavyzdžiui, javai, ankštinės kultūros, daugiametės žolės ir pan., yra vienas efektyviausių būdų bulviniams cistiniams nematodams kontroliuoti. Tačiau šis būdas yra ekonomiškai nenaudingas, nes laukuose, užkrėstuose bulviniais cistiniais nematodais, bulves rekomenduojama auginti ne anksčiau kaip po šešių metų (CD, 2007). Be to, sėjomainą prasminga taikyti, kai augintojai turi galimybę auginti keletą skirtingų kultūrų lauke.

Bulviniams cistiniams nematodams atsparių bulvių veislių auginimas yra efektyvus ir ekologiškas kovos būdas su šiais kenkėjais. Auginant atsparias bulvių veisles nematodais užkrėstame lauke, nematodų gali sumažėti iki 80 % per sezoną (Whitehead, Turner, 1998). Dažniausiai išvedamos atsparios *G. rostochiensis* Ro1 patotipui bulvių veislės (NIVAA, 1997). Tačiau pastarosios imlios ne tik kitiems šios rūšies, bet ir *G. pallida* patotipams. Išvedama ir veislių, atsparių keletui patotipų iš karto. Lyginant su *G. rostochiensis*, *G. pallida* atsparių bulvių veislių išvedama mažiau. Norint užkrėstame bulviniais cistiniais nematodais lauke auginti atsparias bulvių veisles svarbu žinoti, koks nematodų patotipas vyrauja lauke. Tam nematodais reikia užkrėsti skirtingo atsparumo augalus, o tai reikalauja nemažai lėšų, laiko ir pastangų. Be to, nuolatinis atsparių veislių auginimas neužkerta kelio kitų

patotipų vystymuisi ar kitos bulvinių cistinių nematodų rūšies išsivyravimui bulvių laukuose (Minnis *et al.*, 2002).

Vienas iš novatoriškiausių biologinės kovos su bulviniais cistiniais nematodais būdų galėtų būti jų normalaus gyvenimo ciklo, t. y. nematodų elgsenos, svarbios atpažįstant augalą šeimininką, sutrikdymas. Tai atlikti būtų įmanoma veikiant juos natūraliomis – augalo šeimininko išskiriamomis cheminėmis medžiagomis arba jų analogais – sintetinėmis medžiagomis. Tam reikalingi ne tik detalūs nematodų elgsenos, bet ir bulvių išskiriamų bioaktyvių cheminių medžiagų tyrimai. Kitą vertus, žinant kokios cheminės medžiagos galėtų slopinti svarbiausių nematodų chemosensorinių organų – amfidžių veiklą, t. y. slopinti nematodų reakciją į žinomą atraktyvų cheminį stimulą, atsirastų galimybė sutrikdyti normalią nematodų orientaciją aplinkoje ne tik ieškant mitybai tinkamo augalo šeimininko, bet ir partnerio dauginimuisi (Perry, 1994).

### **1.5. Bulvių išskiriamos medžiagos**

Bulvės į aplinką išskiria įvairiausių grupių junginius (1 priedas, 1 lentelė): terpenoidus (Kaneko *et al.*, 1977; Brindle *et al.*, 1983; Heftmann, 1983; Berdis *et al.*, 1993; Aburjai *et al.*, 1998; Agelopoulos *et al.*, 2000; Weissbecker *et al.*, 2000; Brown, 2005; Martel *et al.*, 2005; Szafranek *et al.*, 2005, 2006), alkaloidus (Prelog, Jeger, 1960; Ripperger, Schreiber, 1968; Leete, 1983; Dräger *et al.*, 1995; Keller *et al.*, 1996; Siegmund *et al.*, 1999; Kavvadias *et al.*, 2000; Keiner *et al.*, 2000; Friedman *et al.*, 2003, 2006; Śviędrych *et al.*, 2004), fenolinius junginius (Harborne, 1962, 1964; Hegnauer, 1990; Dao, Friedman, 1992; Keller *et al.*, 1996; Negrel *et al.*, 1996; Baumert *et al.*, 2010) bei riebalų rūgščių antrinius metabolitus (Šimko *et al.*, 1997).

Iš minėtų, bulvių į aplinką išskiriamų, cheminių junginių steroidiniai alkaloidai/glikoalkaloidai yra vieni būdingiausių Solanaceae šeimos specifinių antrinių metabolitų (jie kartais įvardijami kaip „*Solanum* alkaloidai“). Tik lelijinių (Liliaceae) šeimos augalai išskiria porą tokių pačių glikoalkaloidų

(solanidiną ir solasodiną) kaip ir bulviniai augalai (apžvalga: Eich, 2008). Vienas labiausiai paplitusių *Solanum* spp. glikoalkaloidų yra  $\alpha$ -solaninas. Be to, jis yra vienas iš labiausiai dominuojančių kultūrinių bulvių glikoalkaloidų (Friedman, McDonald, 1997; Friedman, 2006).

$\alpha$ -Solanino biosintezė bulvėse prasideda iškart po sudygimo visose metaboliškai aktyviose augalo dalyse – ūgliuose, lapuose, šaknyse ir gumbuose (Friedman, Dao, 1992; Friedman, 2006). Šio metabolito kiekis įvairuoja ne tik augale, bet ir skirtingose bulvių veislėse (apžvalga: Jansen, 2008). Pavyzdžiui, tirtų bulvių veislių stiebagumbiuose yra 0,58–5,9  $\mu\text{g}/100\text{g}$   $\alpha$ -solanino (Friedman, Dao, 1992). Aplinkos stresą (sausrą, kenkėjų atakas ir pan.) patiriantys augalai išskiria beveik 50 % didesnę šios medžiagos kiekį (Hlywka *et al.*, 1994; Friedman, McDonald, 1997; Papathanasiou *et al.*, 1999; Bejarano *et al.*, 2000). Bulvių laukų dirvožemyje nustatyti nedideli (2 %), lyginant su bulvėse esančiais, glikoalkaloidų (tame tarpe ir  $\alpha$ -solanino) kiekiai (Jansen *et al.*, 2009a, b). Manoma, kad  $\alpha$ -solaninas kartu su vandeniu iš bulvių nuplaunamas į dirvožemį (Friedman, Dao, 1992). Be to, šiek tiek jo patenka iš augalų, paliktų bulvių laukuose, po derliaus nuėmimo.

Nepaisant pateiktų žinių apie bulvių į aplinką išskiriamas chemines medžiagas, literatūroje mažai duomenų apie bulvinių cistinių nematodų elgseną veikiančias šių augalų išskiriamas medžiagas. Todėl tolimesniuose skyreliuose pateikiama daugiau duomenų apie žinomas chemines medžiagas, įtakančias ne tik bulvinių cistinių, bet ir kitų augalų parazitinių nematodų elgseną bei svarbiausius metodus joms nustatyti.

## **1.6. Augalų parazitinių nematodų chemoekologinės sąveikos**

Augalų parazitiniai nematodai tarpsta tiek antžeminėse augalo dalyse, tiek šaknyse arba dirvožemyje šalia jų. Dirvožemio aplinkoje, kur gyvena daugelis su augalais susijusių parazitinių nematodų, yra įvairių augalų išskiriamų cheminių junginių: jonų, laisvo deguonies, vandens, fermentų ir kitų anglies turinčių pirminių ir antrinių metabolitų (Uren, 2000; Bertin *et al.*, 2003;



Bais *et al.*, 2006). Jų ypač gausu zonoje ties jaunų šaknų galiukais (Griffin *et al.*, 1976; Hawes, Brigham, 1992). Kaip minėta prieš tai, nematodai turi keletą chemoreceptorių, kuriais junta aplinkoje esančius cheminius junginius. Dalį augalo į aplinką išskiriamų junginių nematodai atpažįsta kaip signalus, informuojančius apie tai, ar augalas tinkamas nematodo mitybai (Perry, 1996). Būtent augalų išskiriamos medžiagos sąlygoja nematodo migraciją link augalo, maitinimosi vietos pasirinkimą ir netgi nematodų vystymąsi (Hirsch *et al.*, 2003). Visos šios medžiagos priskiriamos kairomonams.

Kairomonai skirstomi į tiesiogiai ir netiesiogiai elgseną veikiančius. Tiesiogiai veikiantys sukelia staigią nematodų reakciją į stimulą, o netiesiogiai – lėtus nematodų fiziologinius atsakus (Ruther *et al.*, 2002). Pastarieji skatina nematodų ritimąsi iš kiaušinėlių ir nematologijoje yra vadinami ritimosi veiksniais (*hatching factors*). Tiesiogiai nematodų elgseną veikiantys kairomonai toliau skirstomi į nespecifinius ir specifinius. Nespecifiniai – tai tokie kairomonai, kurie nematodą įgalina aplinkoje išskirti augalus, t. y. kairomonai, veikiantys nematodų elgseną iš toli (*long distance*) (Perry, 1996). Jie veikia keleto centimetrų atstumu (Spence *et al.*, 2008). Specifiniai, nematodų elgseną veikiantys iš arti (*short distance*), kairomonai leidžia nematodams nustatyti tinkamą mitybai vietą augale (Lilley *et al.*, 2005).

Dirvožemio aplinkoje augalų parazitinius nematodus vilioja ir cheminės medžiagos, kurios nepriskiriamos kairomonams. Šios medžiagos vadinamos atraktantais (Mohl, 1985).

Cheminės medžiagos, kurios veikia nematodų elgseną ir jas į aplinką išskiria patys nematodai vadinamos feromonais (Wilson, Bossert, 1963). Feromonai elgseną gali veikti tiesiogiai arba netiesiogiai. Prie tiesiogiai elgseną veikiančių feromonų, sukeliančių staigią reakciją į stimulą, priskiriami lytiniai feromonai. Netiesiogiai elgseną veikiantys feromonai (*primer pheromones*) sukelia lėtas elgsenines reakcijas į stimulą, lėtai keisdami fiziologinę būklę.

### 1.6.1. Augalų parazitinių nematodų elgseniniai testai chemoekologinėms sąveikoms nustatyti

**Nematodų privilejimo testai.** Tiriant kaip ir kokios cheminės medžiagos veikia augalų parazitinių nematodų elgseną, atsižvelgiama į nematodų biologiją ir jų gyvenamosios aplinkos sąlygas: fizines (drėgmę, temperatūrą, apšvietimą ir kt.) bei chemines savybes.

Visiems nematodams būtina drėgmė: tiek rūšims, kurios gyvena augalo šeiminko audiniuose, tiek toms, kurios tarpsta šalia augalų tarpuose tarp dirvožemio dalelių. Dėl šios priežasties atraktyvumo testams paprastai ruošiamos vandeninės terpės – dažniausiai agarų (Greet *et al.*, 1968; Klink *et al.*, 1970; Robinson *et al.*, 1979; Papademetriou, Bone, 1983; Riddle, Bird, 1985; Castro *et al.*, 1989; Aumann, Hashem, 1993; Hewlett *et al.*, 1997; Riga *et al.*, 1997; Rühm *et al.*, 2003; Spiegel *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2007). Ant jo paviršiaus ar jame nematodai laisvai juda, juos lengva stebėti. Biotestai gali būti atliekami ir dirvožemyje, paprastai smulkaus drėgno smėlio terpėse (Hough, Thomason, 1975; Prot, 1979; Evans, Wright, 1982; Clarke, Hennessy, 1984; Robinson, 1995; Abou-Setta, Duncan, 1998; Zhao *et al.*, 2000; Twomey *et al.*, 2002). Tyrimams atlikti dažniausiai naudojamos įvairaus skersmens Petri lėkštelės bei vamzdeliai. Biotestų metu į terpes/ant terpių paskleidžiama tiriamą cheminę medžiagą. Po kurio laiko dėl cheminės medžiagos difuzijos susiformuoja tam tikras cheminės medžiagos koncentracijos gradientas. Lakių ir nestabilių medžiagų garavimą nuo vandeninės terpės galima lėtinti uždengus tiriamos medžiagos užnešimo vietą filtriniu popierėliu (Rühm *et al.*, 2003) ar agarų plokšte (Robinson, Saldana, 1989). Lakios medžiagos gali būti tiesiog leidžiamos nedideliu srautu pro plonytį kapiliarą virš terpės ar į ją (Klingler, 1972; Viglierchio, 1990; Robinson, 1995).

Priklausomai nuo tiriamų medžiagų cheminių savybių, nematodai į terpes perkeliama prieš arba po medžiagos paskleidimo. Biotestai atliekami tamsoje bei nematodams tinkamoje aplinkos temperatūroje, (pavyzdžiui, 21–23 °C) (Robinson, 1995). Po pasirinkto laiko ant vandeninių terpių pro mikroskopą

stebima nematodų reakcija: nematodų sankaupos (Klingler, 1972; Castro *et al.*, 1989; Viglierchio, 1990; Zhao *et al.*, 2000; Spiegel *et al.*, 2003; Spence *et al.*, 2008) judėjimo kryptys, trajektorijos. Visa tai gali būti fotografuojama (Riddle, Bird, 1985) arba filmuojama (Dusenbery, 1983; Pline, Dusenbery, 1987). Iš elgsenos pokyčių sprendžiama, ar tiriamoji medžiaga turi poveikį nematodų elgsenai (Spiegel *et al.*, 2003) ir kokį. Smėlio terpėse iš cheminės medžiagos užnešimo vietos tiesiog išimamas smėlis, jis išplaunamas ir suskaičiuojami nematodai, rezultatai lyginami su kontrole (Zhao *et al.*, 2000).

Elgseniniai tyrimai gali būti atliekami su medžiagomis, apie kurias žinoma, jog į jas reaguoja nematodų uoslės ar skonio chemoreceptorai, t. y. su medžiagomis, kurias šie organizmai junta. Pastarųjų nustatymui pasitelkiami elektrofiziologiniai tyrimai. Jų metu nematodas fiksuojamas kapiliare ir prie cefalinės dalies prijungiami mikroelektrodai. Tiriamas nematodas nardinamas į tirpalą su tiriamą chemine medžiaga ir registruojami elektriniai receptorių atsakai (Riga *et al.*, 1996, 1997; Rolfe *et al.*, 2000). Ryškūs receptorių atsakai į dirginimą rodo, kad nematodas tiriamas medžiagas junta. Ar jos sukelia elgsenines reakcijas ir kokias – nustatoma biotestuojant.

**Nematodų ritimosi biotestai.** Šiltajam metų laikui prasidėjus iš augalų parazitinių nematodų rūšių, kuriems būdinga cistinė stadija, cistoje esančių kiaušinėlių išsivystę nematodai. Čia svarbūs aplinkos cheminiai signalai. Ritimosi biotestais nustatoma, kokios cheminės medžiagos atsakingos už ritimosi reakcijos sukėlimą. Tam cistos ar kiaušinėliai panardinami į indus – Petri lėkšteles (Zhao *et al.*, 2000; Castillo, Vovlas, 2002; Pridannikov *et al.*, 2007) ar šulinėlius (Den Nijs, Lock, 1992; LaMondia, 1995; Devine, Jones, 2000; Byrne *et al.*, 2001) su tiriamų medžiagų tirpalais. Indai su nematodais laikomi tamsoje, optimalioje temperatūroje (pavyzdžiui, 20 °C) (Fenwick, 1951). Stebint per mikroskopą nustatoma ritimosi dinamika tirpale ir kontrolėje.

### 1.6.2. Kairomonai, jų poveikis ir cheminė sudėtis

**Nespecifiniai kairomonai.** Iki šiol žinomi tik keli nespecifiniai kairomonai, veikiantys augalų parazitinių nematodų elgseną. Daugiausia tyrimų atlikta su anglies dioksidu ir nustatyta, jog jis veikia daugelio nematodų rūšių elgseną. Tai, greičiausiai, susiję su tuo, kad dėl augale vykstančių metabolinių procesų prie jo yra padidėjęs anglies dioksido kiekis. Ištirta ir keletas organinių junginių – augalų išskiriamų rūgščių: askorbo, giberelino (Bird, 1959), asparto ir glutamo (Jones, 1960) bei išaiškintas jų kairomoninis poveikis (2 priedas, 1 lentelė).

**Specifiniai kairomonai.** Specifiniai kairomonai žinomi dviem augalų parazitinių nematodų rūšims: pušiniam stiebiniam nematodui *Bursaphelenchus xylophilus*, kuris sukelia pušų vytulį, ir avižų cistiniam nematodui *Heterodera avenae* (2 priedas, 2 lentelė). Įdomu, kad pirmosios paminėtos nematodų rūšies augalo šeimininko – pušies (*Pinus massoniana*) sveika ksilema ir pušinio nematodo vektoriaus – vabalo (*Monochamus alternatus*) lervos išskiria tas pačias tris nematodui atraktyvias medžiagas: longifoleną,  $\alpha$ - ir  $\beta$ -pinenus, (Zhao *et al.*, 2007), tačiau kiek skirtingu santykiu. Vienu santykiu jos atraktyvios nematodo reproduktyviajai (Jn), kitu – plitimo (JIII) stadijai. *Bursaphelenchus xylophilus* atraktyvios ir kitos augalo šeimininko išskiriamos cheminės medžiagos – lanolino rūgštis (Miyazaki *et al.*, 1977), 1-monooleinas (Tominaga *et al.*, 1982) ir  $\beta$ -mircenas (Ishikawa *et al.*, 1986). Avižų cistiniam nematodui *H. avenae* atraktyvūs kairomonai išskirti iš avižų šaknų. Tai – avižų, mugininė ir 2-deoksimugininė rūgštys (Lung, 1993).

Bandyta nustatyti ir kitiems augalų parazitiniams nematodams atraktyvių kairomonų, esančių mitybinių augalų nuoplovose, sudėtį. Tai runkeliniam nematodui *Heterodera schachtii* (baltosios garstyčios (*Sinapis alba*) nuoplovose, Rühm *et al.*, 2003), stiebų ir gumbų nematodui *Ditylenchus dipsaci* (svogūnų (*Allium cepa*) šaknų nuoplovose, Spiegel *et al.*, 2003), gėlus ant lapų sukeliančiam nematodui *Orrina phyllobia* (siauralapio baklažano (*Solanum elaeagnifolium*) lapų nuoplovose, Robinson, Saldana, 1989), sojos

cistiniam nematodui *H. glycines* (sojos (*Glycine max*) šaknų nuoplovoje, Papademetriou, Bone, 1983) bei bulviniams cistiniam nematodams (bulvių šaknų nuoplovoje, Weischer, 1959; Clarke, Hennessy, 1984; Devine, Jones, 2003), tačiau kol kas nesėkmingai, nes konkreti kairomonų sudėtis neidentifikuota. Tiriant bulvinių cistinių nematodų elgseną nustatyta tik tiek, kad vandenyje išsiritę *G. rostochiensis* ir *G. pallida* yra viliojami tų pačių bulvių šaknų nuoplovų frakcijų, o bulvių šaknų nuoplovoje išsiritę – skirtingų (Devine, Jones, 2003). Be to, teigiama, kad abi bulvinių cistinių nematodų rūšys, išsiritusios bulvių šaknų nuoplovoje, skirtingai išmoksta atpažinti tą patį augalą šeimininką (Devine, Jones, 2003).

**Atraktantai.** Turima gana daug žinių apie nesudėtingų cheminių medžiagų poveikį nematodų elgsenai. Žinomi 45 šiai grupei priklausantys junginiai, atraktyvūs įvairiems augalų parazitiniams nematodams (2 priedas, 3 lentelė). Kadangi nematodai parazituoja skirtingus augalus, ši atraktantų įvairovė sietina ir su augalų, ir su dirvožemių, kuriuose auga nematodams tinkamos augalų rūšys, cheminės sudėties ypatumais. Ieškant atraktantų tirtos ir medžiagos, veikiančios vabzdžių elgseną (vabzdžių fagostimuliacinės, t. y. skatinančios vabzdžius maitintis medžiagos) ir, remiantis kai kurių junginių preliminaria atranka elektrofiziologinių tyrimų metodais bei elgseniniais testais (Riga *et al.*, 1997), nustatyta, kad pateiktos 2 priedo 3 lentelėje medžiagos nematodams yra atraktyvios.

### 1.6.3. Ritimosi veiksniai, jų poveikis ir cheminė sudėtis

**Specifiniai ritimosi veiksniai.** Cistiniai nematodai, kurie parazituoja skirtingų šeimų augalus, esant palankioms drėgmės ir temperatūros sąlygoms, ritasi spontaniškai (vandenyje) (HamLen *et al.*, 1973; Khan, 1985; Gaur *et al.*, 1992; Den Nijs, Lock, 1992; Jones *et al.*, 1998; Gaur *et al.*, 2000; Perry, 2002; Robinson, 2002; Turner, Rowe, 2006). Tačiau nematodų rūšys, parazituojančios tik tam tikrų šeimų augalus (pavyzdžiui, *Globodera* spp., *Heterodera* spp., *Meloidogyne* spp.), nors šiek tiek ritasi vandenyje, ritimasis

labiausia priklauso nuo specifinių medžiagų, kurias išskiria augalų šeimininkų šaknys (HamLen *et al.*, 1973; Chen *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 1998; Devine, Jones, 2000; Perry, 2002; Hirsch *et al.*, 2003; Turner, Rowe, 2006). Jų išskyrimas sinchronizuoja nematodo ir augalo šeimininko gyvenimo ciklus. Ritimosi veiksnys gali išskirti ir antžeminė augalo dalis, pavyzdžiui, bulvės stiebai ir lapai bulviniams cistiniais nematodams (Devine *et al.*, 1996).

Pirmasis ritimosi veiksnys, identifikuotas augalų parazitiniams nematodams – glicinoeklepinas A (2 priedas, 4 lentelė). Tai sojos cistinio nematodo *H. glycines* specifinis ritimosi veiksnys, išskirtas iš daržinės pupelės (*Phaseolus vulgaris*) šaknų (Masamune *et al.*, 1982). Vėliau iš šio augalo šaknų išskirti dar du panašaus aktyvumo ir cheminės struktūros ritimosi veiksniai – glicinoeklepinai B ir C (Fukuzawa *et al.*, 1985). *Globodera rostochiensis* ir *G. pallida* ritimosi veiksnys (*E*-2-[9*a*,15-dihidroksi-6-metoksi-4,4,13-trimetil-2,7-diokso-14,17-karbonyl-3,10-epoksi-B(9*a*)-homo-(13)-gona-5,18-dien-17-il] ciklopropankarboksilinė rūgštis), išskirtas iš bulvių ir pomidorų šaknų, struktūriškai panašus į glicinoeklepinus, pavadintas solanoeklepinu A (Schenk *et al.*, 1999). Gausūs ankstesni bandymai identifikuoti šį ritimosi veiksnį buvo nesėkmingi (Marrian *et al.*, 1949; Johnson, 1952; Hartwell *et al.*, 1959; Clarke, 1970; Voinilo, 1976; Mulder *et al.*, 1992). Dar du aktyvūs komponentai, išskirti iš bulvių šaknų nuoplovų –  $\alpha$ -solaninas ir  $\alpha$ -čakoninas yra *G. rostochiensis* ritimosi veiksniai (Devine *et al.*, 1996; Byrne *et al.*, 2001). Manoma, kad bulvių šaknys išskiria ne mažiau kaip devynis *G. rostochiensis* ritimosi veiksnys (Byrne *et al.*, 1996; Devine, Jones, 2000). Be to, nuoplovose yra ne tik ritimąsi skatinančių, bet ir slopinančių veiksnių bei ritimosi veiksnių stimuliatorių (Byrne *et al.*, 1998). Ritimosi inhibitoriai slopina ritimosi veiksnio indukuotą ritimąsi. Ritimosi veiksnio stimulatoriai stimuliuoja augalą išskirti didesnį ritimosi veiksnio kiekį ir sukelia nematodų ritimąsi, kai kiaušinėliai patenka į ritimosi veiksnio ir jo stimulatoriaus aplinką (Byrne *et al.*, 1998). Žinoma, kad ir *H. glycines* augalo šeimininko šaknų nuoplovose yra ritimosi veiksnių, jų inhibitorių ir stimuliatorių (Okada, 1972a, b; Charlson, Tylka, 2003).

Nustatyta, kad *G. rostochiensis* ir *G. pallida* skirtingai reaguoja į augalą šeimininką: *G. rostochiensis* reaguoja į ankstesnėje, o *G. pallida* – į vėlesnėje augalo augimo stadijoje išskirtus ritimosi veiksnius (Byrne *et al.*, 2001). Frakcionuotose bulvių šaknų nuoplovose nustatytos trys grupės aktyvių medžiagų, skirtingai veikiančių abi bulvinių cistinių nematodų rūšis: indukuojančių ritimąsi abiem rūšim, tačiau vienai rūšiai geriau nei kitai; specifinių – indukuojančios ritimąsi tik vienai rūšiai; ir medžiagų, indukuojančių ritimąsi abiem rūšims vienodai (Byrne *et al.*, 2001). Be to, *G. rostochiensis* geriau ritasi vandenyje nei *G. pallida* (Den Nijs, Lock, 1992).

Augalai šeimininkai gali būti daugiau ar mažiau atsparūs juos parazituojančioms nematodams. Skirtingo atsparumo nematodams augalai šeimininkai į aplinką išskiria nevienodą ritimosi veiksmių kiekį. Pavyzdžiui, sojos pupelės atsparumo lygmuo koreliuoja su išsiritusių *H. glycines* nematodų skaičiumi (Sikora, Noel, 1996; Chen *et al.*, 1997).

**Nespecifiniai ritimosi veiksniai.** Tiriant įvairių junginių poveikį cistiniams nematodams, nuo paprasčiausių metalų druskų iki įvairiausių sudėtingų junginių: herbicidų (Hengstebeck, Gleissl, 1988), insekticidų (Steele, 1983), nematocidų (O'Brien *et al.*, 1939; Boyd, 1942; Berge, Cuany, 1972; Hough, Thomason, 1975; Huang, Van Gundy, 1978; Steele, 1983), fungicidų (Clarke, Shepherd, 1968; Whitehead, 1992) ir panašių į juos junginių (Calam *et al.*, 1949; Clarke, Shepherd, 1968), antiseptikų (Rademacher, Schmidt, 1933; Winner, 1957; Moriarty, 1963; Clarke, Perry, 1977; Reversat, 1981; Steele, 1983; Charlson, Tylka, 2003), trąšų (Clarke, Shepherd, 1966b), vitaminų (Clarke, Shepherd, 1968; Rao, Jayaprakash, 1978), pastebėtas nematodų ritimąsi stimuliuojantis poveikis (2 priedas, 5 lentelė).

Dirbtiniam nematodų ritimosi skatinimui naudojami nespecifiniai – dirbtiniai ritimosi veiksniai. Tai cinko chloridas – ritimąsi sukkeliantis daugumai augalų parazitinių nematodų rūšių (Clarke, Shepherd, 1965, 1966b; Steele *et al.*, 1982; Tefft, Bone, 1984; Di Vito, Sasanelli, 1990; Greco *et al.*, 1992; Hashmi, Krusberg, 1995), vanadatų druskos (Clarke, Shepherd, 1966a, 1966b; Di Vito, Sasanelli, 1990; Sasanelli, D'Addabbo, 1992; Whitehead,

1992; Byrne *et al.*, 2001), natrio tiocianatas (Maher, 2001), anhidrotetrano, pikro (Clarke, Shepherd, 1968) bei pikrolono (Clarke, Shepherd, 1966a, 1968; Byrne *et al.*, 2001) rūgštys.

#### 1.6.4. Feromonai, jų poveikis ir cheminė sudėtis

**Lytiniai feromonai.** Augalų parazitiniai nematodai dauginasi lytiškai bei partenogenezės būdu (Papadopoulou, Traintaphyllou, 1982; Yeates, 1987; Lambert, Beckal, 2002). Iki šiol nustatytas tik vienas augalų parazitinių nematodų lytinis feromonas – vanilino rūgštis. Ją išskiria sojos cistinių nematodų *H. glycines* patelės, taip priviliodamos patinus (Huettel *et al.*, 1988; Jaffe *et al.*, 1989). Tirta ir kitų augalų parazitinių nematodų: *H. schachtii* (Jonz *et al.*, 2001), *B. xylophilus* (Riga, 1992), dešimties cistinių nematodų rūšių iš *Heterodera* ir *Globodera* genčių (Greet *et al.*, 1968; Green, Plumb, 1970; Green, 1980; Riga *et al.*, 1996, 1997) feromonų cheminė sudėtis, tačiau jos nustatyti kol kas nepavyko. Žinoma, kad bulvinių cistinių nematodų lytiniai feromonai sudaryti iš polinių organinių junginių su keliais aktyviais komponentais, greičiausiai, neutralių ar amfoterinių bei fiziškai stabilių su lakiomis ir nelakiomis frakcijomis (Green, Plumb, 1970). Išaiškinta, kad iš dešimties *Heterodera* ir *Globodera* rūšių didesnioji dalis patelių buvo viliojamos kelių rūšių patinų ir dauguma patinų rūšių reagavo į daugiau nei vieną rūšį patelių (Green, 1980).

**Netiesiogiai elgseną veikiančys feromonai.** Kad yra nematodų elgseną netiesiogiai įtakančių feromonų, pastebėta tiriant cistinius nematodus. Nustatyta, kad *G. rostochiensis* cistos komponentų – kiaušinėlių ir cistos sienelės vandeniniai homogenatai bei jų nuoplovos stimuliuoja gausesnę nematodų ritimąsi lyginant ne tik su steriliu distiliuotu vandeniu (kontrole), bet ir su bulvių šaknų nuoplovomis (Kaul, 1962; Shepherd, Cox, 1967; Pridannikov *et al.*, 2007). Be to, nustatyta, kad cistos homogenate yra ir ritimosi veiksmų inhibitorių. Ritimosi veiksmų inhibitorių ir stimuliatorių taip pat yra ir *H. glycines* cistos sienelės ir kiaušinėlių nuoplovose bei



homogenatuose (Okada, 1972a, 1972b; Charlson, Tylka, 2003). Pastebėta teigiama koreliacija tarp cistoje esančių kiaušinėlių tankumo ir nematodų ritimosi – kuo daugiau cistoje kiaušinėlių, tuo didesnis procentas jų išsiriti (Masler *et al.*, 2008).

Manoma, kad feromonai gali veikti ne tik ritimosi, bet ir agregacijos elgseną (Huettel, 1986; Spence *et al.*, 2008) bei gali būti susiję ir su lyties apsprendimu. Pavyzdžiui, net plika akimi matomas *D. dipsaci* agregacijas, vadinamas „nematodų vilna“ (Christie, 1959), galėtų sukelti agregacijos feromonai. Kitas pavyzdys – partenogenetines *Meloidogyne* spp. populiacijas sudaro patelės, bet dėl nepalankių mitybinių sąlygų iš kiaušinėlių ima vystytis ne patelės, o patinai (Papadopoulou, Traintaphyllou, 1982). Manoma, kad tai gali būti susiję su cheminių medžiagų, tame tarpe feromonų poveikiu. Deja, junginių, įtakančių minėtą nematodų elgseną, cheminė sudėtis iki šiol nenustatyta (de Bono, 2003; McSorley, 2003).

Apibendrinat pažymėtina, kad chemoekologinės sąveikos tirtos tų augalų parazitinių nematodų rūšių, kurios yra ekonomiškai svarbios. Tai susiję su perspektyvomis nematodų elgseną įtakančias medžiagas panaudoti biologinei kovai su šiais parazitais. Jau yra žinomi penki nespecifiniai kairomonai 12 nematodų rūšių (2 priedas, 1 lentelė), specifiniai kairomonai – dviem augalų parazitiniams nematodų rūšims (2 priedas, 2 lentelė); žinomos 45 nesudėtingos cheminės medžiagos (druskos, rūgštys, kt.), atraktyvios įvairių rūšių augalų parazitiniams nematodams (2 priedas, 3 lentelė). Žinoma specifinių ritimosi iš kiaušinėlių veiksmių cheminė sudėtis trims augalų parazitiniams nematodų rūšims (2 priedas, 4 lentelė), kur kas daugiau nespecifinių – 79 junginiai 18 rūšių (2 priedas, 5 lentelė). Išskirtas ir identifikuotas vienintelis augalų parazitinių nematodų lytinis feromonas – vanilino rūgštis, kuria sojos cistinių nematodų *H. glycines* patelės vilioja patinus. Manoma, kad augalų parazitiniai nematodai turi feromonų, įtakančių nematodų ritimąsi, agregacijos feromonų bei feromonų, veikiančių populiacijos lyčių santykį. Iš minėtų medžiagų nustatyti septyni bulvinių cistinių nematodų elgseną veikiančios atraktantai

(2 priedas, 3 lentelė), 12 nespecifinių (2 priedas, 5 lentelė) ir tik trys augalinės kilmės medžiagos, įtakojančios šių nematodų ritimąsi (2 priedas, 4 lentelė).

### **1.7. Augalų parazitinių nematodų chemoreceptorius slopinančios medžiagos**

Augalų parazitinių nematodų pagrindinių chemosensorinių organų – amfidžių veikla buvo slopinta įvairiomis medžiagomis. Panaudojus antikūnų savybę susijungti su amfidžių specifinių liaukinių ląstelių išskyromis, buvo slopinta gėlus ant augalų šaknų sukeliančių *Meloidogyne* genties nematodų chemorepcija, ko pasekoje buvo sutrikdyta nematodų reakcija į augalą šeimininką (Stewart *et al.*, 1993a, b). Tokiu pat būdu buvo slopinta ir bulvinių cistinių nematodų amfidžių veikla: po elektrofiziologinio testo nustatyta, kad buvo sutrikdyta *G. rostochiensis* reakcija į bulvių šaknų nuoplovas (Rolfe, 1999) bei sumažinta *G. pallida* invazija į augalą šeimininką (Fioretti *et al.*, 2002). Baltymas lektinas taip pat slopino *Meloidogyne* spp. amfidžių veiklą: įmaišytas į užkrėstą nematodais dirvą, sumažino nematodų sukeltamų gėlų susidarymą ant augalų šeimininkų šaknų (Marban-Mendoza *et al.*, 1987; Davis *et al.*, 1988). Laboratorinėmis sąlygomis *H. glycines* ir *G. pallida* nematodų chemoreceptoriai buvo slopinti genetiškai modifikuotų bulvių šaknų nuoplovomis, kurios turėjo chemoreceptorius slopinantį peptidą (Liu *et al.*, 2005). Nematocidas aldikarbas (2–metil–2–(metiltio)propanal–O–(N–metilkarbamoil)oksimas) slopino augalų parazitinių nematodų *P. penetrans* (Trett, Perry, 1985b) ir *Meloidogyne javanica* (Liu *et al.*, 2005) chemoreceptorių veiklą ir sumažino *M. javanica* nematodo invaziją į augalą šeimininką (Hough, Thomanson, 1975).

## 2. MEDŽIAGA IR METODIKA

### 2.1. Medžiaga

**Bulviniai cistiniai nematodai rūšių atskyrimui.** Rūšių atskyrimui bulvinių cistinių nematodų cistos buvo išrinktos iš 2815 dirvožemio mėginių, paimtų iš 556 ha ploto laukų iš visų 10 Lietuvos apskričių – Alytaus, Kauno, Klaipėdos, Marijampolės, Panevėžio, Šiaulių, Tauragės, Telšių, Utenos bei Vilniaus. Dirvožemio mėginiai buvo pristatyti į Valstybinės augalininkystės tarnybos (buvusios Augalų apsaugos tarnybos) prie Žemės ūkio ministerijos, Fitosanitarinių tyrimų laboratoriją (skyrių) (FTL) nematologiniams tyrimams.

Vadovaujantis standartine procedūra, dirvožemio mėginiai tiriamame lauke buvo imami pusiau cilindrinio (2,5 cm skersmens) dirvožemio paėmimo gražtu arba kastuvėliu iš ne mažiau kaip 5 cm gylio (VŽ, 2001). Mėginiai imti einant lauku stačiakampe gardele arba zigzagu ir sustojant kas kelis (5–6) žingsnius. Vienam 400–500 g mėginiui sudaryti buvo imama po 100 mėginukų, kurių vieną sudarė 4–5 mL dirvožemio. Paimtas dirvožemis buvo supilamas į polietileno maišelius. Mėginiai buvo imti iš laukų, kur buvo auginami kaupiamieji (bulvės, morkos, cukriniai runkeliai ir pan.), varpiniai ar dekoratyviniai augalai, taip pat iš pievų, pūdymų ir medelynų. Bulvių sėklininkystės ūkiuose iš vieno hektaro laukų buvo imami aštuoni dirvožemio mėginiai, o iš visų kitų laukų – keturi (VŽ, 2001). Informacija apie priešsėlio tipą ir dirvožemį nebuvo renkama, todėl neanalizuota.

Įvairių cistinių nematodų rūšių cistos bei panašaus dydžio dalelės iš dirvožemio mėginių FTL flotacijos metodu (Southey, 1986) buvo išplautos ant filtrinio popieriaus naudojant pusiau automatinę Schuiling'o centrifugą (450–500 apsisukimų/min., sunaudojant ~6,5 L vandens vienam dirvožemio mėginiui išplauti, Volkers & Zonen, Olandija). Išplauti ant filtrinio popieriaus dirvožemio mėginiai analizuoti binokuliariniu mikroskopu (didinimas 7,5 × – 12,5 ×, Nikon SMZ 1500, Japonija). Rastos *Globodera* spp. cistos apibūdintos iki rūšies pagal morfologinius požymius. Dėl bulvinių cistinių nematodų rūšių

morfoloģinių panašumų ir morfometrinių matavimų persidengimų tikslesnis rūšių identifikavimas atliktas cistų DNR polimerazinės grandininės reakcijos (PGR) metodu panaudojant rūšims specifinius pradmenis.

**Bulviniai cistiniai nematodai elgsenos tyrimams.** Elgseniniam bulvinių cistinių nematodų testams cistos buvo gautos iš Julius Kühn instituto (Vokietija). Nematodų J2 iš kiaušinėlių ritinti pagal Byrne *et al.* (2001) metodiką. *Globodera rostochiensis* Ro1 (*Ecosse* populiacija) ir *G. pallida* Pa2 (*Kalle* populiacija) cistos savaitei sudėtos į atskiras Petri lėkšteles ant distiliuotu vandeniu sudrėkinto filtrinio popieriaus į termostatą į 21 °C (MIR 253, Sanyo, Japonija). Termostate Petri lėkštelės laikytos tamsoje, nuolat papildant išgaravusią drėgmę. Po to cistos perpjautos skalpeliu vandens laše ant objektyvio stiklelio. Visas cistų turinys su išsiritusiais J2 ir neišsiritusiais kiaušinėliais nedideliu vandens kiekiu (~50 µL) nuplautas į 60 mm skersmens Petri lėkšteles (atskiras kiekvienai nematodų rūšiai) su 1,5 % 1–2 mm storio agaro sluoksniu (Carl Roth, Vokietija). Po to šios lėkštelės buvo perkeltos į tamsų termostatą į 21°C. Vandeniui susigėrus į agarą (po kelių valandų), aktyviai judantys J2 stadijos nematodai panaudoti elgsenos tyrimuose (lenkta entomologine adatėle perkelti ant terpių su testuojamomis medžiagomis).

Iš Julius Kühn instituto elgseniniam testams gautas nedidelis nematodų cistų kiekis, todėl nematodai buvo dauginti laboratorinėmis sąlygomis vazonuose su bulvėmis modifikavus de Scurrah (1981) metodą. FTL šiltnamio kameroje, pritaikytoje dauginti karantininius organizmus, į dešimt 500 mL talpos vazonų su autoklavuotu smėliu pasodinta po *Désirée* (Prancūzija) veislės bulvę. Šios veislės bulvės yra neatsparios (imlios) bulviniams cistiniams nematodams (NIVAA, 1997). Po trijų savaičių kiekvienas vazonas buvo inokuliuotas išsiritusiais J2 iš penkių cistų: penki vazonai inokuliuoti *G. rostochiensis* Ro1 ir penki – *G. pallida* Pa2. Kameroje nustatyta 60 % drėgmė, šviesos ir tamsos ciklai (14:10 val.), palaikyta 22°C. Po 72 dienų bulvės buvo išrautos ir kartu su vazone likusiu smėliu sudėtos į metalinius padėklus bei paliktos išdžiūti kambario temperatūroje. Po dviejų savaičių neatitrūkusios nuo bulvių šaknų cistos surinktos pincetu į Petri lėkšteles. Nuo

šaknų atitrūkusios cistos iš smėlio išplautos flotacijos metodu (naudojant Schuiling'o centrifugą) ant filtrinio popieriaus ir taip pat surinktos į Petri lėkšteles. Lėkštelėse cistos laikytos savaitę kambario temperatūroje (kad išdžiūtų), po to sudėtos į 1,5 mL mėgintuvėlius ir laikytos 6 mėn. +4 °C (ramybės periodas) iki J2 ritinimo.

## **2.2. Metodai**

### **2.2.1. Bulvinių cistinių nematodų rūšių identifikavimas**

**Nematodų rūšių identifikavimas pagal morfologinius požymius.** Iš dirvožemio mėginių flotacijos metodu ant filtrinio popieriaus išplautos *Globodera* spp. cistos (vizualiai nuo kitų cistinių nematodų genčių atskirtos pagal apvalią cistos formą su kyšančia cefaline dalimi) adatėle perkeltos ant objektinio stiklelio į vandens lašą. Nupjovus cistos analinę–vulvarinę dalį skalpeliu, iš jos atsargiai adatėle iškrapštyti kiaušinėliai ir iš kiaušinėlių išsiritę J2 (jei jų buvo). Nupjauta cistos dalis, kiaušinėliai bei J2 nematodai uždengti dengiamuoju stikleliu. Stiklelio krašteliai patepti bespalviu nagų laku. Laikini preparatai 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 (preparatai su J2 prieš tai kelias sekundes pakaitinti liepsnoje, kad nematodai nejudėtų), išmatuoti kompiuterine programa (Image Pro Plus 3, Media Cybernetics, JAV) ir, remiantis morfologiniais požymiais, apibūdinti iki rūšies (1 lentelė) (Baldwin, Mundo-Ocampo, 1991; Brzeski, 1998; Manduric, Anderson, 2004; Dobosz *et al.*, 2006).

#### **Nematodų rūšių identifikavimas PGR metodu.**

DNR išskyrimas iš cistų. Cistų DNR išskirta naudojant NucleoSpin Tissue DNR skyrimo rinkinį pagal gamintojo rekomenduojamą protokolą (Macherey–Nagel, Vokietija). Prieš DNR išskyrimą cistos 24 val. pamerktos į

distiliuotą vandenį. Po to perkeltos į 1,5 mL mėgintuvėlius su 180 µL lizės tirpalu bei sutrintos mikrogrūstuvėliu. Išskirta DNR laikyta – 20 °C.

DNR amplifikacija. Darbo pradžioje *G. rostochiensis* ir *G. pallida* cistų DNR amplifikacijai buvo naudojami Fullaondo *et al.* (1999) nustatyti DNR pradmenys bei PGR sąlygos:

- ✓ 5'GCAAGCCCAGCGTCAGCAAC3',  
5'GAACATCAACCTCCTATCGG3' – *G. rostochiensis* atveju;
- ✓ 5'TGTCCATTCCTCTCCACCAG3',  
5'CCGCTTCCCCATTGCTTTTCG3' – *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 MgCl<sub>2</sub> (Thermo Scientific, Lietuva);
- ✓ 0,2 mM dNTP (dezoksinukleozidtrifosfatų) 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 (dietilpirokarbonatas) H<sub>2</sub>O (Roth, Vokietija) pridėta tiek, kad mišinio galutinis tūris būtų 25 µL.

Kiekvieną kartą atlikus tiriamų mėginių DNR amplifikaciją tuo pat metu ir tomis pačiomis sąlygomis buvo amplifikuotos teigiamos ir neigiamos kontrolės mėginių DNR:

- ✓ neigiama kontrolė – DEPC H<sub>2</sub>O;
- ✓ teigiamos kontrolės: *G. rostochiensis* bei *G. pallida* DNR (Valstybinės Augalų apsaugos tarnybos nematologijos laboratorija, Prancūzija).

Amplifikacija vykdyta termocikleryje (Mastercycler personal 5332, Eppendorf, Vokietija), kur periodiškai keista reakcijos tirpalo temperatūra. Cistų DNR amplifikavimui naudota programa:

- ✓ 94 °C – 3 min. – pradinė DNR denatūracija;
  - ✓ 94 °C – 30 sek. – DNR denatūracija;
  - ✓ 55 °C – 30 sek. – pradmenų prisijungimas;
  - ✓ 72 °C – 30 sek. – naujos DNR sintetinimas;
  - ✓ 72 °C – 5 min. – baigiama sintetinti nauja DNR.
- } 40 ciklų

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 (triso, acto rūgšties ir EDTA (etilendiaminotetraacto rūgštis)) 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).

### **2.2.2. 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 (Weischer, 1959; Clarke, Hennessy, 1984; Devine, Jones, 2003) ir vandens (kontrolė), kuris nematodus veikia neutraliai (nei vilioja, nei

atstumia, nes natūraliai nematodai tarpsta drėgnoje aplinkoje – augalo audiniuose, vandens pripildytose dirvožemio porose ir pan.). Rezultatų įvertinimui statistiniais metodais pasirinktos ir kitos, ne augalų šeimininkų – cukrinių runkelių, priklausančių balandinių (*Chenopodiaceae*) šeimai, vandeninės šaknų nuoplovos, apie kurias žinoma, kad jos bulviniams nematodams nėra atraktyvios (Rolfe *et al.*, 2000).

**Bulvių šaknų nuoplovų paruošimas.** Vandeninės bulvių šaknų nuoplovos paruoštos pagal Pridannikov *et al.* (2007) metodiką, išskyrus bulvių šaknų nuoplovų filtravimą. Filtravimo buvo atsisakyta todėl, kad filtruojant per filtrinį popierių gali būti prarandamos (susigerti į filtrinį popierių) bulvių šaknų nuoplovoje esančios cheminės medžiagos. Trys *Désirée* bulvių veislės gumbai 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 išrautos, nepažeistos šaknys nuplaautos distiliuotu vandeniu, taip pašalintos likusios smėlio dalelės. Po to kiekvienos bulvės šaknys atskirai pamerktos į 100 mL distiliuoto vandens 24 val. šiltnamyje. Paruoštos nuoplovos iki naudojimo laikytos +4 °C.

**Cukrinių runkelių šaknų nuoplovų paruošimas.** Vandeninės cukrinių runkelių (*Beta vulgaris*) *Belmonte* veislės (Danija) šaknų nuoplovos paruoštos pagal Perry ir Beane (1989) metodiką. Cukrinių runkelių sėklos sudaigtos pagal Harju (2003) metodiką. Sėklos 4 val. mirkytos vandenyje, po to atsargiai trintos į sietą, kad nuo sėklų atliptų prieš tai ant jų platintojo aplikuoti pesticidai (fungicidai, insekticidai). Po to sėklos 24 val. laikytos Petri lėkštelėje ant drėgno filtrinio popieriaus esant 21 °C. Penkiolika sudygusių daigų pasodinta į 400 mL talpos vazoną su autoklavuotu smėliu FTL šiltnamyje, kur nustatyta 60 % drėgmė, šviesos ir tamsos ciklai (14:10 val.), palaikyta 21 °C. Po septynių savaičių cukriniai runkeliai išrauti, jų šaknys nuplaautos distiliuotu vandeniu (taip pašalintos smėlio dalelės) ir pamerktos į 100 mL distiliuoto vandens 24 val. šiltnamyje. Paruoštos nuoplovos iki naudojimo laikytos +4 °C.



### **2.2.3. 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. Tam bulvių šaknų nuoplovos buvo ekstrahuotos pagal Godfrey ir Slater (1994) metodiką. Penkiasdešimt mikrolitrų 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.

### **2.2.4. 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 (1 priedas, 1 lentelė) 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.

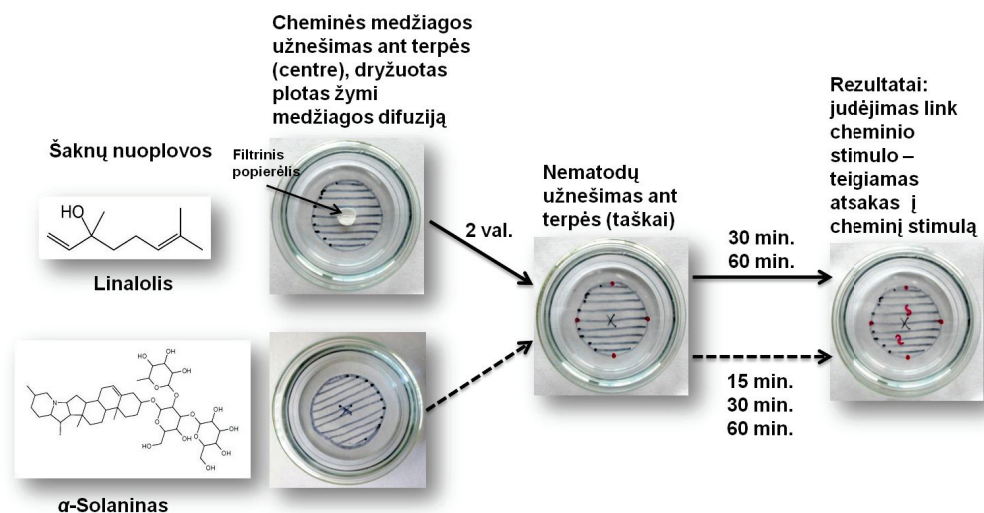
Linalolio kiekis bulvių šaknų nuoplovose, kurios buvo naudojamos nematodų elgsenos tyrimuose, nustatytas kietafazės mikroekstrakcijos (Pawliszyn, 1997) – dujų chromatografijos (Rouessac, Rouessac, 2007) metodu. Į 10 mL talpos kolbutę įpilta 1 mL vandeninių bulvių šaknų nuoplovų ir pridėta 0,3 g NaCl. Kolbutė sandariai uždengta trimis sluoksniais aliuminio folijos ir patalpinta į 40 °C vandens termostatą. Po 15 min., nusistovėjus terminei pusiausvyrai tarp skysčio ir garų fazės, į kolbutės viršerdvį įleistas

kietafazės mikroekstrakcijos siūlas (PDMS–DVB, 65 µm, Supelco, JAV). Prieš ekstrakciją šis siūlas kondicionuotas dujų chromatografo garintuve pagal atitinkamas gamintojo rekomendacijas (250 °C). 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, t. y. paruoštas atitinkamos – 8,7 ng/µL koncentracijos linalolio standarto tirpalas, kuris tuo pačiu būdu kaip ir mėginys sorbuotas ant siūlo ir analizuotas prieš ir po mėginio. Linalolio koncentracija apskaičiuota remiantis standarto koncentracija bei standarto ir analizės smailių plotais.

### 2.2.5. Bulvinių cistinių nematodų elgsenos tyrimai

**Elgseninių reakcijų į augalo šeimininko (bulvių) ir ne šeimininko (cukrinių runkelių) šaknų nuoplovas testas.** Testas *G. rostochiensis* ir *G. pallida* elgsenai tirti buvo atliktas modifikavus Rühm *et al.* (2003) metodiką. Petri lėkštelės (32 mm skersmens), užpildytos 1,5 % 1–2 mm storio agaro sluoksniu (Carl Roth, Vokietija), centre uždėtas 5 mm skersmens filtrinio popieriaus (Schleicher & Shuell Microscience, Vokietija) gabalėlis. Ant filtrinio popierėlio 2 val. prieš atliekant biotestą užlašinti 7 µL vandeninių bulvių šaknų nuoplovų arba kontrolių: vandens ar vandeninių cukrinių runkelių šaknų nuoplovų. Dar 7 µL šaknų nuoplovų buvo užlašinta 1 val. prieš biotesto pradžią (kad nusistovėtų bulvių ir cukrinių runkelių šaknų nuoplovų koncentracijos gradientas). Po 2 val. filtrinis popierėlis buvo nuimamas ir keturi *G. rostochiensis* arba *G. pallida* J2 nematodai ant terpės buvo užnešami

vienodais atstumais vieni nuo kitų ir 1,1 cm atstumu nuo centro (prieš tai Petri lėkštelės dugno pažymėtuose taškuose) (2.2.5.1 pav.).



**2.2.5.1 pav.** Bulvinių cistinių nematodų elgseninių reakcijų į vandenines ir  $n$ -heksanu ekstrahuotas augalo šeiminko (bulvių) ir vandenines ne šeiminko (cukrinių runkelių) šaknų nuoplovas bei sintetinius cheminius junginius (linalolį ir  $\alpha$ -solaniną) schema (Petri lėkštelių nuotraukos - autorės).

Toks atstumas pasirinktas tam, kad Petri lėkštelės plotas būtų padalintas į du lygius plotus: vidinis plotas su tiriamos medžiagos koncentracija, išorinis plotas – be tiriamos medžiagos (2.2.5.1 pav.). Po 30 min. ir po 60 min. nuo nematodų užnešimo ant terpės su tiriama chemine medžiaga, binokuliariniu mikroskopu (didinimas  $7,5 \times - 112,5 \times$ , Nikon SMZ 1500, Japonija) buvo registruojama nematodo padėtis. Nematodų judėjimas link cheminio stimulo šaltinio traktuotas kaip teigiamas 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.

**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 teste į augalo šeimininko ir ne šeimininko šaknų nuoplovas (2.2.5.1 pav.). Kontrolei pasirinktos vandeninės bulvių šaknų nuoplovas ir distiliuotas vanduo. Po 30 min. ir po 60 min. nuo nematodų užnešimo ant terpės su tiriama chemine medžiaga buvo registruojama nematodo padėtis. Testuota po keturis nematodus penkiose lėkštelėse, eksperimentai pakartoti šešis kartus su  $n$ -heksanu ekstrahuotomis bulvių šaknų nuoplovomis ir kontrolėmis.

**Linalolio toksiškumo testas.** 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). Tad pirmiausia buvo tiriamas šios medžiagos toksiškumas bulviniams cistiniams nematodams.

Į vieną laikrodinį stiklelį su 2  $\mu$ L distiliuoto vandens buvo perkelta 50 *G. rostochiensis*, į kitą – 50 *G. pallida* J2 nematodų. Po to į šiuos stiklelius su nematodais buvo įpilti 2 mL sotaus  $1 \times 10^{-3}$  M linalolio (raceminis, grynumas – 97 %, Sigma–Aldrich, Vokietija) tirpalo. Kontrolės atliktos su distiliuotu vandeniu. Laikrodiniai stikleliai įdėti į Petri lėkšteles, uždengti ir laikyti kambario temperatūroje, tamsoje. Kas tris dienas linalolio tirpalas (ir vanduo) buvo pakeičiamas šviežiu tam, kad būtų minimizuotas galimas koncentracijos pakitimas dėl nugaravimo. Nematodų mirtingumas stebėtas 12 dienų iš eilės pro binokuliarinį mikroskopą (didinimas  $7,5 \times$  –  $112,5 \times$ , Nikon SMZ 1500, Japonija). Negyvais laikyti tie nematodai, kurių kūnas buvo tiesus bei nejudėjo po mechaninio dirginimo – palietimo entomologine adatėle (Kong *et al.*, 2006). Viso atlikti keturi biotesto pakartojimai kiekvienai nematodų rūšiai. Nematodų mirtingumas skaičiuotas procentais.

**Elgseninių reakcijų į linalolį testas.** Nematodų elgseninių reakcijų į linalolį tyrimas su tam tikrais pakeitimais, kurie išvardyti žemiau, atliktas taip, kaip ir elgseniniame teste į augalo šeimininko ir ne šeimininko šaknų nuoplovas (2.2.5.1 pav.). Paruošti vandeniniai linalolio nuo  $1 \times 10^0$  M iki

$1 \times 10^{-6}$  M koncentracijos tirpalai. Ant filtrinio popierėlio 2 val. prieš atliekant testą užlašintas 1  $\mu$ L žinomos linalolio koncentracijos tirpalo arba kontrolės – distiliuoto vandens. Kaip dar viena kontrolė pasirinktos vandeninės bulvių šaknų nuoplovas, ant terpės jos buvo užneštos taip, kaip nurodyta testuojant nematodų elgseną į augalo šeimininko ir ne šeimininko šaknų nuoplovas (2.2.5.1 pav.). Po 2 val. filtrinis popierėlis buvo nuimamas ir ant terpės buvo užnešami nematodai. Po 30 min. ir po 60 min. nuo nematodų užnešimo ant terpės su tirama chemine medžiaga buvo registruojama nematodo padėtis. Testuota po keturis nematodus penkiose lėkštelėse, eksperimentai pakartoti šešis kartus su skirtingomis linalolio koncentracijomis ir kontrolėmis. Bulvinių cistinių nematodų elgseninių reakcijų į linalolį teste reakcija į distiliuotą vandenį laikyta neutralia ir prilyginta 50 %.

**Elgseninių reakcijų į  $\alpha$ -solaniną testas.**  $\alpha$ -Solanino 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 (2.2.5.1 pav.). Paruošti  $\alpha$ -solanino (grynumas ~95 %, Sigma–Aldrich, Vokietija) absoliutaus etanolio (grynumas 99 %) nuo  $1 \times 10^{-4}$  M iki  $1 \times 10^{-7}$  M koncentracijos tirpalai. Vienas mikrolitras žinomos  $\alpha$ -solanino koncentracijos arba kontrolės (absoliutaus etanolio) užlašinti Petri lėkštelės centre (testuojant  $\alpha$ -solanino poveikį nematodams 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 terpės jos buvo užneštos taip, kaip nurodyta testuojant nematodų reakciją į augalo šeimininko ir ne šeimininko šaknų nuoplovas (2.2.5.1 pav.). Testo rezultatai fiksuoti po 15; 30 ir 60 min. nuo nematodų užnešimo ant terpės su tirama chemine medžiaga. Testuota buvo po keturis nematodus penkiose lėkštelėse, eksperimentai kartoti 12 kartų su skirtingomis  $\alpha$ -solanino koncentracijomis ir kontrolėmis. Bulvinių cistinių nematodų elgseninių reakcijų į  $\alpha$ -solaniną teste reakcija į tirpiklį – absoliutą etanolį laikyta neutralia ir prilyginta 50 %.

### **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 ir distiliuotas vanduo. Tyrimams naudota 3 mM cinko sulfato ir magnio sulfato vandeninių tirpalų koncentracija. Šios koncentracijos druskų tirpalai yra kai kurių augalų parazitinių nematodų rūšių atraktantai arba ritimosi veiksniai (2 priedas, 3; 5 lentelė) (Clarke, Shepherd, 1966b, 1968; Evans, 1969; Papademetriou, Bone, 1983; Tefft, Bone, 1984; Riddle, Bird, 1985; Di Vito, Sasanelli, 1990; Behm *et al.*, 1995; Charlson, Tylka, 2003), todėl neturėtų pastebimai neigiamai veikti nematodų elgseną. Bulvinių cistinių nematodų *G. rostochiensis* ir *G. pallida* anatomija, fiziologija ir ekologija labai panašios, todėl chemoreptorių slopinimo į atraktyvų cheminį stimulą tyrimams buvo pasirinkta tik viena rūšis – *G. pallida*.

Į laikrodinį stiklėlį įpilta 50  $\mu$ L 3 mM koncentracijos  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  vandeninio tirpalo. Į jį buvo perkelta 20 *G. pallida* J2 nematodų. Tirpale nematodai buvo laikomi 2; 5; 15 arba 30 min. Kontrolė atlikta su 3mM koncentracijos  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  vandeniniu tirpalu ir distiliuotu vandeniu. Po to nematodai iš tirpalo lenkta entomologine adatėle buvo perkeliama į Petri lėkšteles su agaru, kur registruota jų reakcija į  $\alpha$ -solaniną taip, kaip nurodyta elgseninių reakcijų į  $\alpha$ -solaniną teste (2.2.5.1 pav.). Nematodų elgsena fiksuota po 15 min., testuota po keturis nematodus penkiose lėkštelėse, bandymai kartoti šešis kartus.

**Statistinis bulvinių cistinių nematodų elgseninių testų rezultatų vertinimas.** Nematodų elgseninių reakcijų skirtumų į cheminius stimulus statistinis patikimumas buvo įvertintas  $\chi^2$  kriterijumi, rezultatai buvo apdoroti kompiuterine statistikos programa Statistica 6.0 (SatSoft, JAV).

## 2.2.6. Bulvių šaknų išskiriamų medžiagų mikroekstrakcija ir chromatografinė analizė

### **Bulvių šaknų į substratą išskiriamų medžiagų mikroekstrakcija.**

Bulvių šaknų į substratą, šiuo atveju smėlį, išskiriamų medžiagų mikroekstrakcija atlikta pagal Mohny *et al.* (2009) metodiką naudojant silikono vamzdelius. Silikono vamzdelis (skersmuo 0,31 mm (išorinis) × 0,64 mm (vidinis), Helix Medical Europe KG, Vokietija) sukarpytas į 1 m ilgio fragmentus, iš viso paruoštos keturios vamzdelių poros. Į vieną vamzdelio galą atsargiai įverta švirškšto (5 mL, Momina Krepsot, Bulgarija) adata tirpiklio – *n*-heksano prašvirškštimui pro vamzdelį. Prieš eksperimentą vamzdeliai pamerkti 24 val. į tirpiklį (*n*-heksaną), po to iš jo ištraukti ir išdžiovinti 70 °C termostate.

Trys *Désirée* veislės bulvių gumbai atskirai pasodinti 1 L talpos stikliniuose vazonuose su drenažu dugne į autoklavuotą smėlį (2.2.6.1 pav.). Sodinant į kiekvieno vazono smėlį įdėti du silikono vamzdeliai taip, kad suptų augančias bulvių šaknis: 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, kad nepatektų saulės šviesa. Vamzdelių galai su ir be švirškšto adatos apsukti parafilmo juoste, kad į vamzdelį nepatektų pašalinės medžiagos. Augalai auginti FTL šiltnamyje, kur nustatyta 60 % drėgmė, šviesos ir tamsos ciklai (14:10 val.), palaikyta 19 °C. Esant poreikiui bulvės laistytos po 100 mL distiliuoto vandens. Kontrolei pasirinktas vazonas su autoklavuotu smėliu be augalo (bulvės).

Iki šiol nėra duomenų apie tai, 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.*, 1987a). 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 prašvirkšta po 500  $\mu\text{L}$  *n*-heksano, po to po 400  $\mu\text{L}$  oro, kad iš vamzdelių galutinai pasišalintų visas tirpiklis. Surinkti ekstraktai laikyti – 20 °C iki tolimesnės analizės.



**2.2.6.1 pav.** Bulvių šaknų į substratą (smėlį) išskiriamų medžiagų mikroekstrakcija panaudojant silikono vamzdelius (autorės nuotrauka). SV – substrate (smėlyje) įkasto silikono vamzdelio galai.

**Bulvių šaknų į substratą išskiriamų medžiagų analizė dujų chromatografijos metodu.** Bulvių šaknų išskiriamos medžiagos (gautos jas iš smėlio mikroekstrahuojant *n*-heksanu) analizuotos dujų chromatografu (Clarus 500, Perkin Elmer, JAV) su liepsnos jonizacijos detektoriumi (FID), kolonėlė –

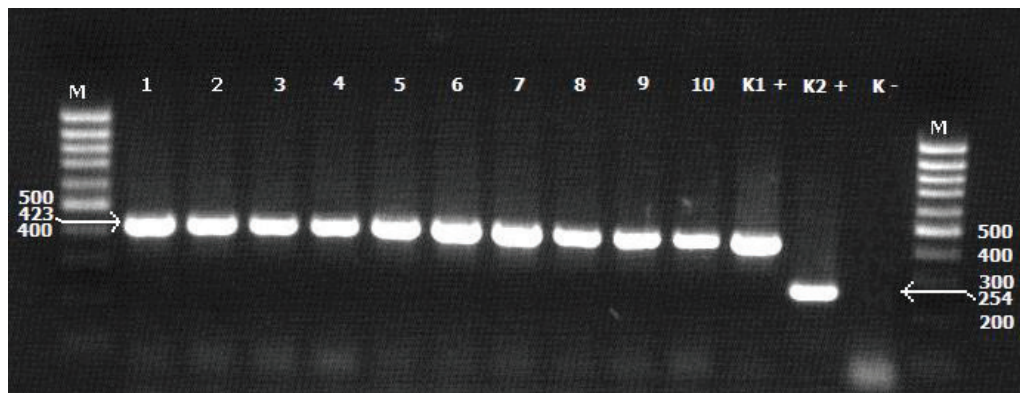


DB–Wax (30 m × 0,25 mm, sorbento sluoksnio storis 0,25 µk, Restek, JAV) (Rouessac, Rouessac, 2007). Detektoriaus ir injektoriaus temperatūra – 250 °C, Kolonėlės termostato temperatūra programuota tokiu būdu: pradinė – 60 °C palaikyta 2 min., po to 7 °C/min. kelta iki 160 °C, tokia palaikyta 2 min. ir toliau kelta 10 °C/min. iki 250 °C ir dar palaikyta 7 min. Nešančių dujų (H<sub>2</sub>) greitis – 1,5 mL/min. Injekcijos tūris – 3 µL.

### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

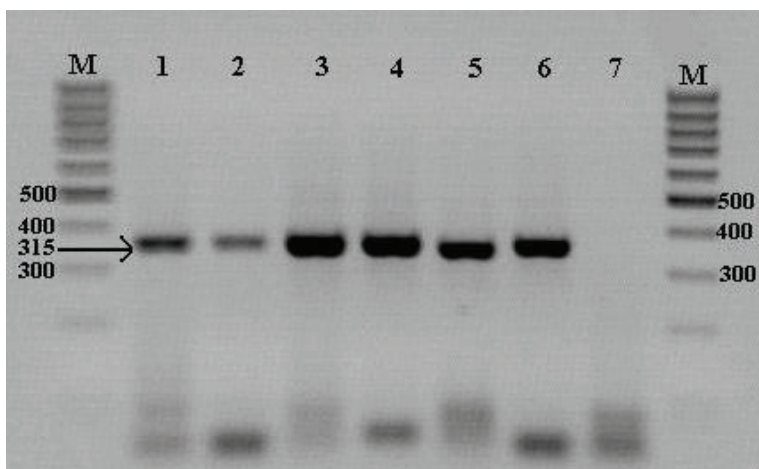
#### 3.1. Lietuvos populiacijos bulvinių cistinių nematodų rūšių identifikavimas PGR metodu

Iš visų 10 Lietuvos apskričių (Alytaus, Kauno, Klaipėdos, Marijampolės, Panevėžio, Šiaulių, Tauragės, Telšių, Utenos bei Vilniaus) surinktų 2815 dirvožemio mėginių rastos ir, remiantis morfologiniais požymiais, identifikuotos 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 (3.1.1 pav.).



**3.1.1 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<sub>2</sub>O. M – atitinkamas DNR ilgio žymuo. Rodyklės rodo DNR amplifikacijos produktų žymę. PGR pradmenys ir sąlygos pagal Pylypenko *et al.* (2005).

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 (3.1.2 pav.), *G. pallida* rūšiai būdingų DNR amplifikacijos produktų – 798 bp – negauta (3.1.2 pav. šie produktai nepateikiami).



**3.1.2 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 H<sub>2</sub>O; M – atitinkamas DNR ilgio žymuo. Rodyklė rodo DNR amplifikacijos produktų žymę. PGR pradmenys ir sąlygos pagal Fullaondo *et al.* (1999).

Iš 187 tirtų cistų tik 80 cistų (42,8 %) DNR amplifikacija buvo sėkminga (2 lentelė).

**2 lentelė.** Bulvinių cistinių nematodų, surinktų iš visų 10 Lietuvos apskričių, polimerazinės grandininės reakcijos (PGR) analizės rezultatai.

Lietuvos apskritis	PGR metodu tirtos cistos, n (%)		
	Viso	Teigiami rezultatai	
		<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
<b>Viso</b>	<b>187</b>	<b>80 (42,8)</b>	<b>0</b>

Kaip parodė šio tyrimo rezultatai, kai kurių, iš dirvožemio mėginių išskirtų, nematodų cistų DNR amplifikacijos produktų nesusidarė (2 lentelė). Tai galėjo lemti šios priežastys: tirtos cistos galėjo priklausyti morfologiškai labai panašioms, kartu su bulviniais cistiniais nematodais dažnai dirvoje tarpstančioms nematodų rūšims – *G. achilleae*, kuri parazituoja paprastąsias kraujažoles (*Achillea millefolium*) ir *G. artemisiae*, kuri parazituoja paprastuosius kiečius (*Artemisia vulgaris*); kita priežastis – tiriamuose mėginiuose galėjo būti per mažos nematodų DNR koncentracijos. Nustatyta koreliacija tarp išskirtos iš cistoje esančių kiaušinėlių DNR koncentracijos bei šių kiaušinėlių gyvybingumo (Fleming *et al.*, 1998). Cistos DNR tyrimams buvo surinktos iš nematodų natūralių buveinių (žemės ūkio paskirties laukų dirvožemio mėginių). Gali būti, kad ilgiau žemėje išbuvusių cistų kiaušinėliai

dėl dirbamuose laukuose taikomos sėjomainos, nepalankių aplinkos sąlygų, ilgo cistų ramybės periodo gali būti mažiau gyvybingi, o tai gali įtakoti išskirtos DNR koncentraciją.

Bulvinių cistinių nematodų monitoringas ir jų židinių likvidavimas Lietuvoje atliekamas nuo 1948 m. (Варшаловича, 1972; Klimakova *et al.*, 1983; Шляпятене, 1986; VAAT, 1999–2007), nuo tada, kai tais pačiais metais pirmą kartą Lietuvoje buvo užregistruota *G. rostochiensis* (Mastauskis, 1955; Кирьянова, 1963). Identifikuojant dirvožemio mėginiuose rastas cistas pagal morfologinius požymius 1948–2006 metais Lietuvoje aptikta tik *G. rostochiensis*, *G. pallida* neaptikta (Mastauskis, 1955; Klimakova *et al.*, 1983; Шляпятене, 1986; VAAT, 1999–2007). Mūsų tyrimų metu, atlikus bulvinių cistinių nematodų identifikaciją remiantis tiek morfologiniais požymiais, tiek molekuliniais metodais, taip pat patvirtinta, kad visose Lietuvos apskrityse paplitusi *G. rostochiensis*, o *G. pallida* neaptikta. Gali būti, kad pastaroji rūšis Lietuvoje neaptikta dėl teisingai parinktos sėjomainos ir pakankamai gerai vykdomos fitosanitarijos 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 dar viena priežastis, kodėl *G. pallida* Lietuvoje nebuvo aptikta.

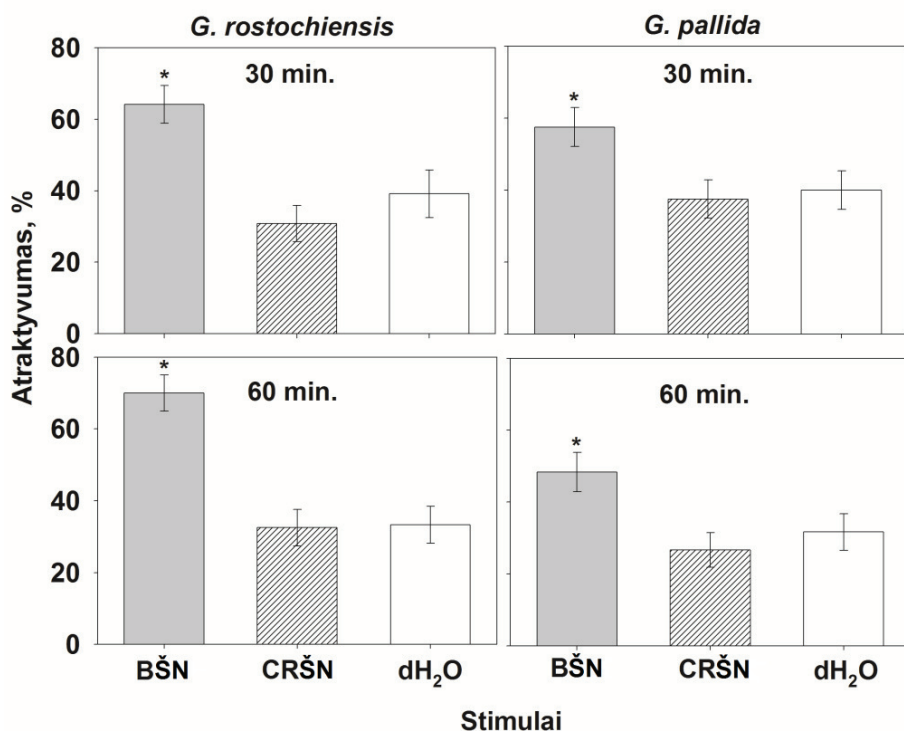
Šiuo metu daug bulvių bei kitos augalinės produkcijos importuojama į Lietuvą iš Vokietijos, Olandijos, Švedijos, Lenkijos (Lukošiūtė, 2005), kur jau yra rasta karantininė *G. pallida* nematodų rūšis (Smith *et al.*, 1997). Neseniai šis cistinis nematodas aptiktas ir Ukrainoje (Pylypenko *et al.*, 2005), tad yra didelė tikimybė *G. pallida* patekti į Lietuvos teritoriją ir čia paplisti.

### **3.2. Bulvinių cistinių nematodų chemoekologinės sąveikos**

#### **3.2.1. Nematodų reakcija į augalo šeimininko (bulvių) ir ne šeimininko (cukrinių runkelių) šaknų nuoplovas**

Atlikus bulvinių cistinių nematodų *G. rostochiensis* ir *G. pallida* J2 elgseninius testus į vandenines augalo šeimininko – bulvių šaknų nuoplovas ir į

tirpiklį – distiliuotą vandenį pastebėta, kad bulvių šaknų nuoplovos bulviniams cistiniams nematodams buvo žymiai patrauklesnės nei distiliuotas vanduo ( $P < 0,05$ ) (3.2.1.1 pav.). Tokie rezultatai išliko abiem nematodų elgsenos fiksavimo laikais – po 30 min. ir po 60 min. nuo nematodų užnešimo ant terpės su cheminiu stimulu. 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 (3.2.1.1 pav.).



**3.2.1.1 pav.** Bulvinių cistinių nematodų reakcija į bulvių (BŠN) ir cukrinių runkelių (CRŠN) šaknų nuoplovas bei į distiliuotą vandenį (dH<sub>2</sub>O) 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 ( $\chi^2$ -testas,  $P < 0,05$ ).

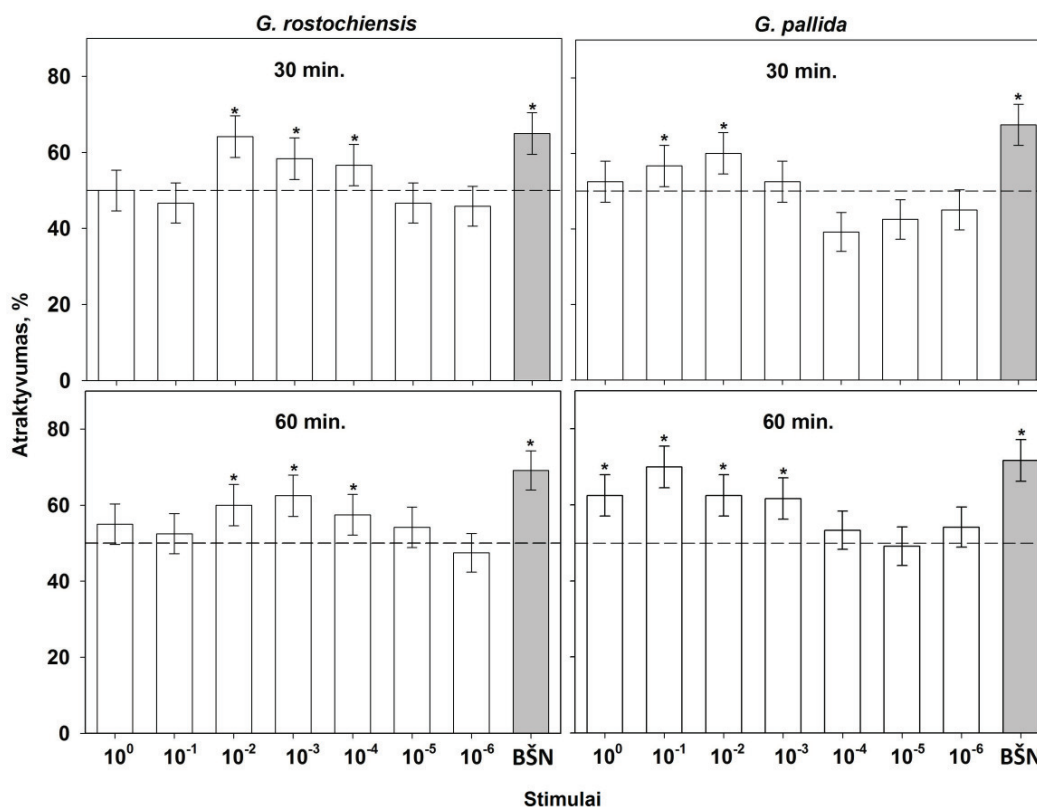
Panašų į šį tyrimą atliko bei panašius rezultatus gavo Rolfe *et al.* (2000). Taigi šio tyrimo rezultatai liudija, jog šio darbo tolimesniems bulvinių cistinių nematodų elgsenos tyrimams numatomas taikyti testas yra visiškai tinkamas,

nes testuojant iš anksto žinomus du skirtingus stimulus (patrauklius ir nepatrauklius nematodams) gauti rezultatai visiškai atitiko laukiamus.

### 3.2.2. Linalolio poveikis bulviniams cistiniams nematodams

**Linalolio toksiškumo bulviniams cistiniams nematodams tyrimas.** Distiliuotame vandenyje abiejų rūšių – *G. rostochiensis* ir *G. pallida* J2 išgyveno visą stebėjimo laiką, t. y. 12 dienų. Išgyvenamumas siekė 99 %. Sočiame linalolio tirpale ( $1 \times 10^{-3}$  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  $1 \times 10^{-3}$  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 rezultata 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 stadijai. Tačiau skyrėsi abiejų nematodų rūšių reakcijos į šį junginį. Pirmiausia nustatyta, kad *G. rostochiensis* buvo jautresnė linaloliui lyginant su *G. pallida* (3.2.2.1 pav.). Tiek po 30 min., tiek po 60 min. nuo nematodų užnešimo ant terpės su tiriami chemine medžiaga *G. rostochiensis* mažiausia atraktyvi linalolio koncentracija buvo  $1 \times 10^{-4}$  M, o jos atraktyvumas statistiškai patikimai nesiskyrė nuo bulvių šaknų nuoplovų atraktyvumo ( $P > 0,05$ ) (3.2.2.1 pav.). Tuo tarpu *G. pallida* po 30 min. nuo nematodų užnešimo ant terpės su testuojama chemine medžiaga, mažiausia atraktyvi linalolio koncentracija buvo  $1 \times 10^{-2}$  M, o po 60 min. –  $1 \times 10^{-3}$  M ir taip pat statistiškai patikimai nesiskyrė nuo bulvių šaknų nuoplovų atraktyvumo ( $P > 0,05$ ).



**3.2.2.1 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 (BŠN). Punktyrinė linija žymi reakciją į distiliuotą vandenį, žvaigždutės virš stulpelių – statistiškai patikimus reakcijų į stimulus skirtumus lyginant su reakcija į distiliuotą vandenį ( $\chi^2$ -testas,  $P < 0,05$ ).

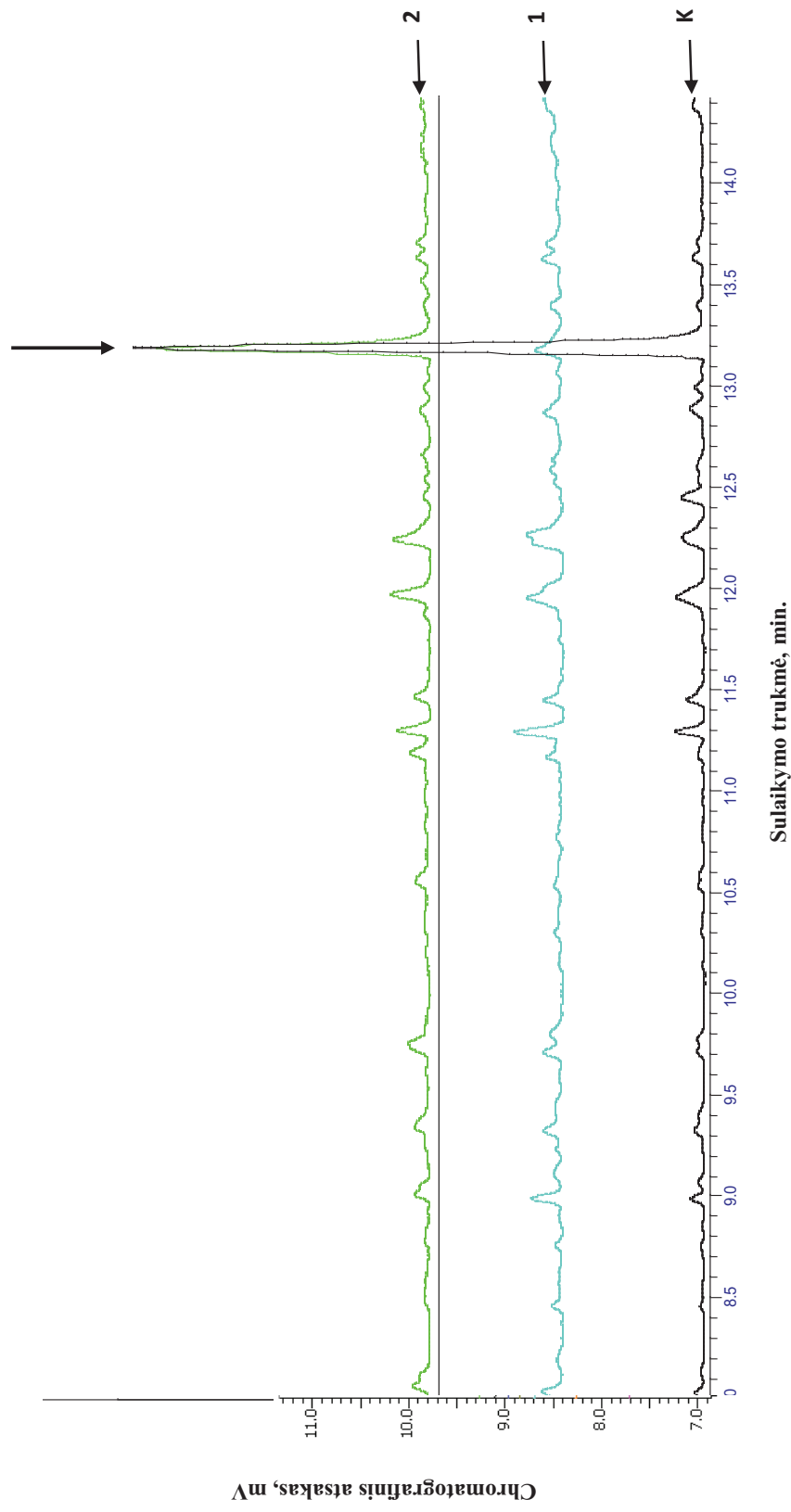
Taip pat skyrėsi ir bulviniams cistiniams nematodams atraktyvių linalolio koncentracijų diapazonas. Po 30 min. ir po 60 min. nuo nematodų užnešimo ant terpės su testuojama medžiaga *G. rostochiensis* buvo atraktyvios tos pačios –  $1 \times 10^{-2}$  M –  $1 \times 10^{-4}$  M linalolio koncentracijos (3.2.2.1 pav.). Tačiau *G. pallida* po 30 min. –  $1 \times 10^{-1}$  M ir  $1 \times 10^{-2}$  M, o po 60 min. šis koncentracijų intervalas prasiplėtė tiek į mažesnės, tiek į didesnės koncentracijos sritį ir apėmė koncentracijas nuo  $1 \times 10^0$  M iki  $1 \times 10^{-3}$  M (3.2.2.1 pav.). Didžiausios koncentracijos linalolio mišiniai ( $1 \times 10^0$  M ir  $1 \times 10^{-1}$  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 nuoploose nustatymas.** Linalolio koncentracija bulvių šaknų nuoploose, naudotose elgseniniais tyrimams, įvertinta dujų chromatografijos metodu ir nustatyta, kad ji buvo vidutiniškai lygi  $9,7 \times 10^{-6}$  M (3.2.2.2 pav.). Ši koncentracija yra tris kartus mažesnė nei linalolio koncentracijos, į kurias bulvinių cistinių nematodų J2 stadija reagavo teigiamai (slenkstinės koncentracijos  $1 \times 10^{-4}$  M ir  $1 \times 10^{-3}$  M). Tačiau natūraliomis sąlygomis šaknyse turėtų būti didesnės linalolio koncentracijos nei bioteste naudotų šaknų nuoploose. Bulvių šaknys, prieš paruošiant nuoplovas, buvo perplaunamos vandeniu smėlio dalelėm pašalinti, dėl to kartu buvo pašalinama ir dalis cheminių medžiagų, tame tarpe ir linalolio.

Žinoma, kad linalolis dvejopai veikia keleto dirvožemyje gyvenančių nematodų rūšių elgseną. Linalolis veikia kaip atraktantas nematodą *Pristionchus maupasi*, kurio gyvenimo ciklas glaudžiai susijęs su vabzdžiu: vabzdžio šeimininko (*Melolontha hippocastani*) išskiriamo fenolio poveikis nematodui sinergetiškas su vabzdžio mitybinių augalų (*Quercus rubra*, *Prunus serotina* ir *Carpinus betulus*) išskiriamomis lakiomis apsauginėmis medžiagomis, iš kurių viena – linalolis (Hong, Sommer, 2006). Nustatyta, kad linalolis atraktyvus ir kitiems su vabzdžiais susijusiems nematodams – *Diplogasteriodes magnus* (Hong *et al.*, 2008) ir *Heterorhabditis megidis* (Köllner *et al.*, 2008).



**3.2.2.2 pav.** Linalolio iš bulvių šaknų nuoplovų chromatogramos fragmentas. Linalolio sulaikymo laikas ~13,2 min. K – kontrolė – linalolio standartas (8,7 ng/ $\mu$ L) (rodyklė); 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.

Linalolis toksiškai veikia kai kuriuos augalų parazitinius nematodus: gėlus ant augalų šaknų sukeliančius *Meloidogyne arenaria* (Walker, Melin, 1996), *M. incognita* (Chatterjee *et al.*, 1982; Leela *et al.*, 1992; Ibrahim *et al.*, 2006) ir *M. javanica*; sėklų gėlus sukeltą *Anguina tritici*; pupuolių cistinį *Heterodera cajani*; citrusinių augalų parazitą *Tylenchulus semipenetrans* (Malik *et al.*, 1987; Sangwan *et al.*, 1990) ir pušinių stiebinį *B. xylophilus* (Kong *et al.*, 2007). Po linalolio toksiškumo tyrimo bulviniams cistiniams nematodams 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 stadijai.

Vandenyje (spontaniškai) išsiritę *G. rostochiensis* ir *G. pallida* J2 stadijos nematodai yra viliojami tų pačių bulvių šaknų nuoplovų frakcijų, o bulvių šaknų nuoplovose išsiritę – skirtingų (Devine, Jones, 2003). Mūsų elgseniniam teste buvo tiriama tik vandenyje išsiritusių nematodų elgsena, o jų jautrumas atraktyviam junginiui skyrėsi. Norint ištirti linalolio poveikį bulvių šaknų nuoplovose išsiritusiems nematodams, reikėtų atlikti papildomus tyrimus.

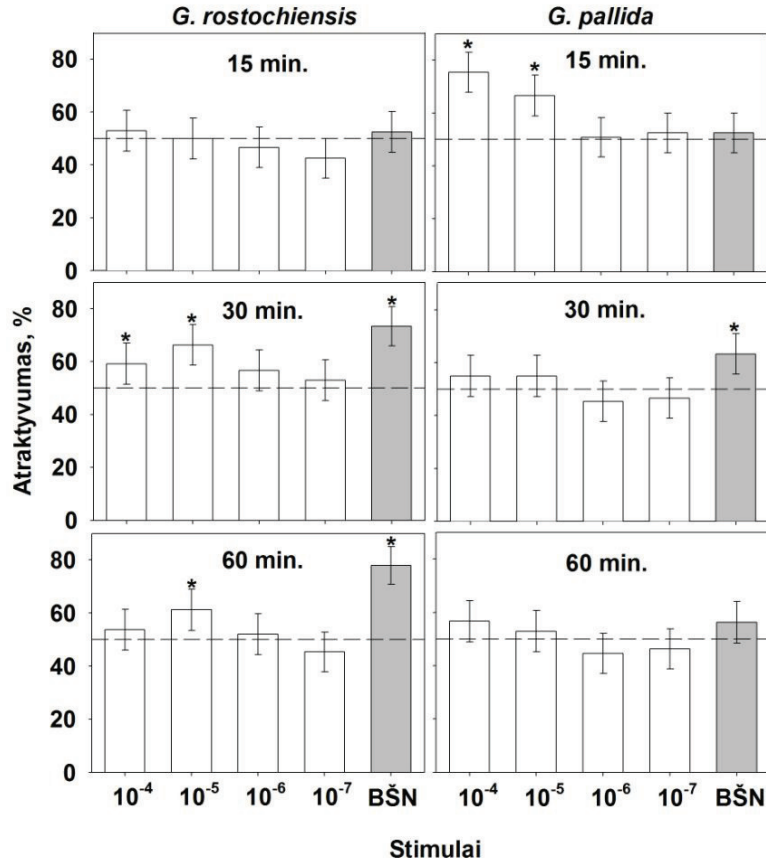
Iki šiol nustatyta keletas cheminių medžiagų, kurios stimuliuoja bulvinių cistinių nematodų ritimąsi iš kiaušinėlių (2 priedas, 4; 5 lentelė) (Devine *et al.*, 1996; Byrne *et al.*, 2001; Maher, 2001). Taip pat keletas cheminių medžiagų, atraktyvių J2 stadijos (Rode, 1965; Evans, 1969) ir suaugusiems bulvinių cistinių nematodų patinams (2 priedas, 3 lentelė) (Riga *et al.*, 1997). Nepaisant žinomų medžiagų, atraktyvių J2, iki šiol nebuvo nustatyta jokia augalinės kilmės cheminė medžiaga, atraktyvi šios stadijos nematodams. Taigi 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). Tad jis 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 (3.2.2.1 pav.). Tai rodo, kad be linalolio bulvių šaknų nuoplovose turi būti daugiau junginių ar jų mišinių, veikiančių bulvinių cistinių nematodų J2 elgseną ir besiskiriančių specifiškumu.

Apibendrinant mūsų gautus rezultatus, galima teigti, jog linalolis, išskiriamas bulvių šaknų, nėra toksiškas abiejų rūšių bulvinių cistinių nematodų J2 stadijai. Linalolis yra atraktyvus tiek *G. rostochiensis*, tiek *G. pallida* J2. Nustatyti dviejų karantininių bulvinių cistinių nematodų tarprūšiniai chemoekologiniai skirtumai – *G. rostochiensis* jautresnė linaloliui nei *G. pallida* (slenkstinės koncentracijos  $1 \times 10^{-4}$  M ir  $1 \times 10^{-3}$  M).

### 3.2.3. $\alpha$ -Solanino poveikis bulviniams cistiniams nematodams

Atlikus bulvinių cistinių nematodų elgseninius testus į  $\alpha$ -solaniną nustatyta, kad jis buvo atraktyvus tiek *G. rostochiensis*, tiek *G. pallida* J2 stadijai. Abi bulvinių cistinių nematodų rūšys reagavo į tas pačias  $\alpha$ -solanino koncentracijas –  $1 \times 10^{-4}$  M ir  $1 \times 10^{-5}$  M, reakcija į jas statistiškai patikimai skyrėsi nuo reakcijos į tirpiklį – etanolį ( $P < 0,05$ ) (3.2.3.1 pav.). Be to, buvo nustatyti tarprūšiniai nematodų reakcijų skirtumai į šį cheminį junginį. Pastebėtas *G. rostochiensis* reakcijos vėlavimas laike į  $\alpha$ -solaniną lyginant su *G. pallida*. *Globodera pallida* į junginį 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  $\alpha$ -solaniną išnyko (3.2.3.1 pav.). *Globodera rostochiensis* į junginį reagavo lėčiau – po 30 min. ir po 60 min. ir reakcija išliko ilgiau (3.2.3.1 pav.).



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

$\alpha$ -Solaninas – vienas iš labiausiai dominuojančių kultivuojamų bulvių alkaloidų (Friedman, McDonald, 1997; Friedman, 2006). Jis yra specifinė *G. rostochiensis* ritimaši iš kiaušinėlių inicijuojanti medžiaga, tačiau tokios reakcijos nesukelia *G. pallida* nematodams (Devine *et al.*, 1996; Byrne *et al.*, 2001). Literatūroje teigiama, kad bulvinių cistinių nematodų ritimosi veiksniai galėtų būti ir jiems atraktyvios medžiagos (Perry, 1998). Tad, atlikus bulvinių cistinių nematodų elgsenos tyrimus į  $\alpha$ -solaniną, nustatyta, kad šis, specifinis

bulvių išskiriamas antrinis metabolitas yra ir atraktyvus ne tik *G. rostochiensis*, bet ir *G. pallida* J2 nematodams.

Nors agarų lėkštelėse biotestuose neįmanoma nustatyti tikslios cheminės medžiagos, kuri sukelia nematodų reakcijas, koncentracijos (Perry, 2001), *G. rostochiensis* ir *G. pallida* šiame elgseniniam teste galėjo reaguoti į tas panašias  $\alpha$ -solanino koncentracijas, kurios sukelia *G. rostochiensis* ritimąsi iš kiaušinėlių –  $1 \times 10^{-3}$  M ir  $1 \times 10^{-4}$  M (atraktyvios nematodams yra  $1 \times 10^{-4}$  M ir  $1 \times 10^{-5}$  M koncentracijos) (Devine *et al.*, 1996). Dėl to, kad  $\alpha$ -solaninas nėra *G. pallida* ritimosi veiksnys, galėjo atsirasti ir tarprūšiniai reakcijos į cheminį stimulą skirtumai – skirtingi reakcijos laikai.

Nustatyta, kad vandenyje išsiritusiems abiejų bulvinių cistinių nematodų rūšių J2 atraktyvios tos pačios bulvių šaknų nuoplovų frakcijos, o bulvių šaknų nuoplovose – skirtingos (Devine, Jones, 2003). Šio tyrimo metu vandenyje išsiritusių *G. rostochiensis* ir *G. pallida* nematodų reakcija į atraktyvų cheminį stimulą –  $\alpha$ -solaniną skyrėsi. Norint nustatyti, ar skirtusi bulvių šaknų nuoplovose išsiritusių bulvinių cistinių nematodų reakcija į  $\alpha$ -solaniną nuo vandenyje išsiritusių, reikėtų atlikti papildomus tyrimus.

Dirvoje dėl grybų bei gruntinio vandens mikroorganizmų poveikio  $\alpha$ -solaninas skyla į mažesnės molekulinės masės junginius ( $\gamma$ - ir  $\delta$ -solaniną bei solanidiną) (apžvalga: Jansen *et al.*, 2009a). Viršutiniame dirvožemio sluoksnyje bulvių laukuose glikoalkaloidų (tame tarpe ir  $\alpha$ -solanino) kiekis palyginti su kiekiu bulvėse yra labai mažas – tik 2 %, ir jis per žiemą pakinta mažai (Jansen *et al.*, 2009a, b). Greičiausia, sudygus bulvėms bei pradėjus gamintis  $\alpha$ -solaninui, per pirmąsias savaites galėtų susikaupti pakankamas (Farrer, Phillips, 1983; Rawsthorne, Brodie, 1986; Devine, Jones, 2003) kiekis  $\alpha$ -solanino, reikalingo bulvinių cistinių nematodų judėjimui link augalų šeiminkų stimuliuoti. Išsiritę J2 stadijos nematodai per 6–11 dienų pasiekia augalo šaknis (Robinson *et al.*, 1987a). Tikriausiai, kad po to didėjanti  $\alpha$ -solanino koncentracija prie bulvių nematodų elgsenai įtakos nebeturi. Tad, remiantis bulvių cistinių nematodų elgseninėmis reakcijomis į  $\alpha$ -solaniną,

galima teigti, kad  $1 \times 10^{-4}$  M ir  $1 \times 10^{-5}$  M koncentracijos  $\alpha$ -solanino visiškai pakaktų sužadinti nematodų judėjimą link augalo šeimininko.

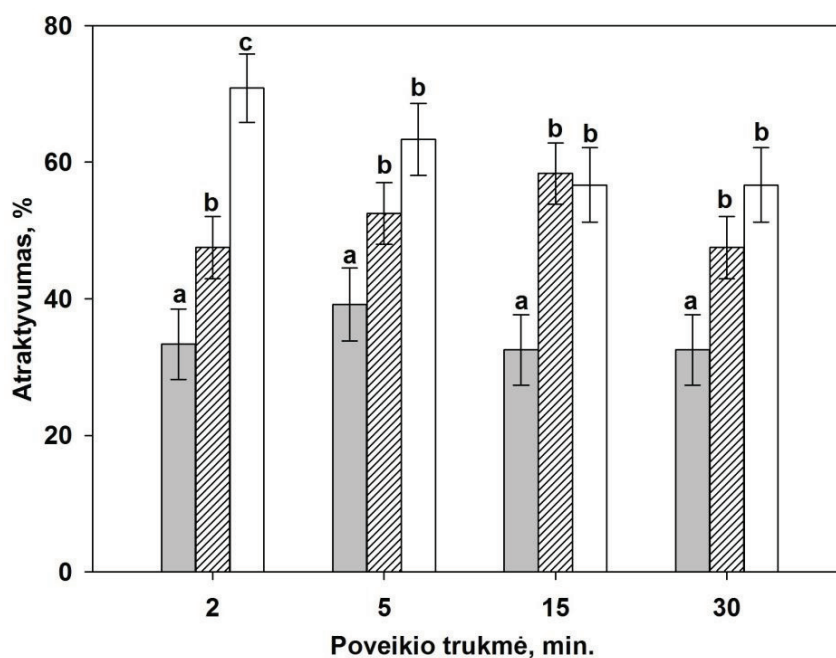
Literatūroje nėra duomenų apie *G. rostochiensis* ir *G. pallida* J2 stadijos nematodams atraktyvias augalinės kilmės chemines medžiagas. Mūsų ankstesnių tyrimų metu pirmą kartą nustatyta augalo šeimininko – bulvių išskiriama nespecifinė cheminė medžiaga – linalolis, atraktyvi bulviniams cistiniams nematodams (3.2.2.1 pav.). Šio tyrimo metu pirmą kartą nustatytas specifinis bulvių į aplinką išskiriamas cheminis junginys –  $\alpha$ -solaninas (apžvalga: Eich, 2008), 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 ir  $\alpha$ -solanino bulvių šaknų nuoplovose gali būti daugiau ir specifiskesnių medžiagų ar jų mišinių, viliojančių abi bulvinių cistinių nematodų rūšis.

Apibendrinant bulvinių cistinių nematodų elgseninių reakcijų į  $\alpha$ -solaniną tyrimą nustatyta, kad  $\alpha$ -solaninas yra atraktyvus šiems karantininiams nematodams. Pagal jautrumą  $\alpha$ -solaninui nebuvo užregistruota tarprūšinių skirtumų, tačiau skyrėsi bulvinių cistinių nematodų reakcijos greitis į šį cheminį stimulą: *Globodera pallida* į junginį 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  $\alpha$ -solaniną išnyko; *G. rostochiensis* į junginį reagavo lėčiau – po 30 min. ir po 60 min. ir reakcija išliko ilgiau.

#### **3.2.4. Bulvinių cistinių nematodų chemoreceptorių slopinimas**

Paveikus *G. pallida* J2 stadijos nematodus 3 mM koncentracijos cinko sulfato vandeniniu tirpalu reakcija į atraktyvų cheminį junginį –  $\alpha$ -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 ( $P < 0,05$ ) (3.2.4.1 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 reakcija į  $\alpha$ -solaniną (3.2.4.1 pav.). Ši nematodų reakcija taip pat statistiškai patikimai skyrėsi ( $P < 0,05$ ) nuo nematodų reakcijos į  $\alpha$ -solaniną veikiant distiliuotu vandeniu. Po ilgesnės ekspozicijos – 5–30 min. magnio sulfato tirpalu nematodų reakcijos į  $\alpha$ -solaniną slopinimas išnyko – nematodai adaptavosi šios druskos poveikiui (3.2.4.1 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 ( $\alpha$ -solaniną) neliko.



**3.2.4.1 pav.** *Globodera pallida* reakcija į  $\alpha$ -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) ( $\chi^2$ -testas,  $P < 0,05$ ).



Apie cinko sulfato tirpalo, kuris slopina žinduolių uoslės (Alberts, 1974) bei vabzdžių uoslės ir skonio receptorių veiklą (Bakakrishnan, Pollack, 1997; Groh *et al.*, 2002; Baužienė, Būda, 2010) nematodų, tame tarpe ir bulvinių cistinių chemoreceptorių slopinamą poveikį iki šiol duomenų nebuvo. Literatūroje yra tik negausių žinių apie kitas medžiagas, slopinančias bulvinių cistinių nematodų chemoreceptorių veiklą. Atlikus elektrofiziologinį testą nustatyta, kad, panaudojus antikūnų savybę susijungti su amfidžių specifinių liaukinių ląstelių išskyromis, slopinami bulvinių cistinių nematodų chemoreceptoriai: sutrikdoma *G. rostochiensis* reakcija į bulvių šaknų nuoplovas (Rolfe, 1999) bei sumažinama *G. pallida* invazija į augalą šeimininką (Fioretti *et al.*, 2002). *Globodera pallida* chemoreceptorių veiklą taip pat slopina genetiškai modifikuotų bulvių šaknų nuoplovas, kurios turi chemoreceptorius slopinantį peptidą (Liu *et al.*, 2005).

Cinko sulfato tirpalas yra kelių cistinių *Heterodera* genties (Clarke, Shepherd, 1966b, 1968; Tefft, Bone, 1984; Di Vito, Sasanelli, 1990; Behm *et al.*, 1995; Charlson, Tylka, 2003) bei tabakinio cistinio *G. tabacum* (Clarke, Shepherd, 1966b, 1968) nematodų ritimąsi sukelianti medžiaga. Cinko sulfato tirpalas taip pat yra sojos cistinio nematodo *H. glycines* atraktantas (Papademetriou, Bone, 1983). Šio darbo metu, atlikus *G. pallida* J2 stadijos nematodų chemoreceptorių slopinimo cinko sulfato tirpalu tyrimą, paaiškėjo kita šio metalo druskos tirpalo savybė – 3mM koncentracijos tirpalas slopina nematodų chemoreceptorių reakciją į atraktyvų cheminį stimulą –  $\alpha$ -solaniną. Magnio sulfato vandeninis tirpalas taip pat yra *G. rostochiensis* ir daugelio augalų rūšių parazito *Rotylenchulus reniformis* atraktantas (Evans, 1969; Riddle, Bird, 1985). Lyginant su magnio sulfato vandeniniu tirpalu, cinko sulfato tirpalas efektyviai slopina *G. pallida* chemoreceptorių veiklą, nes nematodų reakcija į  $\alpha$ -solaniną buvo slopinama visame ekspozicijos šia druska intervale – nuo 2 min. iki 30 min.

Chemoreceptorių slopinimo tyrimams pasirinkti *G. pallida* J2 stadijos nematodai greičiau reaguoja į testavimui pasirinktą medžiagą –  $\alpha$ -solaniną, ką parodė šio darbo ankstesni rezultatai (3.2.3.1 pav.). Pažymėtina, kad toks

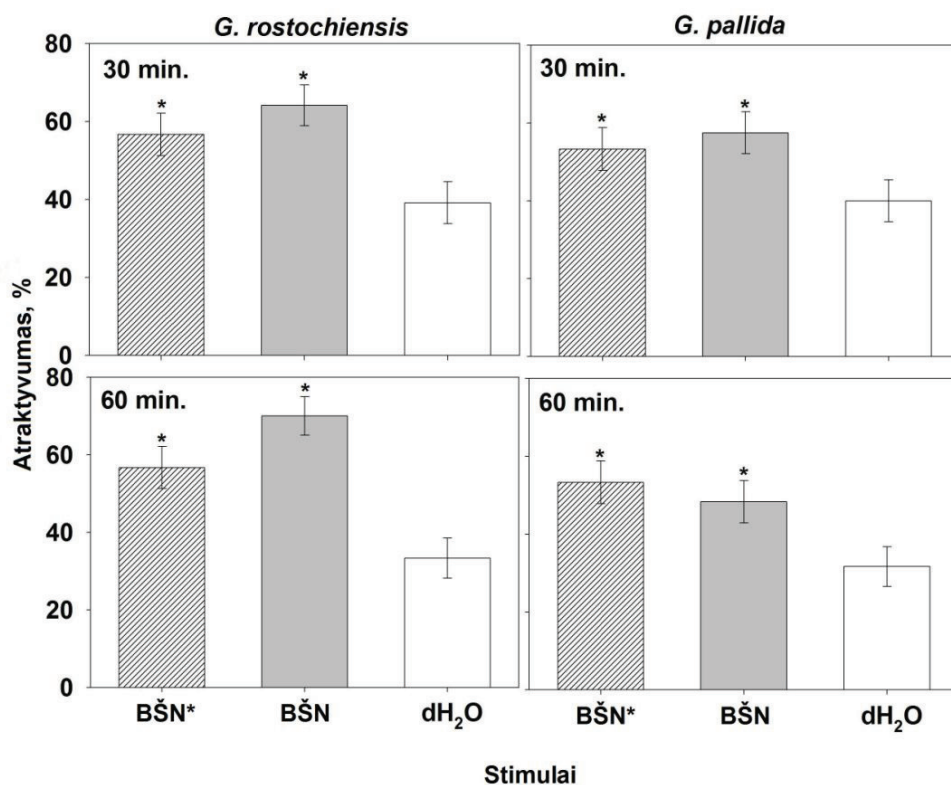
reakcijos laikas leido sutrumpinti tiek testavimo, tiek ir viso bandymo trukmę. Kadangi bulvinių cistinių nematodų rūšys yra labai artimos, manytina, kad cinko sulfato tirpalas turėtų slopinti ir *G. rostochiensis* chemoreceptorių veiklą.

Apibendrinant bulvinių cistinių nematodų chemoreceptorių veiklos slopinimo tyrimą pirmą kartą nustatyta, jog cinko sulfato vandeninis tirpalas slopina *G. pallida* elgseninę reakciją į atraktyvų cheminį stimulą –  $\alpha$ -solaniną. Trumpalaikė ekspozicija magnio sulfato vandeniniu tirpalu taip pat sukelia panašią į minėtą nematodų reakciją, tačiau ilgėjant ekspozicijos laikui nematodai adaptuojasi šios druskos poveikiui, todėl trumpalaikis poveikis priskirtas stresui sukeliama nematodui, kai jis patenka į tirpalą. Cinko sulfatas efektyviai sutrikdo normalią nematodų elgseną į atraktyvų cheminį stimulą. Trikdymo efektas sukeliamas tiek po trumpalaikės (2 min.), tiek ir po ilgesnės ekspozicijos (5–30 min.) tirpale. Tad mūsų aptiktas slopinimas cinko sulfato tirpalo poveikis yra naujas ir gali būti panaudotas tiek elektrofiziologijos, tiek elgsenos lauko sąlygomis tyrimuose.

### 3.3. Bulvių šaknų išskiriamų medžiagų tyrimas

**Bulvių šaknų į substratą išskiriamų medžiagų tirpiklio tinkamumo patikra elgseniniu testu.** Atlikus bulvinių cistinių nematodų *G. rostochiensis* ir *G. pallida* J2 stadijos 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 (3.3.1 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* (3.3.1 pav.). Nustatyti statistiškai patikimi J2 nematodų reakcijos skirtumai į vandenines bulvių šaknų nuoplovas ir į distiliuotą vandenį ( $P < 0,05$ ) abiem elgsenos į šias medžiagas fiksavimo laikais (3.3.1 pav.). Statistinių skirtumų tarp reakcijos į *n*-heksanu ekstrahuotas

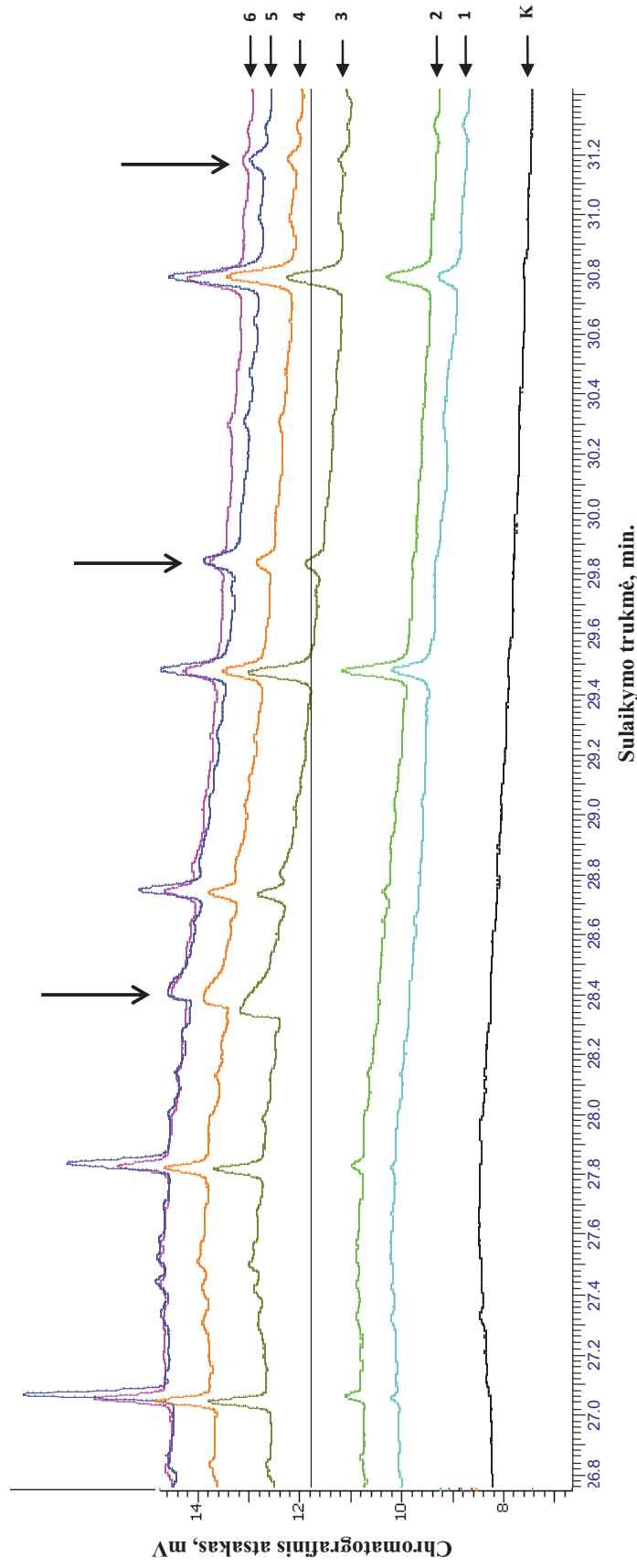
ir į vandenines bulvių šaknų nuoplovas nenustatyta ( $P > 0,05$ ) (3.3.1 pav.), t. y. tiek  $n$ -heksanu ekstrahuotos, tiek vandeninės bulvių šaknų nuoplovas abiejų rūšių nematodams buvo atraktyvios. Taigi šio elgseninio testo metu nustatyta, kad  $n$ -heksanas yra tinkamas tirpiklis ekstrahuoti bulvių šaknų į aplinką išskiriamas nematodams atraktyvias chemines medžiagas.



**3.3.1 pav.** *Globodera rostochiensis* ir *Globodera pallida* reakcija į  $n$ -heksanu ekstrahuotas (BŠN\*) ir vandenines (BŠN) bulvių šaknų nuoplovas bei į distiliuotą vandenį (dH<sub>2</sub>O) 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 ( $\chi^2$ -testas,  $P < 0,05$ ).

**Bulvių šaknų į substratą išskiriamų medžiagų analizė dujų chromatografijos metodu.** Šešių savaitių bulvių šaknų į substratą išskiriamų medžiagų *n*-heksaninių 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. (3.3.2 pav.). Šio tyrimo metu bulvės sudygo per pirmąją savaitę po pasodinimo. Tad 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. Šeštos savaitės chromatogramoje matyti, kad chromatogramos pikų smailės (kurių plotas atspindi medžiagos kiekį) žemėja (3.3.2 pav.). Tai rodo, kad aptiktų trijų cheminių medžiagų šią savaitę bulvių išskiriamų medžiagų mišinyje jau ima mažėti. Tai atitinka žinomus duomenis: po penktos savaitės po bulvių sudygimo bulvių šaknų išskyros dėl sumažėjusio bulvių šaknų išskiriamų medžiagų aktyvumo nebeinicijuoja bulvinių cistinių nematodų ritimosi (Rawsthorne, Brodie, 1987).

Ankstesniuose šio darbo tyrimuose nustatyta, kad linalolis ir  $\alpha$ -solaninas yra atraktyvūs tiek *G. rostochiensis*, tiek *G. pallida* J2 stadijai (3.2.2.1; 3.2.3.1 pav.). Linalolio kiekio bulvių šaknų nuoplovoje chromatografinio tyrimo metu nustatyta, kad linalolio sulaikymo trukmė chromatografo kolonėlėje yra 13,2 min. (3.2.2.2 pav.), o  $\alpha$ -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 (3.3.2 pav.) yra kiti nei linalolis ar  $\alpha$ -solaninas.



**3.3.2 pav.** *n*-Heksanu ekstrahuotų bulvių šaknų į aplinką išskiriamų medžiagų chromatogramos dalis, rodyklės virš chromatogramų žymi potencialiai bioaktyvių 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 savaite. Horizontali linija prie chromatogramų rodo chromatogramų padėtį iki jų išskleidimo kompiuterinės programos (Total Crome Navigator–Clarus 500, Perkin Elmer, JAV) pagalba.

Yra žinoma, jog atraktyvių bulviniams cistiniams nematodams junginių esama daugelyje bulvių šaknų nuoplovų frakcijų (Devine, Jones, 2003), t. y. atraktyvių medžiagų turi būti gana daug. Antraip, esant vienai atraktyviai cheminei medžiagai, pakitus augalo šeimininko fiziologijai, nematodai neišgyventų (Devine, Jones, 2003). Šioms prielaidoms neprieštaruoja mūsų gauti tyrimo rezultatai: bulvių šaknų nuoplovose be linalolio ir  $\alpha$ -solanino nustatyti ne mažiau nei dar trys junginiai, kurie gali būti susiję su bulvinių cistinių nematodų priviliojimo prie šaknų.

Silikono vamzdeliai augalų šaknų į aplinką išskiriamų medžiagų mikroekstrakcijai pradėti taikyti neseniai (Weidenhamer, 2005; Barto, Cipollini, 2009; Mohny *et al.*, 2009). Pirmą kartą mūsų darbe šis metodas pritaikytas bulvių šaknų išskiriamoms cheminėms medžiagoms ekstrahuoti. Norint identifikuoti potencialiai bioaktyvių cheminių medžiagų, galinčių veikti bulvinių cistinių nematodų elgseną, cheminę sudėtį, reikalingi tolimesni tyrimai, kuriems galėtų pasitarnauti mūsų gauti rezultatai.

#### 4. 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  $\alpha$ -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  $1 \times 10^{-4}$  M ir  $1 \times 10^{-3}$  M). Pagal jautrumo slenkstį  $\alpha$ -solaninui tarprūšinių skirtumų neužregistruota, tačiau skiriasi reakcijos greitis: *G. pallida* į  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -solaninu.
6. Elgseniniu testu nustatyta, jog bulvinių cistinių nematodų *G. rostochiensis* ir *G. pallida* priviliojimą 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  $\alpha$ -solaninas, nes sulaikymo laikai dujų chromatografijos kolonėlėje yra skirtingi 28,4; 29,8 ir 31,2 min.

## 5. LITERATŪRA

- Abou-Setta** M. M., Duncan L. W., **1998**. Attraction of *Tylenchulus semipenetrans* and *Meloidogyne javanica* to salts *in vitro*. *Nematotropica* 28 (1): 49–59.
- Aburjai** T., Al-Khalil S., Abuirjeie M., **1998**. Vitamin D<sub>3</sub> and its metabolites in tomato, potato, egg plant and zucchini leaves. *Phytochemistry* 49: 2497–2499.
- Agelopoulos** G., Chamberlain K., Pickett J. A., **2000**. Factors affecting volatile emissions of intact potato plants, *Solanum tuberosum*: variability of quantities and stability of ratios. *Journal of Chemical Ecology* 26 (2): 497–511.
- Alberts** J. R., **1974**. Producing and interpreting experimental olfactory deficits. *Physiology & Behavior* 12: 657–670.
- Aumann** J., Hashem M., **1993**. Studies on substances with sex pheromone activity produced by *Heterodera schachtii* females. *Fundamental and Applied Nematology* 16 (1): 43–46.
- Bais** H. P., Weir T. L., Perry L. G., Gilroy S., Vivanco J. M., **2006**. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57: 233–266.
- 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., Hirschmann H., **1973**. Fine structure of the cephalic sense organs in *Meloidogyne incognita* males. *Journal of Nematology* 5: 285–302.
- Baldwin** J. G., Hirschmann H., **1975**. Fine structure of cephalic sense organs in *Heterodera glycines* males. *Journal of Nematology* 7: 40–53.
- Baldwin** J. G., Mundo-Ocampo M., **1991**. Heteroderinae, cyst- and non-cyst-forming nematodes. In: Nicke W. R. (Ed.), *Manual of Agricultural Nematology*. Marcel Dekker, New York, US: 275–362.
- Balhadere** P., Evans A. A. F., **1994**. Characterization of attractiveness of excised root tips of resistant and susceptible plants for *Meloidogyne naasi*. *Fundamental and Applied Nematology* 17 (6): 527–536.
- Barto** K., Cipollini D., **2009**. Half-lives and field soil concentrations of *Alliaria petiolata* secondary metabolites. *Chemosphere* 76: 71–75.
- Baumert** A., Mock H. P., Schmidt J., Herbers K., Sonnewald U., Strack D., **2001**. Patterns of phenylpropanoids in non-inoculated and potato virus Y-inoculated leaves of transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase. *Phytochemistry* 56: 535–541.
- 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.



- Bejarano L.**, Mignolet E., Devaux A., Espinola N., Carrasco E., Larondelle Y., **2000**. Glycoalkaloids in potato tubers: the effect of variety and drought stress on the  $\alpha$ -solanine and  $\alpha$ -chaconine contents of potatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80 (14): 2096–2100.
- Behm J. E.**, Tylka G. L., Niblack T. L., Wiebold W. J., Donald P. A., **1995**. Effects of zinc fertilization of corn on hatching of *Heterodera glycines* in soil. *Journal of Nematology* 27 (2): 164–171.
- Berdis E.**, Peterson B. V., Yourio N. C., Batten J., Wheeler R. M., **1993**. *Development of a sparging technique for volatile emissions from potato (Solanum tuberosum)*. NASA, Technical Memorandum 109199.
- Berge J. B.**, Cuany A., **1972**. Activite de l'aldicarbe sur les oeufs de *Meloidogyne arenaria*. *Académie d'Agriculture de France*: 371–376.
- Bertin C.**, Yang X., Weston L. A., **2003**. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil* 256: 67–83.
- Bird A. F.**, **1959**. The attractiveness of roots to the plant parasitic nematodes *Meloidogyne javanica* and *M. hapla*. *Nematologica* 4: 322–335.
- Bird A. F.**, **1960**. Additional notes on the attractiveness of roots to plant parasitic nematodes. *Nematologica* 5: 217.
- Byrne J.**, Walsh D., Devine K., Jones P., **1996**. Investigations into the cause of the delayed hatch of *Globodera pallida* compared with *G. rostochiensis*. In: *Proceedings of The Third International Nematology Congress*. Guadeloupe: 161.
- Byrne J. T.**, Twomey U., Maher N., Devine K., Jones P. W., **1998**. Detection of hatching inhibitors and hatching factor stimulants for golden potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, in potato root leachate. *Annals of Applied Biology* 132: 463–472.
- Byrne J. T.**, Maher N. J., Jones P. W., **2001**. Comparative responses of *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* to hatching chemicals. *Journal of Nematology* 33 (4): 195–202.
- Boyd A. E. W.**, **1942**. Stimulation of larval emergence in *Heterodera schachtii* Schmidt by certain concentrations of silver compounds. *Annals of Applied Biology* 30 (2): 161–163.
- Brindle Ph. A.**, Kuhn P. J., Threlfall D. R., **1983**. Accumulation of phytoalexins in potato–cell suspension cultures. *Phytochemistry* 22 (12): 2719–2721.
- 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.
- Brown C. R.**, **2005**. Antioxidants in potato. *American Journal of Potato Research* 82: 163–172.
- Brzeski M. W.**, **1998**. *Nematodes of Tylenchina in Poland and Temperate Europe*. Muzeum i Instytut Zoologii Polska Akademia Nauk, Warsaw, PL: 396.

- Calam** C. T., Todd A. R., Waring W. S., **1949**. The potato eelworm hatching factor. II. Purification of the factor by alkaloid salt fractionation. Anhydrotetrone acid as an artificial hatching agent. *Biochemistry Journal* 45: 520–524.
- Canto Saenz** M., de Scurrah M. M., **1977**. Races of the potato cyst nematode in the Andean region and a new system of classification. *Nematologica* 23: 340–349.
- Carta** L. K., Handoo Z. A., Powers T. O., Miller S. A., Perrez-Zubiri R., Ramirez-Suarez A., **2005**. Guidelines for isolation and identification of regulated nematodes of potato (*Solanum tuberosum* L.) in North America. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23: 211–222.
- Castillo** P., Vovlas N., **2002**. Factors affecting egg hatch of *Heterodera mediterranea* and differential responses of olive cultivars to infestation. *Journal of Nematology* 34 (2): 146–150.
- Castro** C. E., Belser N. O., McKinney H. E., Thomason I. J., **1989**. Quantitative bioassay for chemotaxis with plant parasitic nematodes. Attractant and repellent fractions for *Meloidogyne incognita* from cucumber roots. *Journal of Chemical Ecology* 15 (4): 1297–1309.
- 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.
- CD, 2007**. Council Directive 2007/33/EC of 11 June 2007 on the control of potato cyst nematodes and repealing Directive 69/465/EEC.
- Charlson** D. V., Tylka G. L., **2003**. *Heterodera glycines* cyst components and surface disinfectants affect *H. glycines* hatching. *Journal of Nematology* 35 (4): 458–464.
- Chatterjee** A., Sukul N. C., Laskar S., Ghoshmajumdar S., **1982**. Nematicidal principles from two species of Lamiaceae. *Journal of Nematology* 1 (1): 118–120.
- Chen** S., Dickson D. W., Hewlett T. E., **1997**. Tannic acid effects on hatching of *Heterodera glycines* in vitro. *Journal of Nematology* 29 (4): 742–745.
- Christie** J. R., **1959**. *Plant nematodes, their bionomics and control*. Agricultural experiment stations, University of Florida, Gainesville, FL: 167.
- Clarke** A. J., Shepherd A. M., **1965**. Zinc and other metallic ions as hatching agents for the beet cyst nematode, *Heterodera schachtii* Schm. *Nature* 208: 502.
- Clarke** A. J., Shepherd A. M., **1966a**. The action of nabam, metam-sodium and other sulphur compounds on *Heterodera schachtii* cysts. *Annals of Applied Biology* 57 (2): 241–255.
- Clarke** A. J., Shepherd A. M., **1966b**. Inorganic ions and the hatching of *Heterodera* spp. *Annals of Applied Biology* 58 (3): 497–508.
- Clarke** A. J., Shepherd A. M., **1967**. Flavianic acid as a hatching agent for *Heterodera cruciferae* Franklin and other cyst nematodes. *Nature* 213: 419–420.

- Clarke** A. J., Shepherd A. M., **1968**. Hatching agents for the potato cyst–nematode *Heterodera rostochiensis* Woll. *Annals of Applied Biology* 61 (1): 139–149.
- Clarke** A. J., **1970**. Hatching factors and sex attractants of cyst nematodes. In: *Report of Rothamsted Experimental station for 1969*, Harpenden: 179.
- Clarke** A. J., Perry R. N., **1977**. Hatching of cyst–nematodes. *Nematologica* 23 (3): 350–368.
- Clarke** A. J., Hennessy J., **1984**. Movement of *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) juveniles stimulated by potato root exudates. *Nematologica* 30 (2): 206–212.
- Croll** N. A., Viglierchio D. R., **1969**. Reversible inhibition of chemosensitivity in a phytoparasitic nematode. *Journal of Parasitology* 55: 895–896.
- Dao** L., Friedman M., **1992**. Chlorogenic acid content of fresh and processed potatoes determined by ultraviolet spectrophotometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 2152–2156.
- Davis** E. L., Kaplan D. T., Permar T. A., Dickson D. W., Mitchell D. J., **1988**. Characterization of carbohydrates on the surface of second–stage juveniles of *Meloidogyne* spp. *Journal of Nematology* 20: 609–619.
- de Bono** M., **2003**. Molecular approaches to aggregation behavior and social attachment. *Journal of Neurobiology* 54 (1): 78–92.
- de Scurrah** M. M., **1981**. *Evaluating resistance to potato cyst nematodes*. Technical Information Bulletin 10, International Potato Centre, Lima.
- Dekker** H., **1969**. *Phytonematologie (Biologie und Bekämpfung Pflanzenparasitärer Nematoden)*. Veb Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin.
- Den Nijs** L. J. M. F., Lock C. A. M., **1992**. Differential hatching of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* in root diffusate and water of differing ionic composition. *European Journal of Plant Pathology* 98 (2): 117–128.
- Devine** K. J., Byrne J., Maher N., Jones P. W., **1996**. Resolution of natural hatching factors for the golden potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*. *Annals of Applied Biology* 129 (2): 323–334.
- Devine** K. J., Dunne C., O’Gara F., Jones P. W., **1999**. The influence of in-egg mortality and spontaneous hatching on the decline of *Globodera pallida* during crop rotation in the absence of the host crop in the field. *Nematology* 1: 637–645.
- Devine** K. J., Jones P. W., **2000**. Purification and partial characterization of hatching factors for the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* from potato root leachate. *Nematology* 2 (2): 231–236.
- 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.
- Di Vito M., Sasanelli N., 1990.** The effect of natural and artificial hatching agents on the emergence of juveniles of *Heterodera fici*. *Nematologia Mediterranea* 18: 55–57.
- 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.
- Dräger B., van Almsick A., Mrachatz G., 1995.** Distribution of calyptegines in several Solanaceae. *Planta Medica* 61: 577–579.
- Dusenbery D. B., 1983.** Chemotactic behavior of nematodes. *Journal of Nematology* 15 (2): 168–173.
- Edmunds J. E., Mai W. F., 1967.** Effect of *Fusarium oxysporum* on movement of *Pratylenchus penetrans* toward alpha-alpha roots. *Phytopathology* 57: 468–471.
- Eich E., 2008.** *Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary metabolites: Biosynthesis, chemotaxonomy, biological and economic significance (a handbook)*. Springer-Verlag, Berlin: 399–447.
- Endo B. Y., 1980.** Ultrastructure of the anterior neurosensory organs of the larvae of the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. *Journal of Ultrastructure Research* 72: 349–66.
- Evans K., 1969.** Apparatus for measuring nematode movement. *Nematologica* 15: 433–435.
- Evans K., 1970.** Longevity of males and fertilization of females of *Heterodera rostochiensis*. *Nematologica* 16: 396–374.
- Evans S. G., Wright D. J., 1982.** Effects of the nematicide oxamyl on life cycle stages of *Globodera rostochiensis*. *Annals of Applied Biology* 100 (3): 511–519.
- 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.
- Ferris J. M., 1956.** Effect of soil temperature on the life cycle of the golden nematode in host and non-host species. *Phytopathology* 47: 221–230.
- Fenwick D. W., 1949.** Investigations on the emergence of larvae from cysts of the potato-root eelworm *Heterodera rostochiensis*. I. Technique and variability. *Journal of Helminthology* 23: 157–170.
- Fenwick D. W., 1950.** Investigations on the emergence of juveniles from the cysts of the potato-root eelworm *Heterodera rostochiensis*. (4) Physical conditions and their influence on larval emergence in the laboratory. *Journal of Helminthology* 25: 37–48.

- Fioretti L., Porter A., Haydock P. J., Curtis R., 2002.** Monoclonal antibodies reactive with secreted–excreted products from the amphids and the cuticle surface of *Globodera pallida* affect nematode movement and delay invasion of potato roots. *International Journal of Parasitology* 32 (14): 1709–1718.
- 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.
- Franco J., 1979.** Effect on temperature on hatching and multiplication of potato–cyst nematodes. *Nematologica* 25: 237–244.
- Friedman M., Dao L., 1992.** Distribution of glycoalkaloids in potato plants and commercial potato products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 40: 419–423.
- Friedman M., Mc Donald G. M., 1997.** Potato glycoalkaloids: chemistry analysis, safety and plant physiology. *Critical Reviews in Plant Sciences* 16 (1): 55–132.
- Friedman M., Roitman J. N., Kozukue N., 2003.** Glycoalkaloid and calystegine contents of eight potato cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2964–2973.
- Friedman M., 2006.** Potato glycoalkaloids and metabolites: Roles in the plant and in the diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 8655–8681.
- Fukuzawa A., Matsue H., Ikura M., Masamune T., 1985.** Glycinoeclepins B and C, nortriterpenes related to Glycinoeclepin A. *Tetrahedron Letters* 26: 5539–5542.
- 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.
- Gaur H. S., Perry R. N., Beane J., 1992.** Hatching behavior of six successive generations of the pigeon–pea cyst nematode, *Heterodera cajani*, in relation to growth and senescence of cowpea, *Vigna unguiculata*. *Nematologica* 38 (2): 190–202.
- Gaur H. S., Beane J., Perry R. N., 2000.** The influence of root diffusate, host age and water regimes on hatching of the root–knot nematode, *Meloidogyne tritricoryzae*. *Nematology* 2 (2): 191–199.
- Godfrey J. C., Slater M. J., 1994.** *Liquid-liquid extraction equipment*. John Wiley and Son, Chichester: 737.
- Greco N., Di Vito M., Nombela G., 1992.** The emergence of juveniles of *Heterodera ciceri*. *Nematologica* 38 (1–4): 514–519.
- Green C. D., Plumb N. C., 1970.** The interrelationships of some *Heterodera* spp. indicated by the specificity of the male attractants emitted by their females. *Nematologica* 16 (1): 39–46.

- Green C. D., 1980.** Nematode sex attractants. *Helminthological Abstracts Series A* 49: 81–93.
- Greet D. N., Green C. D., Poulton M. E., 1968.** Extraction, standardization and assessment of the volatility of the sex attractants of *Heterodera rostochiensis* Woll. and *H. schachtii* Schm. *Annals of Applied Biology* 31: 511–519.
- Griffin D. M., Hale M. G., Shay F., 1976.** Nature and quantity of sloughed organic matter produced by roots of axenic peanut plants. *Soil Biology and Biochemistry* 8: 29–32.
- Groh C., Brockmann R. A., Altwein M., Tautz J., 2002.** Selective blocking of contact chemosensilla in *Apis mellifera*. *Apidologie* 33: 33–40.
- Hamlen R. A., Bloom J. R., Lukezic F. L., 1973.** Hatching of *Meloidogyne incognita* eggs in the neutral carbohydrate fraction of root exudates of gnotobiotically grown alfalfa. *Journal of Nematology* 5 (2): 142–146.
- Harborne J. B., 1962.** The flavonol glycosides of wild and cultivated potatoes. *Journal of Biochemistry* 84: 100–106.
- Harborne J. B., 1964.** The structure of acylated anthocyanins. *Phytochemistry* 3: 151–160.
- Harju V., 2003.** *Beet necrotic yellow vein virus. Protocol for the diagnosis of quarantine organism.* Central Science Laboratory, Sand Hutton, UK.
- Hartwell W. V., Dahlstorm R. V., Neal A. L., 1959.** Crystallization of a natural hatching factor of larvae of the golden nematode. *Phytopathology* 49: 540–541.
- Hashmi S., Krusberg L. R., 1995.** Factors influencing emergence of juveniles from cysts of *Heterodera zaeae*. *Journal of Nematology* 27 (3): 362–369.
- Hawes M. C., Brigham L. A., 1992.** Impact of root border cells on microbial populations in the rhizosphere. *Advances in Plant Pathology* 8: 119–148.
- 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.
- Heftmann E., 1983.** Biogenesis of steroids in Solanaceae. *Phytochemistry* 22: 1843–1860.
- Hegnauer R., 1990.** *Chemotaxonomie der Pflanzen 9. Solanaceae.* Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland: 567–602.
- Hengstebeck M., Gleissl W., 1988.** Investigations on the influence of the cereals herbicides aretit, bottrol DP and U 46 D FL on the sugar beet eelworm *Heterodera schachtii* Schm. *Zeitschrift fuer Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*: 287–294.
- Hewlett T. E., Hewlett E. M., Dickson D. W., 1997.** Response of *Meloidogyne* spp., *Heterodera glycines* and *Rhadopholus similis* to tannic acid. *Journal of Nematology* 29 (4): 737–741.

- Hirsch** A. M., Bauer W. D., Bird D. M., Cullimore J., Tyler B., Yoder J. I., **2003**. Molecular signals and receptors: controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. *Ecology* 84 (4): 858–868.
- Hlywka** J. J., Stephenson G. R., Sears M. K., Yada R. Y., **1994**. Effects of insect damage on glycoalkaloid content in potatoes (*Solanum tuberosum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 2545–2550.
- 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.
- Hough** A., Thomason I. J., **1975**. Effects of Aldicarb on the behavior of *Heterodera schachtii* and *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology* 7 (3): 221–229.
- Huang** S. P., Van Gundy S. D., **1978**. Effects of aldicarb and its sulfoxide and sulfone on the biology of *Tylenchulus semipenetrans*. *Journal of Nematology* 10 (1): 100–106.
- Huettel** R. N., **1986**. Chemical communicators in nematodes. *Journal of Nematology* 18 (1): 3–8.
- Huettel** R. N., Jaffe H., DeMilo A. B., **1988**. *In vitro* screening of analogs of a sex attractant of soybean cyst nematode. *Journal of Nematology* 20: 641 (Abstr.).
- Ibrahim** I. K. A., Hollis J. P., **1967**. Nematode orientation mechanisms. I A. method for determination. *Phytopathology* 57: 816 (Abstr.).
- 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.
- Ishikawa** M., Shuto Y., Watanabe H., **1986**.  $\beta$ -Myrcene a potent attractant component of pine wood for the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Agricultural Biology and Chemistry* 50 (7): 1863–1866.
- Yeates** G. W., **1987**. How plants affect nematodes. *Advances in Ecological Research* 17: 61–113.
- Jaffe** H., Huettel R. N., DeMilo A. B., Hayes D. K., Rebois R. V., **1989**. Isolation and identification of a compound from soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*, with sex pheromone activity. *Journal of Chemical Ecology* 15 (7): 2031–2043.
- Jansen** P. H., **2008**. *Analysis and fate of toxic glycoalkaloids from Solanum tuberosum in the terrestrial environment*. PhD Thesis, University of Copenhagen, Denmark: 7–9.
- Jansen** P. H., Strobel B. W., Hansen H. Ch. B., Jacobsen O. S., **2009a**. Fate of toxic potato glycoalkaloids in potato field. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (7): 2862–2867.

- Jansen P. H., Jacobsen O. S., Henriksen T., Strobel B. W., Hansen H. Ch. B., 2009b.** *Degradation of the potato glycoalkaloids  $\alpha$ -solanine and  $\alpha$ -chaconine in groundwater.* *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 82: 668–672.
- Janzen G. J., 1968.** Flavianic acid as a hatching and stimulating agent for *Heterodera rostochiensis* cysts. *Nematologica* 14 (4): 601–602.
- Johnson A. W., 1952.** The eelworm problem: biological aspects. The potato eelworm hatching factor. *Chemistry and Industry* 40: 998–999.
- Johnson R. N., Viglierchio D. R., 1961.** The accumulation of plant parasitic nematode larvae around carbon dioxide and oxygen. *Proceeding of the Helminthology Society of Washington* 28: 171–174.
- Jones F. G. W., 1960.** Some observations and reflections on host finding by plant nematodes. *Mededel Landbouwhogeschool Opzoekingssta* 25: 1009–1024.
- Jones J. T., Perry, R. N., Johnston M. R. L., Burows P. R., 1992.** *Investigations of the secretions of nematode sense organs using molecular biology techniques.* European Society of Nematologists 21<sup>st</sup> International Symposium, Albufeira: 33 (Abstr.).
- 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.
- Jones P. W., Tylka G. L., Perry R. N., 1998.** Hatching. In: Perry R. N., Wright D. J. (Eds.), *The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes.* CABI, Wallingford, UK: 81–212.
- Jones, J. 2002.** Nematode sense organs. In: Lee D. L. (Ed.), *The Biology of Nematodes.* Taylor and Francis, London, UK: 353–368.
- Jonz M. G., Riga E., Mercier A. J., Potter J. W., 2001.** Partial isolation of a water soluble pheromone from the sugar beet cyst nematode, *Heterodera schachtii*, using a novel bioassay. *Nematology* 3 (1): 55–64.
- Kaneko K., Tanaka M. W., Mitsuhashi H., 1977.** Dormantiol, a possible precursor in solanidine biosynthesis from budding *Veratrum grandiflorum*. *Phytochemistry* 16: 1247–1251.
- Kaul R., 1962.** Untersuchungen über einen aus Zysten des Kartoffelnematoden (*Heterodera rostochiensis* Woll.) isolierten phenolischen Komplex. *Nematologica* 8: 288–292.
- Kavvadias D., Abou-Mandour A. A., Czygan F. C., Beckmann H., Sand P., Schreier P., 2000.** Identification of benzodiazepines in *Artemisia dracuncululus* and *Solanum tuberosum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 269: 290–295.
- Keiner R., Nakajami K., Hashimoto T, Dräger B., 2000.** Accumulation and biosynthesis of calystegines in potato. *Journal of Applied Botany–Angewandte Botanik*: 74: 122–125.



- Keller H.**, Hohlfeld H., Wray V., Hahlbrock K., Scheel D., Strack D., **1996**. Changes in accumulation of soluble and cell wall-bound phenolics in elicitor-treated cell suspension cultures and fungus-infected leaves of *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry* 42: 389–396.
- Khan F. A.**, **1985**. Hatching response of *Rotylenchulus reniformis* to root leachates of certain hosts and non-hosts. *Revue de Nématologie* 8: 319–393.
- Klimakova J.**, Jefremenko V., Žeimantienė E., **1983**. *Bulvinė nematoda ir kovos su ja priemonės Lietuvos TSR*. Lietuvos TSR Žemės ūkio ministerija, Vilnius: 3.
- Klingler J.**, **1970**. The reaction of *Aphelenchoides fragariae* to slit-like micro-openings and to stomatal diffusion gases. *Nematologica* 16 (3): 417–422.
- Klingler J.**, **1972**. The effect of single and combined heat and CO<sub>2</sub> stimuli at different ambient temperatures on the behavior of two plant parasitic nematodes. *Journal of Nematology* 4 (2): 95–100.
- Klink J. W.**, Dropkin V. H., Mitchell J. E., **1970**. Studies on host-finding mechanisms of *Neotylenchus linfordi*. *Journal of Nematology* 2 (2): 106–117.
- Knudsen J. T.**, Tollsens 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*)- $\beta$ -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.**, Lee S. M., Moon Y. S., Lee S. G., Ahn Y.-J., **2006**. Nematicidal activity of plant essential oils against *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae). *Journal of Asia-Pacific Entomology* 9: 173–178.
- Kong J.-OK.**, Park II-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.
- Kort J.**, Ross H., Rumpfenhorst H. J., Stone A. R., **1977**. An international scheme for the identification of pathotypes of potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Nematologica* 23: 333–339.
- Lambert K.**, Bekal S., **2002**. *Introduction to plant-parasitic nematodes*. The Plant Health Instructor, DOI: 10.1094/PHI-I-2002-1218-01.
- LaMondia J. A.**, **1995**. Hatch and reproduction of *Globodera tabacum tabacum* in response to tobacco, tomato, or black nightshade. *Journal of Nematology* 27 (3): 328–386.
- 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.

- Leete E., 1983.** Biosynthesis and metabolism of the tobacco alkaloids. In: Pelleties S. W. (Ed.), *Alkaloids – chemical and biological perspectives* 1. Wiley, New York: 85–152.
- Lehman P. S., Huisling D., Barker K. R., 1971.** The influence of races of *Heterodera glycines* on nodulation and nitrogen-fixing capacity of soybean. *Phytopathology* 61: 1239–1244.
- Lilley C. J., Atkinson H. J., Urwin P. E., 2005.** Molecular aspects of cyst nematodes. *Molecular Plant Pathology* 6 (6): 577–588.
- Lukošiūtė I., 2005.** Bulvės. *Rinkotyra Žemės ūkio ir maisto produktai* 4 (30): 20.
- Liu B., Hibbart J. K., Urwin P. E., Atkinson H. J., 2005.** The production of synthetic chemodisruptive peptides in planta disrupts the establishment of cyst nematodes. *Plant Biotechnology Journal* 3: 487–496.
- Lung G., 1993.** The role of phytosiderophores as an attractive substance of root exudates from several cereals for second stages juveniles *Heterodera avenae*. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent* 58 (2b): 729–735.
- Maas P. W. Th., Heijbroek W., 1982.** Biology and pathogenicity of the yellow beet cyst nematode, a host race of *Heterodera trifolii* on sugar beet in the Netherlands. *Nematologica* 28: 77–93.
- Maher N. J., 2001.** *The hatching mechanisms and hatching behavior of Globodera rostochiensis and G. pallida*. Ph.D. Thesis, The National University of Ireland, Cork, Republic of Ireland.
- 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.
- Marban-Mendoza N., Jeyaprakash A., Jansson H.-B., Damon H. A., Zuckerman B. N., 1987.** Control of root-knot nematode on tomato by lectins. *Journal of Nematology* 19: 331–335.
- Marrion D. H., Russell P. B., Todd A. R., Waring R. S., 1949.** The potato eelworm hatching factor. 3. Concentration of the factor chromatography. Observations on the nature of ecleptic acid. *Biochemical Journal* 45: 524–528.
- Marshall J. W., 1993.** Detecting the presence and distribution of *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* mixed populations in New Zealand. *Journal of Crop and Horticultural Science* 21: 219–223.

- Martel** J. W., Alford A. R., Dickens J. C., **2005**. Laboratory and greenhouse evaluation of synthetic host volatile attractant of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Agricultural and Forest Entomology* 7: 71–78.
- Masamune** T., Anetai M., Takasugi M., Katsui N., **1982**. Isolation of a natural hatching stimulus, glycinoeclepin A, for the soybean cyst nematode. *Nature* 297: 495–496.
- Masler** E. P., Donald P. A., Sardaneli S., **2008**. Stability of *Heterodera glycines* (Tylenchida: Heteroderidae) juveniles hatching from eggs obtained from different sources of soybean, *Glycine max*. *Journal of Nematology*: 10 (2): 271–278.
- Mastauskis** S., **1955**. *Lietuvos SSR fitonematodai*. Autoreferatas daktaro disertacijai, Aukštojo mokslo ministerija, Kaunas Lietuvos SSR: 10–11.
- McSorley** R., **2003**. Adaptations of nematodes to environmental extremes. *Florida entomologist* 86 (2): 138–142.
- Miyazaki** M., Oda K., Yamaguchi A., **1977**. Behavior of *Bursaphelenchus lignicolus* to unsaturated fatty acids. *Journal of the Japan Wood Research Society* 23: 255–261.
- Minnis** S. T., Haydock P. P. J., Ibrahim S. K., Grove I. G., Evans K., Russell M. D., **2002**. Potato cyst nematodes in England and Wales; occurrence and distribution. *Annals of Applied Biology* 140: 187–195.
- Mohl** J., **1985**. *Insektenpheromone: Biologie, Chemie und Anwendungs-Möglichkeiten*. Beiträge zur Entomol. Band 35, Heft 1, Akademie-Verlag, Berlin: 154.
- Mohney** B. K., Matz T., LaMoreaux J., Wilcox D. S., Gimsing A. L., Mayer Ph., Weidenhamer J. D., **2009**. *In situ* silicone tube microextraction: a new method for undisturbed sampling of root-exuded thiophenes from Marigold (*Tagetes erecta* L.) in soil. *Journal of Chemical Ecology* 35: 1279–1287.
- Moriarty** F., **1963**. The hatch of beet eelworm (*Heterodera schachtii* Schm.) larvae in rivanol, and its use for the estimation of field populations. *Annals of Applied Biology* 52 (3): 423–430.
- Mulder** J. G., Diepenhorst P., Plieger P., Brugenmann-Rotgans I. E. M., **1992**. *Hatching agent for the potato cyst nematode*. Patent application No PCT/NL92/00126.
- NIVAA**, **1997**. *Netherlands catalogue of potato varieties*. The Hague: 8–21.
- Negrel** J., Pollet B., Lapierre C., **1996**. Ether-linked ferulic acid amides in natural and wound periderms of potato tubers. *Phytochemistry* 43: 1195–1199.
- O'Brien** D. G., Gemmell A. R., Prentice I. W., Wylie S. M., **1939**. Field experiments in Ayrshire on control of *Heterodera schachtii* by the use of chloroacetates. *Journal of Helminthology* 17: 41–50.

- O'Halloran D. M., Fitzpatrick D. A., Burnell A. M., 2006.** The chemosensory system of *Caenorhabditis elegans* and other nematodes. In: Dickie M., Takken W. (Eds.), *Chemical ecology: from gene to system*. Springer, The Netherlands: 71–88.
- Okada T., 1972a.** Hatching inhibitory factor in the cyst contents of the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines* Ichinohe (Tylenchida: Heteroderidae). *Applied Entomology and Zoology* 7: 99–102.
- Okada T., 1972b.** Hatch stimulant in the egg of the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines* Ichinohe (Tylenchida: Heteroderidae). *Applied Entomology and Zoology* 7: 234–237.
- Oostenbrink M., 1950.** *Het aardappelaaltje (Heterodera rostochiensis Wollenweber), een gevaarlijke parasiet voor de eenzijdige aardappelcultuur*. Verslagen en Mededelingen van de Plantenziektenkundige Dienst te Wageningen 115: 230.
- Papademetriou M. K., Bone L. W., 1983.** Chemotaxis of larval soybean cyst nematode, *Heterodera glycines* Race 3, to root leachates and ions. *Journal of Chemical Ecology* 9 (3): 387–396.
- Papadopoulou J., Traintaphyllou A. C., 1982.** Sex differentiation in *Meloidogyne incognita* and anatomical evidence of sex reversal. *Journal of Nematology* 14: 549–566.
- Papathanasiou F., Mitchell S. H., Watson S., Harvey B. M. R., 1999.** Effect of environmental stress during tuber development on accumulation of glycoalkaloids in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79:1183–1189.
- Pawliszyn J., 1997.** *Solid phase microextraction. Theory and Practice*. Wiley-VCH., New York: 97–139.
- Perkins L. A., Hedgecock E. M., Thomson J. N., Culotti J. G., 1986.** Mutant sensory cilia in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 117: 456–487.
- Perry R. N., Beane J., 1989.** Effects of certain herbicides on the *in vitro* hatch of *Globodera rostochiensis* and *Heterodera schachtii*. *Revue de Nématologie* 12: 191–196.
- Perry R. N., 1994.** Studies on nematode sensory perception as a basis for novel control strategies. *Fundamental and Applied Nematology* 17: 199–202.
- Perry R. N., 1996.** Chemoreception in plant parasitic nematodes. *Annual Review Phytopathology* 34: 181–99.
- Perry R. N., 1998.** The physiology and sensory perception of potato cyst nematodes *Globodera* species. In: Marks R. J., Brodie B. B., (Eds.), *Potato cyst nematodes, biology, distribution and control*. Wallingford, UK, CABI: 27–50.
- Perry R. N., 2001.** Analysis of sensory responses of plant parasitic nematodes using electrophysiology. *International Journal of Parasitology* 31: 909–918.

- Perry R. N., 2002.** Hatching. In: Lee D. (Ed.), *The Biology of Nematodes*. Taylor Francis, New York: 147–169.
- Pline M., Dusenbery D. B., 1987.** Responses of the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* to carbon dioxide determined by video camera-computer tracking. *Journal of Chemical Ecology* 13 (4): 873–888.
- Prelog V., Jeger O., 1960.** Steroidal alkaloids: The *Solanum* group. In: Manske R. H. F. (Ed.), *The alkaloids – chemistry and physiology* (7). Academic Press, New York: 343–361.
- Pridannikov M. V., Petelina G. G., Palchuk M. V., Masle E. P., Dzhavakhiya V. G., 2007.** Influence of components of *Globodera rostochiensis* cysts on the *in vitro* hatch of second-stage juveniles. *Nematology* 9 (6): 837–844.
- Prot J.-C., 1979.** Horizontal migrations of second-stage juveniles of *Meloidogyne javanica* in sand in concentration gradients of salts, in a moisture gradient. *Revue de Nématologie* 2 (1): 17–21.
- 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.
- Rademacher B., Schmidt O., 1933.** Die bisherigen Erfahrungen in der Bekämpfung des Rübennematoden (*Heterodera schachtii* Schm.) auf dem Wege der Reizbeeinflussung. *Wissenschaftliches Archiv für Landwirtschaft Abteilung Pflanzenbau* 10: 237.
- Rao Y. S., Jayaprahash A., 1978.** Role of thiamine hydrochloride as a hatching factor in a larval emergence from cysts of *Heterodera oryzae* (*Nematoda: Heteroderidae*) on rice. *Current Science* 47: 635–636.
- 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.
- Rawsthorne D., Brodie B., 1987.** Movement of potato root diffusate through soil. *Journal of Nematology* 19 (1): 119–122.
- Reversat G., 1981.** Potassium permanganate as a hatching agent for *Heterodera sacchari*. *Revue de Nématologie* 4 (1): 174–176.
- Rice S., L., Stone A., R., Leadbeater B. C., 1987.** Changes in cell structure in roots of resistant potato parasitized by potato cyst nematodes (2). Potatoes with resistance derived from *Solanum vernei*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 31: 1–14.
- Riddle D. L., Bird A. F., 1985.** Responses of the plant parasitic nematodes *Rotylenchulus reniformis*, *Anguina agrostis* and *Meloidogyne javanica* to chemical attractants. *Journal of Nematology* 91: 185–195.

- Riga E., 1992.** *Multifaceted approach for differentiating isolates of Bursaphelenchus xylophilus and B. mucronatus (Nematoda) parasites of pine trees.* PhD Thesis, Simon Fraser University, Canada.
- Riga E., Perry R. N., Barrett J., Johnston M. R. L., 1996.** Electrophysiological responses of the males of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* to their sex pheromones. *Parasitology* 112: 239–246.
- Riga E., Perry R. N., Barrett J., Johnston M. R. L., 1997.** Electrophysiological responses of males of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* to some chemicals. *Journal of Chemical Ecology* 23 (2): 417–428.
- Ripperger R., Schreiber K., 1981.** *Solanum* steroidal alkaloids. In: Manske R. H. F., Rodrigo R. G. A. (Eds.), *The alkaloids – chemistry and physiology* (19). Academic Press, New York: 81–191.
- Robinson A. F., Orr C. C., Abernathy J., R., 1979.** Behavioral responses of *Nothanguina phyllobia* to selected plant species. *Journal of Nematology* 11 (1): 73–77.
- Robinson M. P., Atkinson H. J., Perry R. N., 1987a.** 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.
- Robinson M. P., Atkinson H. J., Perry R. N., 1987b.** The influence of temperature on hatching, activity and lipid utilization of second stage juveniles of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Revue de Nématologie* 10: 349–354.
- Robinson A. F., Saldana G., 1989.** Characterization and partial purification of attractants for nematode *Orrina phyllobia* from foliage of *Solanum elaeagnifolium*. *Journal of Chemical Ecology* 15 (2): 481–495.
- Robinson A. F., 1995.** Optimal release rates for attracting *Meloidogyne incognita*, *Rotylenchulus reniformis*, and other nematodes to carbon dioxide in sand. *Journal of Nematology* 27: 42–50.
- Robinson A. F., 2002.** Host finding by plant-parasitic nematodes. In: Lewis E. E., Campbell J. F., Sukhdeo M. V. K. (Eds.), *The Behavioral Ecology of Parasites*. New York, CABI: 89–110.
- Rode H., 1965.** Über einige Methoden zur Verhaltensforschung bei Nematoden. *Pedobiologia* 5: 1–16.
- Rolfe R. N., 1999.** *Electrophysiological analysis of nematode responses.* PhD thesis, University of Wales, Aberystwyth, UK.

- 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.
- Rouessac** F., Rouessac A., 2007. *Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques* (2). John Wiley and Sons, England, UK: 23–37.
- Rühm** R., Dietsche E., Harloff H. J., Lieb M., Franke S., Aumann J., **2003**. Characterization and partial purification of a white mustard kairomone that attracts the beet cyst nematode *Heterodera schachtii*. *Nematology* 5: 17–22.
- Ruther** J., Meiners T., Steidle J. L. M., **2002**. Rich phenomena – lacking terms. A classification of kairomones. *Chemoecology* 12(4): 161–167.
- 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.
- Sasanelli** N., D'Addabbo T., **1992**. The hatching response of *Heterodera fici* to different concentrations of sodium metavanadate solutions. *Nematologia Mediterranea* 20: 3–4.
- Schenk** H., Driessen R. A. J., de Gelde R., Goubitz K., Nieboer H., Bruggemann-Rotgans I. E. M., Diepenhorst P., **1999**. Elucidation of the structure of Solanoeclipin A, a natural hatching factor of potato and tomato cyst nematodes by single-crystal X-ray diffraction. *Croatica Chemica Acta* 72: 593–606.
- Shepherd** A. M., Cox P. M., **1967**. Observations of periodicity of hatching of eggs of the potato cyst nematode, *Heterodera rostochiensis* Woll. *Annals of Applied Biology* 60(1): 143–150.
- Siegmund** B., Leitner E., Pfannhauser W., **1999**. Determination of nicotine content of various edible nightshades (Solanaceae) and their products and estimation of the associated dietary nicotine intake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 3113–3120.
- Sikora** E. J., Noel G. R., **1996**. Hatch and emergence of *Heterodera glycines* in root leachate from resistant and susceptible soybean cultivars. *Journal of Nematology* 28: 501–509.
- Smith** I. M., McNamara D. G., Scott P. R., Holderness M., **1997**. *Quarantine pests for Europe, 2<sup>nd</sup> Edition*. EPPO/CABI, Wallingford, UK: 1425.
- Southey** J. F., **1986**. *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Reference Book, London: 402
- Spears** J. F., **1968**. *The golden nematode handbook, survey, laboratory, control and quarantine procedures*. U. S. Department of Agriculture (Handbook): 353.
- Spence** K. O., Lewis E. E., Perry R. N., **2008**. Host-finding and invasion by entomopathogenic and plant-parasitic nematodes: evaluating the ability of laboratory bioassays to predict field results. *Journal of Nematology* 40 (2): 93–98.

- Spiegel** Y., Burrows P. M., Bar-Eyal M., **2003**. A chemo-attractant in onion root exudates recognized by *Ditylenchus dipsaci* in laboratory bioassay. *Phytopathology* 93: 127–132.
- Stamps** W. T., Linit M. J., **1998**. Chemotactic response of propogative and dispersal forms of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* to beetle and pine derived compounds. *Fundamental and Applied Nematology* 21: 243–250.
- Steele** A. E., Toxopeus H., Heijbroek W., **1982**. A comparison of the hatching of juveniles from cysts of *Heterodera schachtii* and *H. trifolii*. *Journal of Nematology* 14 (4): 588–592.
- Steele** A. E., **1983**. Effects of selected nematicides on hatching of *Heterodera schachtii*. *Journal of Nematology* (15) 3: 467–473.
- Stewart** G. R., Perry R. N., Alexander J., Wright D. J., **1993a**. A glycoprotein specific to the amphids of *Meloidogyne* species. *Parasitology* 106: 405–412.
- Stewart** G. R., Perry R. N., Wright D. J., **1993b**. Studies on the amphid specific protein gp32 in different life cycle stages of *Meloidogyne* species. *Parasitology* 107: 573–578.
- Stone** A. R., **1973**. *Heterodera pallida* n. sp. (Nematoda: Heteroderidae), a second species of potato cyst nematode. *Nematologica* 18: 591–606.
- Świędrych** A., Lorenc-Kukula K., Skiryecz A., Szopa J., **2004**. The catecholamine biosynthesis route in potato is affected by stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 593–600.
- Szafranek** B., Chrapkowska K., Pawinska M., Szafranek J., **2005**. Analysis of leaf surface sesquiterpenes in potato varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 2817–2822.
- Szafranek** B., Chrapkowska K., Waligora D., Palavinskas R., Banach A., Szafranek J., **2006**. Leaf surface sesquiterpene alcohols of the potato (*Solanum tuberosum*) and their influence on Colorado beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) feeding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 7729–7734.
- Šimko** I., Omer E. A., Ewing E. E., McMurry S., Koch J. L., Davies P. J., **1996**. Tuberonic (12–OH–jasmonic) acid glucoside and its methyl ester in potato. *Phytochemistry* 43: 727–730.
- Tefft** P. M., Bone L. W., **1984**. Zinc-mediated hatching of eggs of soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. *Journal of Chemical Ecology* 10 (2): 361–372.
- Trett** M. W., Perry R. N., **1985a**. Functional and evolutionary implications of the anterior sensory anatomy of species of root-lesion nematodes (genus *Pratylenchus*). *Revue de Nématologie* 8: 341–55.
- Trett** M. W., Perry R. N., **1985b**. Effects of the carbamoyloxime, aldicarb, on the ultrastructure of the root lesion nematode, *Pratylenchus penetrans* (Nematoda, Pratylenchidae). *Nematologica* 31: 321–334.



- Tominaga Y., Nagas A., Kuwahara Y., Sugawara R., 1982.** Aggregation of *Bursaphelenchus xylophilus* to several compounds containing oleyl group. *Applied Entomology and Zoology* 17: 46–51.
- Trudgill D. L., 1967.** The effect of environment on sex determination in *Heterodera rostochiensis*. *Nematologica* 13: 263–272.
- Turner S. J., 1996.** Population decline of potato cyst nematodes (*Globodera rostochiensis*, *G. pallida*) in field soils in Northern Ireland. *Annals of Applied Biology* 129: 315–322.
- Turner S. J., Evans K., 1998.** The origins, global distribution and biology of potato cyst nematodes (*Globodera rostochiensis* (Woll.) and *Globodera pallida* (Stone)). In: Marks R. J., Brodie B. B. *Potato cyst nematodes Biology, Distribution and Control*. Wallingford, UK, CABI: 7–27.
- Turner S. J., Rowe J. A., 2006.** Cyst nematodes. In: Perry R. N., Moens M. (Eds.), *Plant Nematology*. CABI, UK: 91–122.
- Twomey U., 1995.** Hatching chemicals involved in the interaction between potato cyst nematodes, host and non-host plants. PhD Thesis, National University of Ireland, Cork, Republic of Ireland.
- Twomey Y. U., Rolfe R. N., Warrior P., Perry R. N., 2002.** Effects of the biological nematicide, DiTera®, on movement and sensory responses of second stage juveniles of *Globodera rostochiensis*, and stylet activity of *G. rostochiensis* and fourth stage juveniles of *Ditylenchus dipsaci*. *Nematology* 4: 909–915.
- Uren N. C., 2000.** Types, amounts and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. In: Pinton R., Varanini Z., Nannipiero P. (Eds.), *The rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil–plant interface*. Marcel Dekker, New York: 19–40.
- 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.
- VAAT, 2008.** *Augalų apsauga*. Lietuvos Respublikos Valstybinė Augalų apsaugos tarnyba, Vilnius: 31.
- VŽ, 2001.** LR Žemės ūkio ministro Įsakymas dėl cistas sudarančių nematodų kontrolės ir fitosanitarijos priemonių taikymo tvarkos patvirtinimo, Nr. 219, 2001 06 29. *Valstybės žinios* (2107): 58
- Viglierchio D. R., 1990.** Carbon dioxide sensing by *Panagrellus silusiae* and *Ditylenchus dipsaci*. *Revue de Nématologie* 13 (4): 425–432.
- Voinilo V. A., 1976.** The effect of organic acids on the issue from the cyst of potato nematode larvae. *Zashchita Rastenii Minsk* 1: 147–150.
- 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.
- Wallace H. R., 1956.** Emergence of larvae from cysts of the beet eelworm, *Heterodera schachtii* Schmidt, in aqueous solutions of organic and inorganic salts. *Annals of Applied Biology* 44 (2): 274–282.
- Wang K. C., Chen T. A., 1985.** Ultrastructure of the phasmids of *Scutellonema brachyurum*. *Journal of Nematology* 17: 175–86.
- Wang C., Bruening G., Williamson V. M., 2009.** Determination of preferred pH for root-knot nematode aggregation using pluronic F-127 Gel. *Journal of Chemical Ecology* 35: 1242–1251.
- Wang C., Lower S., Thomas V. P., Williamson V. M., 2010.** Root-knot nematodes exhibit strain-specific clumping behavior that is inherited as simple genetic trait. *PlosOne* 5(12): 1–7.
- Weidenhamer J., 2005.** Biomimetic measurement of allelochemical dynamics in the rhizosphere. *Journal of Chemical Ecology* 31: 221–236.
- Weischer B., 1959.** Experimentelle Untersuchungen über die Wandenburg von Nematoden. *Nematologica* 4: 172–186.
- Weissbecker B., Van Loon J. J. A., Posthumus M. A., Bouwmeester H. J., Dicke M., 2000.** Identification of volatile potato sesquiterpenoids and their olfactory detection by the two-spotted stinkbug *Perillus bioculatus*. *Journal of Chemical Ecology* 26 (6): 1433–1445 (13).
- Wergin W. P., Endo B. Y., 1976.** Ultrastructure of a neurosensory organ in a root knot nematode. *Journal of Ultrastructure Research* 56: 258–76.

- Whitehead** A. G., **1992**. Emergence of juvenile potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* and the control of *G. pallida*. *Annals of Applied Biology* 120 (3): 471–486.
- Whitehead** A. G., Turner S. J., **1998**. Management and regulatory control strategies for potato cyst nematodes (*Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*). In: Marks R. J., Brodie B. B., (Eds.), *Potato Cyst Nematodes Biology, Distribution and Control*. CABI, Wallingford, UK: 135–153.
- Wilson** E. O., Bossert W. H., **1963**. Chemical communication among animals. *Recent Progress in Hormone Research* 19: 673–716.
- Winner** C., **1957**. Über die aktivierende Wirkung von Aminoakridinen auf *Heterodera schachtii*. *Nematologica* 2: 126.
- Winter** M. D., Mcpherson M. J., Atkinson H. J., **2002**. Neuronal uptake of pesticides disrupts chemosensory cells of nematodes. *Parasitology* 125: 561–565.
- Wright** K. A., **1983**. Nematode chemosensilla: form and function. *Journal of Nematology* 15 (2): 151–158.
- Zhao** X., Schmitt M., Hawes M. C., **2000**. Species-dependent effects of border cell, root tip exudates on nematode behavior. *Phytopathology* 90: 1239–1245.
- Zhao** L. L., Wei W., Kang L., Sun J. H., **2007**. Chemotaxis of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, to volatiles associated with host pine, *Pinus massoniana*, and its vector *Monochamus alternatus*. *Journal of Chemical Ecology* 33 (6): 1207–1216.
- 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.
- Варшаловича** А. А., **1972**. *Руководство по досмотру и экспертизе растительных и других подкарантинных материалов*. Изд. Колос, Москва: 440.
- Кирьянова** Е. С., **1963**. Методы исследования нематод растений, почвы и насекомых. Издательство академии наук СССР, Ленинград, Москва: 33–38.
- Савотников** Ю. Ф., **1986**. Всесоюзный орден трудового красного знамени институт гельминтологии имени академика К. И. Скрябина. Рекомендации по выявлению и мерам борьбы с очагами глободероза картофеля, Государственная инспекция по карантину растений госагропрома РСФСР, Москва: 39–63.
- Шляпятен** Ю., **1986**. Антропогенное воздействие на почвенных и растительных нематод. Вильнюс: 43.

## MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SARAŠAS

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) – priimtas spaudai.
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.

## KONFERENCIJŲ TEZĖS

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

## PRIEDAI

### 1 Priedas

1 lentelė. Bulvių (*Solanum tuberosum*) išskiriamos medžiagos.

Cheminės medžiagos	Literatūros šaltiniai
$\alpha$ -Kadinolis	
Germakren-D-4-olis	Szafranek <i>et al.</i> , 2005
$\beta$ -Seskvifelandrenas	
Ledolis	Szafranek <i>et al.</i> , 2006
Kunzeaolis	
$\alpha$ -Zingiberenas	
Biciklogermakrenas	
(R)-(+)-Limonenas	
Dekanalės	
Nonanalės	Weissbecker <i>et al.</i> , 2000
Linalolis	
(E)-4,8-Dimetil-1,3,7-nonatrienas	
2-Feniletanolis	
$\beta$ -Selinenas	
$\beta$ -Kariofilenas	
(E)- $\beta$ -Farnezenas	
Germakren-D-4-olis	Agelopoulos <i>et al.</i> , 2000
$\beta$ -Bisabolenas	
(Z,Z)- $\alpha$ -Farnezenas	
(E)-Kariofilenas	
$\alpha$ -Humulenas	
Tiobismetanas	Berdis <i>et al.</i> , 1993
Heksenalės	
(Z)-3-Heksen-1-olis	
(Z)-3-Heksenilacetatas	
Metilsalicilatas	Martel <i>et al.</i> , 2005
Lubiminas	
Rišitinas	Brindle <i>et al.</i> , 1983
Solavetivoninas	

Nikotinas	Leete, 1983; Siegmund <i>et al.</i> , 1999
Nornikotinas	
Kalisteginas A <sub>3</sub>	Dräger <i>et al.</i> , 1995; Keiner <i>et al.</i> , 2000; Friedman <i>et al.</i> , 2003
Kalisteginas B <sub>2</sub>	
Kalisteginas B <sub>1</sub>	
Kalisteginas B <sub>4</sub>	
Temazepamas	Kavvadias <i>et al.</i> , 2000
Diazepamas	
dopaminas	
Norepinefrinas	Świądrych <i>et al.</i> , 2004
Epinefrinas	
<i>p</i> -Hidroksibenzoīnēs rūgštīs 4-β- <i>D</i> -glikozidas	
Vanilīno rūgštīs 4-β- <i>D</i> -glikozidas	Keller <i>et al.</i> , 1996
Salicīlo rūgštīs 2-β- <i>D</i> -glikozidas	
Arbutīnas	
Barogenīnas	Kaneko <i>et al.</i> , 1977
α-Čakonīnas	
β-Čakonīnas	
γ-Čakonīnas	
α-Solanīnas	
β-Solanīnas	
γ-Solanīnas	
Dehidrokomersonīnas	Friedman, 2006
Komersonīnas	
Demisīnas	
Leptīnīnas I	
Leptīnas I	
Leptīnīnas II	
Leptīnas II	
Tomatīdenolīs	Ripperger, Schreiber, 1968
Solanīdīnas	Prelog, Jeger, 1960
CholekalCIFerolīs	Aburjai <i>et al.</i> , 1998
Liuteīnas	
Zeaksantīnas	Brown, 2005

Violaksantinas	
Tuberono rūgštis	Šimko <i>et al.</i> , 1996
Skopolinas	Baumert <i>et al.</i> , 2001
Chlorogeno rūgštis	Dao, Friedman, 1992
Feruloiltiraminas	Negrel <i>et al.</i> , 1996
Feruloiloktopaminas	
Paucinas	Keller <i>et al.</i> , 1996
Subafilinas	
Kamferolio glikozidai	Harborne, 1962
Kvercetino glikozidai	
Peonaninas	
Delfinidinas	
Malvidinas	Harborne, 1964
Pelargonidinas	
Petunidinas	
Lariciresinol 9–glikozidas	Hegnauer, 1990
Lanost–8–en–3 $\beta$ –olis	
Lanosterolis	
24–Metilenlanost–8–en–3 $\beta$ –olis	Heftmann, 1983
Cikloartanolis	
24–Metilencikloartanolis	

## 2 Priedas

1 lentelė. Augalų parazitinius nematodus viliojantys nespecifiniai kairomonai.

Aktyvūs junginiai	Augalų parazitinių nematodų rūšys	Literatūros šaltiniai
Deguonis	<i>Ditylenchus dipsaci</i>	Johnson, Viglierchio, 1961
	<i>Heterodera schachtii</i>	
Anglies dioksidas	<i>Aphelenchoides fragariae</i>	Klingler, 1970
	<i>Ditylenchus dipsaci</i>	Johnson, Viglierchio, 1961; Croll, Viglierchio, 1969; Klingler, 1972
	<i>Heterodera schachtii</i>	Bird, 1960; Johnson, Viglierchio, 1961
	<i>Meloidogyne hapla</i>	Johnson, Viglierchio, 1961, Wang <i>et</i>

		<i>al.</i> , 2009
	<i>Meloidogyne incognita</i>	Pline, Dusenbery, 1987; Robinson, 1995
	<i>Meloidogyne javanica</i>	Bird, 1960; Johnson, Viglierchio, 1961; Robinson, 1995
	<i>Meloidogyne naasi</i>	Johnson, Viglierchio, 1961
	<i>Rotylenchulus reniformis</i>	Johnson, Viglierchio, 1961; Robinson, 1995
	<i>Pratylenchus sp.</i>	Bird, 1960
	<i>Pratylenchus mynii</i>	
	<i>Pratylenchus penetrans</i>	Edmunds, Mai, 1967; Klingler, 1970
	<i>Tylenchulus semipenetrans</i>	Johnson, Viglierchio, 1961
Askorbo rūgštis	<i>Meloidogyne hapla</i>	Bird, 1959
	<i>Meloidogyne javanica</i>	
Asparto rūgštis	<i>Ditylenchus dipsaci</i>	Jones, 1960
Giberelino rūgštis	<i>Meloidogyne hapla</i>	Bird, 1959
	<i>Meloidogyne javanica</i>	
Glutamo rūgštis	<i>Ditylenchus dipsaci</i>	Jones, 1960

**2 lentelė.** Augalų parazitinius nematodus viliojantys specifiniai kairomonai.

Aktyvūs junginiai	Augalų parazitinių nematodų rūšys	Literatūros šaltiniai
Longifolenas		
$\alpha$ -Pinenas		Zhao <i>et al.</i> , 2007
$\beta$ -Pinenas	<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	
$\beta$ -Mircenas		Ishikawa <i>et al.</i> , 1986
Linolino rūgštis		Miyazaki <i>et al.</i> , 1977
1-Monooleinas		Tominaga <i>et al.</i> , 1982
Avižų rūgštis		
Mugininė rūgštis	<i>Heterodera avenae</i>	Lung, 1993
Deoksimugininė rūgštis		



**3 lentelė.** Augalų parazitinių nematodų atraktantai.

<b>Aktyvūs junginiai</b>	<b>Augalų parazitinių nematodų rūšys</b>	<b>Literatūros šaltiniai</b>
Natrio chloridas	<i>Rotylenchulus reniformis</i>	Riddle, Bird, 1985
	<i>Tylenchulus semipenetrans</i>	
Natrio karbonatas	<i>Meloidogyne javanica</i>	Abou-Setta, Duncan, 1998
Natrio hidrokarbonatas		
Natrio hidrofosfatas,	<i>Neotylenchus linfordi</i>	Klink <i>et al.</i> , 1970
Natrio sulfatas	<i>Rotylenchulus reniformis</i>	Riddle, Bird, 1985
Magnio chloridas	<i>Heterodera glycines</i>	Papademetriou, Bone, 1983
Magnio sulfatas	<i>Globodera rostochiensis</i>	Evans, 1969
	<i>Rotylenchulus reniformis</i>	Riddle, Bird, 1985
Kalio chloridas	<i>Tylenchulus semipenetrans</i>	Abou-Setta, Duncan, 1998
Kalio cianidas	<i>Meloidogyne hapla</i>	
	<i>Meloidogyne javanica</i>	Wang <i>et al.</i> , 2010
	<i>Meloidogyne incognita</i>	
Kalcio chloridas	<i>Heterodera glycines</i>	Winter <i>et al.</i> , 2002
	<i>Tylenchulus semipenetrans</i>	Abou-Setta, Duncan, 1998
Kalcio sulfatas	<i>Heterodera glycines</i>	Papademetriou, Bone, 1983
Aliuminio chloridas	<i>Tylenchorhynchus martini</i>	Ibrahim, Hollis, 1967
Cinko chloridas	<i>Heterodera glycines</i>	Papademetriou, Bone, 1983
Cinko sulfatas		
Kadmio chloridas	<i>Tylenchorhynchus martini</i>	Ibrahim, Hollis, 1967
Amonio chloridas	<i>Rotylenchulus reniformis</i>	Riddle, Bird, 1985
Amonio karbonatas	<i>Neotylenchus linfordi</i>	Klink <i>et al.</i> , 1970
Amonio nitratas	<i>Globodera rostochiensis</i>	Rode, 1965
Amonio sulfatas	<i>Rotylenchulus reniformis</i>	Riddle, Bird, 1985
Natrio formiatas	<i>Tylenchulus semipenetrans</i>	Abou-Setta, Duncan, 1998
Natrio acetatas	<i>Rotylenchulus reniformis</i>	Riddle, Bird, 1985
	<i>Tylenchulus semipenetrans</i>	Abou-Setta, Duncan, 1998
Magnio acetatas	<i>Rotylenchulus reniformis</i>	Riddle, Bird, 1985
Kalio formiatas,	<i>Tylenchulus semipenetrans</i>	Abou-Setta, Duncan, 1998
Kalio acetatas		
Amonio acetatas	<i>Rotylenchulus reniformis</i>	Riddle, Bird, 1985

Sacharozė	<i>Meloidogyne naasi</i>	Balhadere, Evans, 1994
Glicinas	<i>Globodera pallida</i>	Riga <i>et al.</i> , 1997
Acto rūgštis	<i>Meloidogyne javanica</i>	Wang <i>et al.</i> , 2009
	<i>Meloidogyne incognita</i>	
	<i>Meloidogyne hapla</i>	
Metansulfo rūgštis		
Druskos rūgštis	<i>Neotylenchus linfordi</i>	Klink <i>et al.</i> , 1970
Sieros rūgštis		
Perchlorato rūgštis		
Skruzdžių rūgštis		
Propiono rūgštis	<i>Meloidogyne hapla</i>	Wang <i>et al.</i> , 2009
Pieno rūgštis		
Gintaro rūgštis		
Citrinų rūgštis		
Piridino hidrochloridas		
Piridino metansulfonatas		
$\gamma$ -Aminobutirinė rūgštis	<i>Globodera pallida</i>	
$\alpha$ -Aminobutirinė rūgštis	<i>Globodera rostochiensis</i>	Riga <i>et al.</i> , 1997
L-Glutamo rūgštis	<i>Globodera pallida</i>	
Acetilcholinas	<i>Globodera rostochiensis</i>	
3',5'-Adenozinmonofosfatas	<i>Rotylenchulus reniformis</i>	Riddle, Bird, 1985
5'-Adenozinmonofosfatas		

**4 lentelė.** Augalų parazitinių nematodų specifiniai ritimosi veiksniai.

Aktyvūs junginiai	Augalų parazitinių nematodų rūšys	Literatūros šaltiniai
Glicinoeklepinas A		Masamune <i>et al.</i> , 1982
Glicinoeklepinas B	<i>Heterodera glycines</i>	Fukuzawa <i>et al.</i> , 1985
Glicinoeklepinas C		
$\alpha$ -Solaninas	<i>Globodera rostochiensis</i>	Devine <i>et al.</i> , 1996; Byrne <i>et al.</i> , 2001
$\alpha$ -Čakoninas		
C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>8</sub> *		
C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub> *		
		Marrian <i>et al.</i> , 1949
		Johnson, 1952

$C_{13}H_{12}O_3^*$		Hartwell <i>et al.</i> , 1959
$C_{11}H_{16}O_4^*$	<i>Globodera rostochiensis</i>	Clarke, 1970
$C_{27}H_{30}O_9^*$	<i>Globodera pallida</i>	Mulder <i>et al.</i> , 1992
Solanoeklepinas A		Schenk <i>et al.</i> , 1999

\* Spėjama empirinė formulė

**5 lentelė.** Augalų parazitinių nematodų nespecifiniai ritimosi veiksniai.

Aktyvūs junginiai	Augalų parazitinių nematodų rūšys	Literatūros šaltiniai
Ličio chloridas	<i>Heterodera schachtii</i>	Clarke, Shepherd, 1966b
Natrio chloridas		Wallace, 1956
Natrio hipochloritas	<i>Heterodera glycines</i>	Charlson, Tylka, 2003
	<i>Heterodera solanacerum</i>	Clarke, Perry, 1977
Natrio tiocianatas	<i>Globodera pallida</i>	Maher, 2001
	<i>Globodera rostochiensis</i>	Clarke, Shepherd, 1966a,b; Whitehead, 1992
Natrio metavanadatas	<i>Heterodera fici</i>	Di Vito, Sasanelli, 1990; Sasanelli, D'Addabbo, 1992
	<i>Heterodera schachtii</i>	Clarke, Shepherd, 1966a
	<i>Globodera pallida</i>	
Natrio vanadatas		Byrne <i>et al.</i> , 2001
	<i>Globodera rostochiensis</i>	
Natrio pirovanadatas		Clarke, Shepherd, 1966a
	<i>Heterodera schachtii</i>	
Kalio chloridas		Wallace, 1956
Kalio permanganatas	<i>Heterodera sacchari</i>	Reversat, 1981
	<i>Globodera tabacum</i>	
	<i>Heterodera trifolii</i>	Clarke, Shepherd, 1966b
	<i>Heterodera cruciferae</i>	
Kalio heksachloroplatinatas	<i>Heterodera schachtii</i>	Clarke, Shepherd, 1968
Kalcio chloridas	<i>Heterodera glycines</i>	Lehman <i>et al.</i> , 1971
Kalcio sulfatas		
Nikelio chloridas	<i>Heterodera cruciferae</i>	Clarke, Shepherd, 1966b
	<i>Heterodera schachtii</i>	
Nikelio sulfatas	<i>Heterodera glycines</i>	Tefft, Bone, 1984

	<i>Heterodera schachtii</i>	
	<i>Globodera pallida</i>	Clarke, Shepherd, 1966b
	<i>Globodera rostochiensis</i>	
	<i>Globodera tabacum</i>	Clarke, Shepherd, 1965
	<i>Heterodera carotae</i>	Clarke, Shepherd, 1965, 1966b
	<i>Heterodera ciceri</i>	Greco <i>et al.</i> , 1992
	<i>Heterodera cruciferae</i>	Clarke, Shepherd, 1965, 1966b
Cinko chloridas	<i>Heterodera fici</i>	Di Vito, Sasanelli, 1990
	<i>Heterodera glycines</i>	Clarke, Shepherd, 1966b; Tefft, Bone, 1984
	<i>Heterodera goettingiana</i>	Clarke, Shepherd, 1965
	<i>Heterodera schachtii</i>	Clarke, Shepherd, 1965, 1966b
	<i>Heterodera trifolii</i>	Clarke, Shepherd, 1966b; Steele <i>et al.</i> , 1982
	<i>Heterodera zaeae</i>	Hashmi, Krusberg, 1995
Cinko nitratas	<i>Heterodera cruciferae</i>	Clarke, Shepherd, 1966b
	<i>Heterodera schachtii</i>	
	<i>Globodera tabacum</i>	Clarke, Shepherd, 1966b, 1968
	<i>Heterodera carotae</i>	1968
	<i>Heterodera fici</i>	Di Vito, Sasanelli, 1990
Cinko sulfatas	<i>Heterodera glycines</i>	Clarke, Shepherd, 1966b; Tefft, Bone, 1984; Behm <i>et al.</i> , 1995; Charlson, Tylka, 2003
	<i>Heterodera schachtii</i>	Clarke, Shepherd, 1966b, 1968
	<i>Heterodera trifolii</i>	1968
Stroncio chloridas	<i>Heterodera cruciferae</i>	
	<i>Globodera tabacum</i>	
Kadmio chloridas	<i>Heterodera goettingiana</i>	Clarke, Shepherd, 1966b
	<i>Heterodera schachtii</i>	
Gyvsidabrio chloridas		Wallace, 1956
Švino chloridas	<i>Heterodera cruciferae</i>	Clarke, Shepherd, 1966b

Kalcio chloracetatas		O'Brien <i>et al.</i> , 1939
Sidabro laktatas		
Sidabro benzoatas	<i>Heterodera schachtii</i>	Boyd, 1942
Sidabro proteinatas		
Askorbo rūgštis		Wallace, 1956
Boro rūgštis	<i>Heterodera cruciferae</i>	Clarke, Shepherd, 1966b, 1968
Citrinų rūgštis	<i>Globodera rostochiensis</i>	Voinilo, 1976 Janzen, 1968
	<i>Heterodera cruciferae</i>	Clarke, Shepherd, 1967; Janzen, 1968
Flaviano rūgštis	<i>Heterodera glycines</i>	Clarke, Shepherd, 1967; Okada, 1972a
	<i>Heterodera schachtii</i>	Clarke, Shepherd, 1967, 1968
Fumaro rūgštis	<i>Globodera rostochiensis</i>	Voinilo, 1976
Nikotino rūgštis	<i>Heterodera schachtii</i>	
	<i>Globodera rostochiensis</i>	Clarke, Shepherd, 1968
Pikro rūgštis	<i>Heterodera schachtii</i>	
	<i>Heterodera trifolii</i>	Maas, Heijbroek, 1982
		Clarke, Shepherd, 1968;
Pikrolono rūgštis	<i>Globodera rostochiensis</i>	Voinilo, 1976; Byrne <i>et al.</i> , 2001
	<i>Heterodera glycines</i>	Tefft, Bone, 1984 Chen <i>et al.</i> , 1997
	<i>Meloidogyne hapla</i>	Hewlett <i>et al.</i> , 1973
Tanino rūgštis	<i>Meloidogyne incognita</i>	
	<i>Meloidogyne javanica</i>	Riddle, Bird, 1985
	<i>Globodera rostochiensis</i>	Calam <i>et al.</i> , 1949; Clarke, Shepherd, 1968
		Clarke, Shepherd, 1968
$\alpha$ -Acetiltetrono rūgštis	<i>Heterodera schachtii</i>	Calam <i>et al.</i> , 1949; Clarke, Shepherd, 1968
Anhidrotetrono rūgšties metilo esteris		Clarke, Shepherd, 1968

$\alpha$ -Etoksikarbonil- $\gamma$ - feniltetrono rūgštis		
$\alpha$ -Etoksikarboniltetrono rūgštis		Calam <i>et al.</i> , 1949; Clarke, Shepherd, 1968
<i>o</i> -Aminobenzoinė rūgštis		Clarke, Shepherd, 1968
3,9-diamin-7-etoksiakridinas (Rivanolas)		Moriarty, 1963
Karbamidas		Wallace, 1956
Aliltiokarbamidas		
<i>N,N'</i> -Dietiltiokarbamidas		Clarke, Shepherd, 1966b, 1968
<i>N,N'</i> -Difeniltiokarbamidas		
Etilentiurammonosulfidas		
Polietilentiuramdisulfidas		
Natrio etilenbis(ditiokarbamatas) (Nabamas)	<i>Heterodera schachtii</i>	
Cinko sulfatas/Natrio etilenbis(ditiokarbamatas) (Nabamas)		
Magnio sulfatas/Natrio etilenbis(ditiokarbamatas) (Nabamas)		Clarke, Shepherd, 1966a, 1968
Mangano etilenbis(ditiokarbamatas) (Manebas)		
Cinko etilenbis(ditiokarbamatas) (Zinebas)		
	<i>Meloidogyne javanica</i>	Hough, Thomason, 1975
2-Metil-2-(metiltio)propanal-	<i>Meloidogyne arenaria</i>	Berge, Cuany, 1972
<i>O</i> -( <i>N</i> -metilkarbamoil)oksimas (Aldikarbas)	<i>Tylenchulus semipenetrans</i>	Huang, Van Gundy, 1978
2,2-Dimetil-2,3-dihidro-1- benzofuran-7-il	<i>Heterodera schachtii</i>	Steele, 1983

metilkarbamatas		
(Karbofuranas)		
Metil[1–		
[(butilamino)karbonil]–1 <i>H</i> –	<i>Globodera pallida</i>	Whitehead, 1992
benzimidazol–2–il]karbamatas		
(Benomilas)		
3,5–dijod–4–		
hidroksibenzonitrilas/(+) <i>–(R)–</i>	<i>Heterodera schachtii</i>	Hengstebeck, Gleissl, 1988
2–(2,4–		
dichlorfenoksi)propiono		
rūgšties druskų mišinys		
(Botrolis DP)		
Metil–2–(dimetiltiamino)–		
<i>N</i> –[(metilkarbamoil)oksi]–2–	<i>Globodera pallida</i>	Whitehead, 1992
oksoetanimidotionatas		
(Oksamilas)		
<i>o</i> –Chlorfenolindo–2,6–		
dichlorfenolis		
<i>o</i> –Bromfenolindofenolis		
<i>m</i> –Chlorfenolindofenolis		
Tartrazinas	<i>Heterodera schachtii</i>	Clarke, Shepherd, 1968
Tolueno mēlis		
Lizamino geltonis		
3–Metil–4–nitro–1–		
fenilpirazol–5–onas		
Tiamino hidrochloridas	<i>Heterodera oryzicola</i>	Rao, Jayaprakash, 1978
3,9–Diamino–7–etoksiakridino		Rademacher, Schmidt,
laktatas (Rivanolis)		1933; Winner, 1957
9–Aminoakridinas		Winner, 1957
9–Aminoakridino		
hidrochloridas	<i>Heterodera schachtii</i>	Moriarty, 1963
Gliukožė		
Fruktozė		
Sacharozė		
Maltozė		

---

Kofeinas

---

*DL*- $\alpha$ -Alaninas

---

Gliutaminas

---

*DL*-Izoleucinas

---

*DL*-Leucinas

---

*DL*-Valinas

---

*DL*-Tryptofanas