

**VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS**

EVELINA OSINSKA
Mikrobiologijos studijų programa

Magistro baigiamasis darbas

ENTOMOPATOGENINIŲ NEMATODŲ *STEINERNEMA CARPOCAPSAE* IR *S. KRAUSSEI* REAKCIJA Į 1-NONENĄ

Darbo vadovė: dr. Rasa Čepulytė

Konsultantė: Deimantė Tiškevičiūtė

Studentė _____

Vilnius, 2024

TURINYS

SANTRUMPOS.....	4
ĮVADAS	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA	7
1.1. Entomopatogeniniai nematodai (EPN)	7
1.2. Gyvenimo ciklas	8
1.3. Simbiozė su bakterijomis.....	9
1.4. Ekologija.....	11
1.5. <i>Steinernema</i> gentis.....	12
1.5.1. <i>S. carpocapsae</i>	13
1.5.2. <i>S. kraussei</i>	13
1.6. Cheminės medžiagos EPN ekologijoje.....	14
1.6.1. Vidrūšinės <i>Steinernema</i> sąveikos	15
1.6.2. <i>Steinernema</i> sąveikos su augalais.....	16
1.6.3. <i>Steinernema</i> sąveikos su vabzdžiais šeiminkais.....	18
1.6.4. <i>Steinernema</i> sąveikos su EPN užkrėstais vabzdžiais	19
1.7. 1-Nonenas	20
1.8. Metodai EPN chemoekologinėms sąveikoms tirti.....	20
1.9. EPN svarba (panaudojimas žemės ūkyje).....	22
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	24
2.1. Vabzdžio <i>Galleria mellonella</i> dauginimas ir auginimas	24
2.2. Entomopatogeninių nematodų dauginimas ir inkubavimas.....	24
2.3. Tyrime naudotų cheminių junginių paruošimas	25
2.4. Dviejų pasirinkimų elgesio testas	26
2.5. Statistinė analizė	27
3. REZULTATAI	28
3.1. Reakcija į 1-noneno tirpiklį etanolį: <i>S. carpocapsae</i>	28
3.2. Reakcija į 1-noneno tirpiklį etanolį: <i>S. kraussei</i>	29
3.3. Reakcija į 1-nononą: <i>S. carpocapsae</i>	30
3.4. Reakcija į 1-nononą: <i>S. kraussei</i>	31
4. REZULTATŲ APTARIMAS	32
IŠVADOS	35

REZULTATŲ SKLAIDA	36
SANTRAUKA.....	37
SUMMARY	38
PADĖKA	39
LITERATŪROS ŠALTINIAI	40

SANTRUMPOS

EPN – entomopatogeniniai nematodai

IJ - infekcinės stadijos juvenilės

IVADAS

Entomopatogeniniai nematodai (EPN) gyvena ir parazituoja dirvožemyje tarpstančius vabzdžius. Susidomėjimas tirti EPN atsirado dėl jų biologinės kontrolės potencialo, t. y. jų panaudojimo žemės ūkyje prieš vabzdžius kenkėjus, kadangi lyginant su cheminiais pesticidais EPN nėra toksiški (Koppenhöfer ir kt., 2020) ir yra saugūs žmonėms bei aplinkai (Zhang ir kt., 2022). Nepaisant to, kad EPN yra gana pačiai taikomi kovai su ekonomiškai svarbiais vabzdžiais kenkėjais, žinios apie tai, kaip EPN infekuojančios juvenilės (IJ) randa savo grobį – vabzdį šeimnininką, gali būti panaudotos siekiant padidinti EPN, kaip biokontrolinės priemonės efektyvumą.

Chemorecepcija yra vienas svarbiausių veiksnių, padedančių EPN gerai orientuotis chemiškai sudėtingoje dirvožemio aplinkoje (Gaffke ir kt., 2023). Šiai dienai yra mažai žinoma apie konkrečius cheminius junginius, susijusius su EPN elgesiu, ypač lyginant su kitos ekologinės grupės nematodais, mintančiais augalais (augalų parazitiniaisiais nematodais), kur žinoma daugiau nei 500 junginių, sukeliančių jų elgesio reakcijas (Čepulytė ir Būda, 2022). Nustatyta, kad ieškant tinkamų vabzdžių šeimnininkų EPN elgseną veikia tiek anglies dioksidas, tiek vabzdžių, tiek jų pagrauztų augalų ir net jau EPN infekuotų vabzdžių skleidžiamos cheminės medžiagos, tačiau konkrečių medžiagų identifikuota mažai. Žinoma, kad EPN užkrėstų vabzdžių lavonų išskiriami lakieji mišiniai skiriasi priklausomai nuo infekcijoje dalyvaujančios rūšies (EPN, simbiotinių bakterijų ar vabzdžių) ir beveik nesutampa (Grunseich ir kt., 2021, Zhang ir kt., 2019). Tačiau neseniai nustatyta, kad dvi skirtingos vabzdžių rūšys (*Galleria mellonella* ir *Acalymma vittatum*) infekuotos trimis skirtingomis EPN rūšimis (*Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema riobrave* ir *S. carpocapsae*) išskyrė vieną bendrą junginį - 1-noneną. Šiai dienai nėra žinoma kaip šis cheminis junginys (1-nonenas) veikia EPN elgseną, todėl šio darbo tikslas ir buvo ištirti, kaip 1-nonenas veikia dviejų *Steinernema* genties rūšių *S. carpocapsae* ir *S. kraussei* IJ elgseną.

Geresnis EPN elgsenos supratimas yra labai svarbus kuriant efektyvesnes bei tvaresnes vabzdžių kenkėjų kontrolės strategijas žemės ūkyje (Zhang ir kt., 2021).

Darbo tikslas:

Ištirti cheminio junginio - 1-noneno poveikį EPN *S. carpocapsae* ir *S. kraussei* elgsenai.

Darbo uždaviniai:

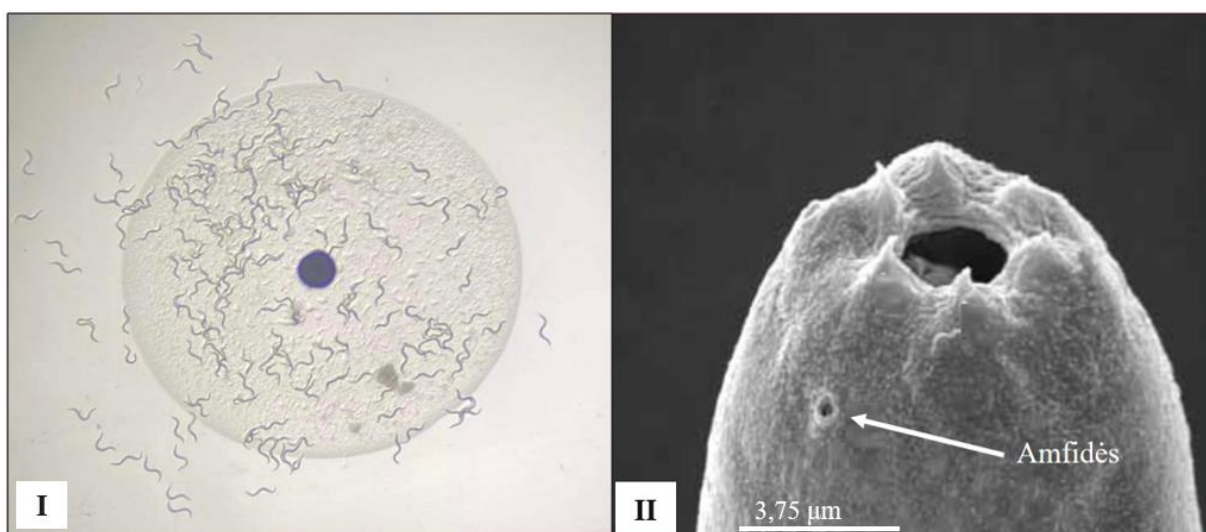
1. Ištirti *S. carpocapsae* ir *S. kraussei* reakciją į 1-noneno tirpiklį etanolį (kontrolė).
2. Ištirti *S. carpocapsae* ir *S. kraussei* reakciją į skirtingas 1-noneno koncentracijas.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Entomopatogeniniai nematodai (EPN)

Entomopatogeniniai nematodai (EPN) – nesegmentuotos apvaliosios kirmėlės (1 pav.). Tai vabzdžių parazitai, priklausantys Nematoda tipui, Steinernematidae ir Heterorhabditidae šeimoms (Forst ir kt., 1997) bei *Steinernema*, *Heterorhabditis* ir *Oscheius* gentims. Kadangi *Oscheius* gentis sąlyginai neseniai priskirta EPN (Torres-Barragan ir kt., 2011), toliau darbe plačiau aprašomos *Steinernema* ir *Heterorhabditis* gentys.

Remiantis morfologija EPN rūšys yra labai panašios, t. y. visiems EPN būdinga bendra kūno forma - cilindrinė, smailėjanti galuose. Morfologiniai bruožai, padedantys atskirti *Steinernema* ir *Heterorhabditis* gentis yra uodegos, stemplės bei ryklės ilgis ir sekrecinių porų bei nervinio žiedo buvimo vieta (Cimen ir kt., 2014). EPN turi virškinimo, reprodukcinę, nervų ir šalinimo sistemas, tačiau neturi atskirų kraujotakos ar kvėpavimo sistemų. Orientuotis aplinkoje nematodams padeda termoreceptoriai, mechanosensoriniai ir chemoreceptoriai. Chemoreceptoriai yra patys svarbiausi IJ ieškant tinkamų vabzdžių šeimininkų (Basyoni ir Rizk, 2016). Pagrindiniai nematodų chemosensoriniai organai yra vadinami amfidėmis (angl. *amphids*) (1 pav.) ir fazmidėmis (angl. *phasmids*). Skirtinguose nematoduose įvairių formų ir dydžių amfidės yra išsidėsčiusios priekinėje (galvinėje) nematodų dalyje, o fazmidės - nematodų užpakalinėje (uodeginėje) dalyje (Ghorbanzadeh ir kt., 2020). Šių organų pagalba EPN pajunta aplinkos chemines medžiagas, pavyzdžiui, vabzdžių išskiriamus cheminius junginius, nematodų feromonus ir pan. (Haukeland, 1992; Nguyen ir kt., 2006).

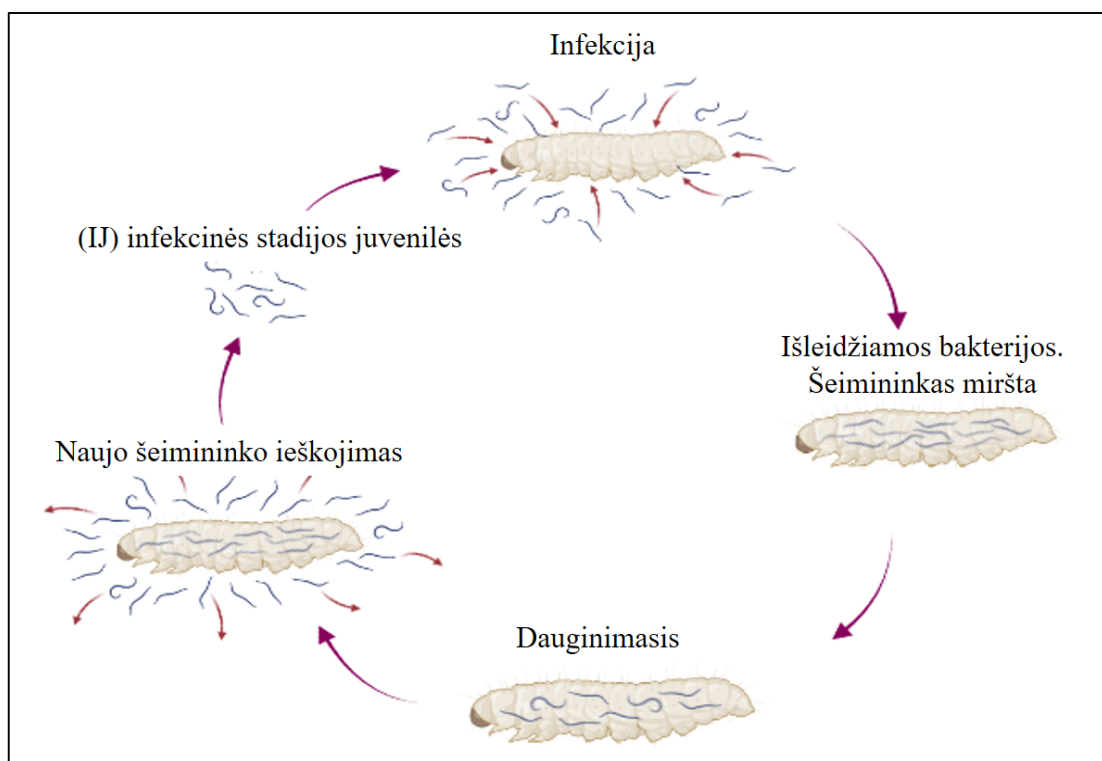


1 pav. (I) Entomopatogeninių nematodų, *Steinernema carpocapsae* infekuojančios juvenilės, (didinimas 20 x) (II) Entomopatogeninio nematodo, *Heterorhabditis floridensis* galvos skenuojanti elektroninė mikroskopija, pagal Nguyen ir kt., 2006

EPN yra veiksminga biologinės kontrolės priemonė nuo vabzdžių kenkėjų, priklausančių *Diptera*, *Coleoptera*, *Thysanoptera*, *Orthoptera*, *Lepidoptera* ir kitiems būriams (Sharmila ir kt., 2018), tačiau EPN yra saugūs žmonėms ir aplinkai (Zhang ir kt., 2022). Didesnis susidomėjimas tirti EPN atsirado dėl jų biologinės kontrolės potencialo, t. y. jų panaudojimo žemės ūkyje prieš vabzdžius kenkėjus, kadangi lyginant su cheminiais pesticidais, EPN nėra toksiški (Koppenhöfer ir kt., 2020) ir yra saugūs žmonėms bei aplinkai (Zhang ir kt., 2022). Per pastaruosius 20 metų buvo padaryta didelė pažanga EPN moksliniuose tyrimuose, didinant EPN, kaip biokontrolės priemonių efektyvumą ir pan. (Abd-Elgawad, 2023).

1.2. Gyvenimo ciklas

Vabzdžiai yra neatsiejama EPN gyvenimo dalis, kadangi nematodai minta vabzdžiais ir juose dauginasi. EPN gyvenimo ciklas susideda iš šešių gyvenimo stadijų: kiaušinėlio, keturių juvenilinių (J1, J2, J3 ir J4) ir suaugėlio (Kaya ir Gaugler, 1993) (2 pav.).



2 pav. Entomopatogeninių nematodų gyvenimo ciklas, pagal Forst ir Clarke, 2002

Trečios stadijos EPN juvenilės (J3) arba kitaip infekuojančios juvenilės (IJ) yra vienintelės, kurios nesimaitina, laisvai gyvena dirvožemyje bei ieško šeimininko (2 pav.) (Kaya ir Gaugler, 1993). IJ prasiskverbia į vabzdį šeimininką per burną, išangę arba per tarpsegmentinės kutikulės membranas, o tada patenka į hemocelį (Forst ir Clarke, 2002). Patekę į šeimininko vidų IJ išleidžia savo simbiotines bakterijas, kurios dauginasi vabzdžių

hemolimfoje. Bakterijos vaidina svarbų vaidmenį įveikiant šeimininko imunitetą, kadangi jos išskiria toksinus, kurie slopina šeimininko imuninę sistemą (Burnell ir Stock, 2000; Dillman ir kt., 2012). Užkrėstas šeimininkas paprastai miršta per 24 – 72 valandas nuo septicemijos ar toksemijos (Poinar, 1990). Po vabzdžio šeimininko mirties, visos kitos EPN stadijos vystosi vabzdyje, nematodai toliau maitinasi bakterijų suardytais šeimininko audiniais, bręsta ir dauginasi, kol išsenka maisto šaltinis. Naujai susiformavusios IJ palieka vabzdį ir pradeda ieškoti naujo vabzdžio šeimininko (Campbell ir kt., 2002).

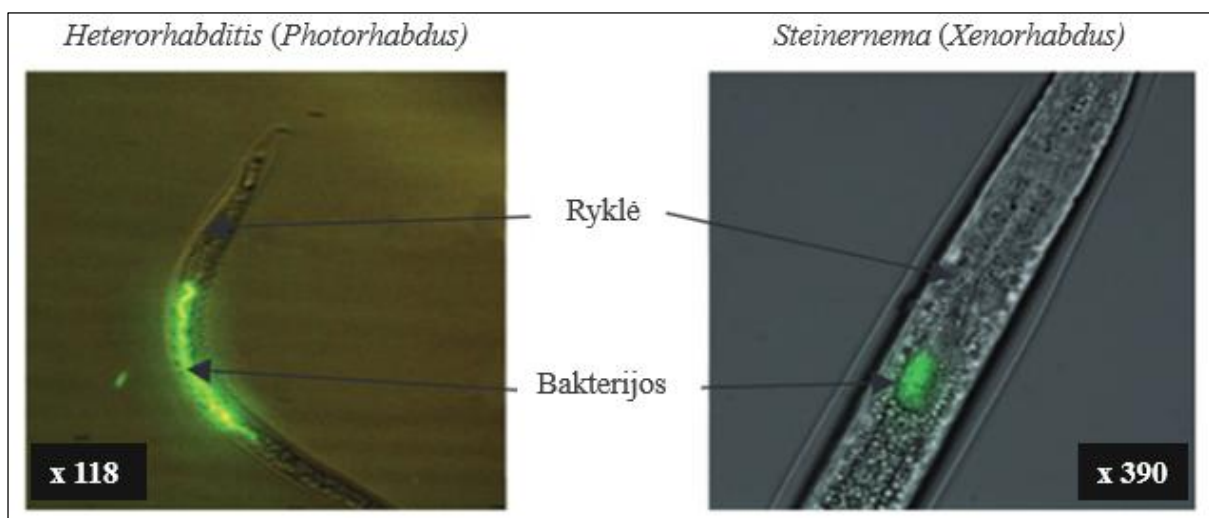
Visų EPN rūšių gyvenimo ciklas yra panašus. Vienintelis skirtumas tarp *Heterorhabditis* ir *Steinernema* EPN gyvenimo ciklą yra pirmoje kartoje. *Heterorhabditis* nematodų pirma karta išsivysto pasidauginus hermafroditams, o vėlesnės kartos individai išsivysto susikryžminus patinams ir patelėms (Glazer ir Lewis, 2000). *Steinernema* nematodų visos kartos susidaro lytinio (kryžminio) apvaisinimo būdu (išskyrus *S. hermaphroditum*) (Koppenhöfer ir kt., 2020).

1.3. Simbiozė su bakterijomis

EPN *Heterorhabditis* ir *Steinernema* kartu su bakterijomis *Xenorhabdus* ir *Photorhabdus* yra išplėtoję abipusišką simbiotinį ryšį. Svarbu paminėti, kad viena nematodų rūšis sudaro simbiozę su viena bakterijų rūšimi, t. y. *Photorhabdus* spp. simbiotinės bakterijos yra susijusios su *Heterorhabditis* spp., o *Xenorhabdus* spp. bakterijos yra susijusios su *Steinernema* spp. (Heungens ir kt., 2002; Chaston ir kt., 2013). Bakterinis simbiotas reikalingas šeimininkui nužudyti ir jo audiniams suvirškinti, taip sudarant tinkamas maistinių medžiagų sąlygas nematodų augimui ir vystymuisi (Burnell ir Stock, 2000). Simbiotinės bakterijos gamina antrinius metabolitus ir toksinus (Muangpat ir kt., 2020). Šie biologiškai aktyvūs junginiai turi citotoksinį, antimikrobinį, antiparazitinį ir insekticidinį poveikį. Vienintelis toksinų kompleksas, kuris buvo išsamiai ištirtas iš *Xenorhabdus* ir *Photorhabdus* bakterijų yra *Tc* (angl. *toxin complex*) (Brown ir kt., 2006). Šis toksinų kompleksas susideda iš maždaug dešimties polipeptidų. Šie polipeptidai yra įvairaus dydžio, svyruojant nuo 30 iki 200 kDa ir yra toksiški vabzdžiams. *Tc* veikia panašiai kaip *Bacillus thuringiensis* δ -endotoksinas. Pagrindinė šių toksinų funkcija yra naikinti epitelio ląsteles iš vidurinės vabzdžių žarnos bei pažeisti aktino citoskeletą. Kitas, mažiau aprašytas biologiškai aktyvūs junginys yra *Mcf* (angl. *makes caterpillars floppy*) genų produktas, kuris skatina hemocitų apoptozę vabzdžiuose (Brown ir kt., 2006). Antriniai metabolitai, kuriuos gamina simbiotinės bakterijos, taip pat slopina kitų bakterijų, grybelių ir protistų vystymąsi negyvo šeimininko hemolimfoje, kurioje

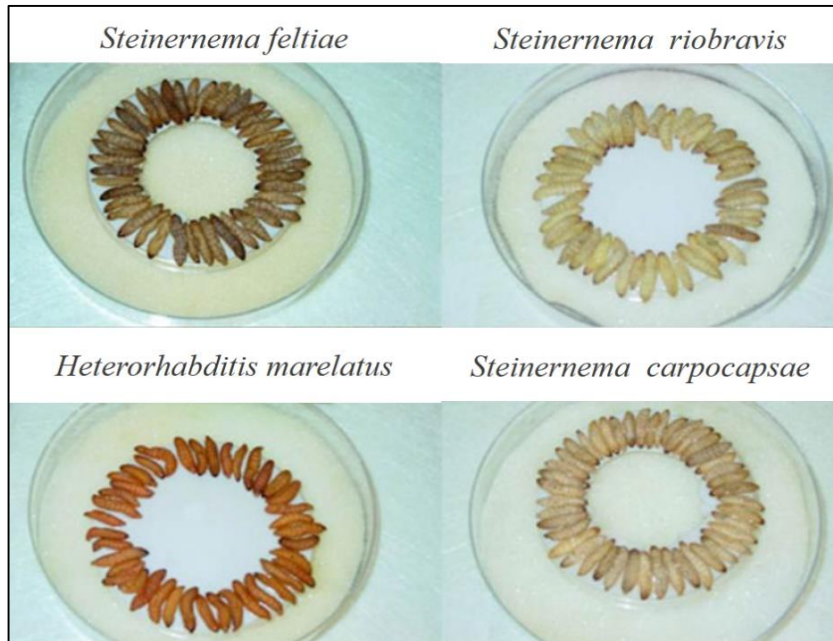
gausu maistinių medžiagų, taip sudarydami tinkamas sąlygas nematodams daugintis (Nurashikin-Khairuddin ir kt., 2022).

Svarbu paminėti, kad *Steinernema* genties nematodai perneša simbiotines bakterijas specializuotoje pūslelėje, kuri yra priekinėje jų žarnyno dalyje, kuomet *Heterorhabditis* genties nematodai neturi tokios specializuotos struktūros bei šios rūšies simbiotinės bakterijos randamos visame EPN žarnyne (3 pav.) (Goodrich-Blair ir Clarke, 2007; Sajnaga & Kazimierczak, 2020). Gamtoje simbiotinės EPN bakterijos gyvena tik EPN arba jų vabzdžių šeimininkų organizmuose ir negali išgyventi už jų ribų. EPN ir bakterijų sąveika yra specifinė, kadangi išgyvenimas ir dauginimasis šeimininke gali turėti įtakos ne tik EPN populiacijos gausumui, bet ir bakterijų gausumui (Brivio ir Mastore, 2018).



3 pav. *Photorhabdus* spp. ir *Xenorhabdus* spp. bakterijų lokalizacija entomopatogeninių nematodų žarnyne, pagal Goodrich-Blair ir Clarke, 2007

Taip pat EPN simbiotinės bakterijos sukelia įdomų reiškinį, t. y. keičia vabzdžio kutikulės spalvą (Kaya ir Gaugler, 1993). *Xenorhabdus* spp. bakterijos dažniausiai suteikia pilką bei žalsvą atspalvį infekuotam vabzdžiui, o *Photorhabdus* spp. bakterijos - rudą ir raudoną (Gerritsen ir kt., 1992) (4 pav.). *Photorhabdus* spp. yra vienintelės žinomos sausumos bioluminescencinės bakterijos (Peat ir Adams, 2008), o vabzdžių lavonai parausta nuo antrachinonų pigmentų gamybos (Richardson ir kt., 1988). Užkrėstų vabzdžių lavonų bioluminescencijos ir spalvos kitimo reikšmė yra nežinoma, tačiau tai yra reikšmingas bruožas, padedantis atskirti EPN gentis, kai jos yra šeimininko viduje (Abd-Elgawad, 2023).



4 pav. *Galleria mellonella* lervų spalva esant skirtingoms entomopatogeninių nematodų rūšių infekcijoms, pagal Tofangsazie ir kt., 2012

1.4. Ekologija

EPN išgyvenamumas bei paplitimas gali kisti priklausomai nuo (Sharmila ir kt., 2018) abiotinių veiksnių, tokių kaip dirvožemio pH, drėgmė, temperatūra, vibracija ir kt. bei biotinių veiksnių, tokių kaip konkurencija, tikslinių vabzdžių šeimininkų paieškos būdas ir pan. (Griffin ir kt., 1995).

EPN geriausiai juda dirvoje, kurios pH yra nuo keturių iki aštuonių, jie yra jautrūs užšalimui, aukštai temperatūrai, išdžiūvimui ir UV spinduliams.

Temperatūrą galima apibūdinti kaip pagrindinį aplinkos veiksni, kuris turi įtakos EPN išplitimui ir vystymuisi, tačiau įvairių EPN rūšių temperatūros optimumas skiriasi. Įdomu, kad skirtingose temperatūrose inkubuotų IJ elgsena gali skirtis, pavyzdžiui, cheminės medžiagos, kurios yra patrauklios žemesnėje temperatūroje inkubuotiems IJ, yra atbaidančios aukštesnėje temperatūroje inkubuotiems IJ ir atvirkščiai (Lee ir kt., 2016). Karščiui atsparesnės rūšys yra *S. glaseri* ir *H. indica*, o *H. megidis* ir *H. marelatus* yra labiau prisitaikiusios prie vėsesnės temperatūros (Sharmila ir kt., 2018).

Dirvožemio struktūra taip pat turi įtakos EPN išgyvenamumui (Koppenhöfer ir kt., 2020). EPN geriausiai juda smėlėtoje dirvoje, kadangi jie juda vandeniui tarp dirvožemio dalelių, o tarpai tarp smėlio dalelių yra patys optimaliausi nematodams judėti, nes yra panašūs į nematodų kūno skersmenį (Richardson ir kt., 1988). Sparčiausiai EPN išgyvenamumas mažėja moliniame dirvožemyje, nes molinis dirvožemis yra linkęs į prastą aeraciją (oro cirkuliaciją) ir

didelį vandens sulaikymą. EPN reikia pakankamos dirvožemio drėgmės išlikimui ir judėjimui, todėl per didelis kiekis drėgmės gali sukelti EPN deguonies trūkumą ir riboti judėjimą. Nematodų gyvybingumas labiausiai nukenčia dirvožemiui išdžiūvant staiga. Bet jei drėgmė mažėja palaipsniui, EPN gali prisitaikyti panaudojus anhidrobiozę – gebėjimą išdžiūti iki pusiausvyros būsenos ir pereiti į grįžtamo metabolizmo būseną, ši stadija dar kitaip vadinama Daurio stadiją (angl. *Dauer stage*) (Sharmila ir kt., 2018).

Vienas iš svarbiausių biotinių veiksnių - neigiamai EPN veikiančios sąveikos su kitais dirvožemio organizmais, kurios gali turėti įtakos EPN gebėjimui išgyventi, judėti dirvožemyje ir užkrėsti šeimininką (Helmberger ir kt., 2017). Daugybė nariuotakojų ir kitų bestuburių rūšių naikina IJ (pavyzdžiui, erkės, kolembolos, lėtūnai) arba EPN užkrėstus šeimininkus. Taip pat EPN konkuruoja su kitomis organizmų rūšimis (pavyzdžiui, bakterijomis, parazitiniiais grybais) dėl vabzdžių (Shapiro-Ilan ir kt., 2006). Tačiau konkurencija su kitais patogenais ne visada turi neigiamą poveikį EPN populiacijoms ir kai kuriais atvejais gali sukelti sinergetinį poveikį šeimininko mirtingumui be reikšmingo neigiamo poveikio EPN (Koppenhöfer ir kt., 2020).

Labai svarbu paminėti dar vieną svarbų EPN ekologijos aspektą - vabzdžio šeimininko ieškojimo būdą. EPN naudoja dvi pagrindines vabzdžių šeimininkų paieškos strategijas: pasalų (angl. *ambusher*) arba kruiserių (angl. *cruiser*) (Campbell ir Gaugler, 1997). Pirmajai strategijai priklausantys EPN, tokie kaip *S. carpocapsae*, tyko ir atakuoja judrius vabzdžius viršutiniame dirvožemio sluoksnyje. Jiems būdinga išskirtinė savybė - gebėjimas užsokti ant savo šeimininko, tai laikoma evoliucine adaptacija (Hallem ir kt., 2011). Antrajai strategijai priklausantys EPN, tokie kaip *S. kraussei* ir *H. bacteriophora* yra labai aktyvūs ir dažniausiai randami gilesniame dirvožemio sluoksnyje. Jie atakuoja mažiau judrius vabzdžius. Kai kurios nematodų rūšys, tokios kaip *S. feltiae* ir *S. riobrave*, priklausomai nuo vabzdžių šeimininkų rūšių ir dirvožemio tipo naudoja tarpinę (angl. *intermediate*) šeimininkų paieškos strategiją (pasalos ir kruiserių tipo derinį) (Campbell ir Gaugler, 1997).

1.5. *Steinernema* gentis

Steinernema gentis apima apie 100 žinomų rūšių, kurios skiriasi savo šeimininkų spektru ir specifiškumu (Bhat ir kt., 2020). Pavyzdžiui, *S. carpocapsae* gali užkrėsti daugiau nei 250 skirtingų vabzdžių rūšių, o kitos rūšys, tokios kaip *S. scapterisci* ir *S. scarabaei* užkrečia daug siauresnį rūšių spektrą (Chang ir kt., 2019). Svarbu paminėti, kad visus geografinius regionus, kuriuose aptikta *Steinernema* gentis, apima platus aplinkos temperatūrų ir buveinių spektras

(Edmunds ir kt., 2018). Šiuo metu komerciškai platinama tik keletas *Steinernema* rūšių, skirtų biologinei vabzdžių kenkėjų kontrolei. Tai tos rūšys, kurios užkrečia daug skirtingų vabzdžių rūšių, pavyzdžiui, *S. carpocapsae* ir *S. feltiae* (Labaude ir Griffin, 2018) arba infekuoja tikslines vabzdžių rūšis, pavyzdžiui, *S. kraussei* vynuoginį pjovėją (*Otiorrhynchus sulcatus*). Didžioji dalis *Steinernema* genties rūšių EPN naudoja pasalų strategiją šeimininko paieškai, todėl daugelis šių nematodų didžiąją laiko dalį praleidžia dirvos paviršiuje arba negiliuose dirvos sluoksniuose (Dara, 2019).

1.5.1. *S. carpocapsae*

1955 m. tuometinėje Čekoslovakijoje J. Weiseris išskyrė bei aprašė *S. carpocapsae* kaip *Neoplectana carpocapsae* (Poinar ir Grewal, 2012). Ši rūšis yra viena iš labiausiai paplitusių bei daugiausiai ištirtų EPN rūšių (Serra ir kt., 2019). *Steinernema carpocapsae* yra aptinkama įvairiose geografinėse vietose, įskaitant JAV, Argentiją, Australiją, Meksiką ir Europos vidutinio klimato zonas (Peters, 1996). *Steinernema carpocapsae* EPN aptinka bei užkrečia apie 250 vabzdžių šeimininkų, įskaitant daug svarbių dirvožemio kenkėjų, priklausančių *Coleoptera*, *Hymenoptera* ir *Lepidoptera* būriams (Peters ir kt., 2008; Serra ir kt., 2019).

1.5.2. *S. kraussei*

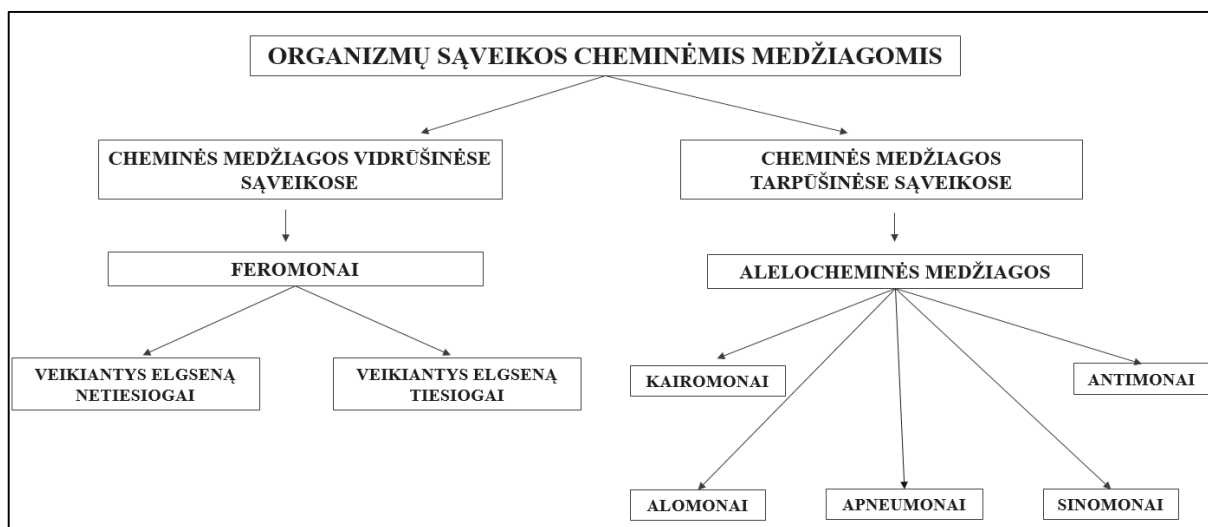
Pirmą kartą *S. kraussei* buvo išskirta Vokietijoje bei aprašyta 1923 metais G. Steiner kaip *Aplectana kraussei* (Poinar ir Grewal, 2012). Pakartotinai ši rūšis aprašyta Z. Mráček 1994 metais tuometinėje Čekoslovakijoje. Vėliau *S. kraussei* rūšis buvo užfiksuota ir kitose Europos šalyse: Olandijoje, Didžiojoje Britanijoje (1995), Šveicarijoje (1996), Ispanijoje (1996) ir Šiaurės Amerikoje (1999) (Tumialis ir kt., 2014).

Steinernema kraussei yra holarktinė (zoogeografinė sritis apimanti nearktę bei palearktinę dalis) rūšis. Ši rūšis dažniausiai randama silpnai rūgščiaame dirvožemyje, augalais apaugusiose vietovėse bei spygliuočių miškuose (Tumialis ir kt., 2014). Natūralioje aplinkoje dažniausiai sutinkamas *S. kraussei* šeimininkas - vynuoginio pjovėjo (*O. sulcatus*) lervos. *Steinernema kraussei* išskirtinumas – gebėjimas užkrėsti šeimininką žemoje temperatūroje. Tai yra vienintelė žinoma EPN rūšis, kuri yra aktyvi žemesnėje nei 12 °C temperatūroje (Ansari ir kt., 2009). Efektyvumas žemoje temperatūroje laikomas privalumu, kuomet EPN naudojami atvirame lauke, kadangi temperatūra, be UV spinduliuotės ir drėgmės, yra svarbiausias nematodus ribojantis veiksnys (Gokce ir kt., 2013).

1.6. Cheminės medžiagos EPN ekologijoje

Nepaisant termorecepcijos, mechanorecepcijos ir pan., EPN IJ chemorecepcija yra vienas kertinių veiksnių, padedančių IJ sėkmingai daugintis bei vystytis chemiškai sudėtingoje dirvožemio aplinkoje, t. y. judėti link ir sėkmingai užkrėsti tinkamą vabzdį šeimininką (Dillman ir Stenberg, 2012; Gaffke ir kt., 2023).

Sąveikos cheminiais junginiais gali būti skirstomos į vidurūšines (intraspecifines) ir tarprūšines (interspecifines) (5 pav.) (Būda, 2006). Cheminės medžiagos, kuriomis informacija perduodama tarp organizmų, dažniausiai yra organizmų metabolitai, t. y. tam tikrų ląstelėse vykstančių reakcijų pašaliniai produktai (Kong ir kt., 2019).



5 pav. Organizmų sąveikų cheminėmis medžiagomis skirstymas, pagal Byers, 1991 ir Būda, 2006

Vidurūšinės sąveikos vyksta tarp tos pačios EPN rūšies individų. Cheminės medžiagos, kuriomis informacija perduodama tarp vienos rūšies individų yra vadinamos feromonais. Feromonai gali veikti elgseną tiesiogiai arba netiesiogiai (Būda, 2006). Netiesiogiai elgseną veikiantys feromonai sukelia lėtą elgsenos pokytį (informaciją gaunančio organizmo), veikdami organizmo fiziologinę būklę (pavyzdžiui, sukelia ritimąsi iš kiaušinėlių), o tiesiogiai elgseną veikiantys feromonai sukelia greitą elgsenos pokytį (pavyzdžiui, lytiniai feromonai sukelia lytinį dauginimąsi) (Byers, 1991; Būda, 2006).

Cheminės medžiagos, kuriomis informacija perduodama tarp skirtingų rūšių organizmų yra vadinamos alelocheminėmis. Alelocheminės medžiagos skirstomos į penkias grupes pagal tai, kuriam organizmui sąveika yra naudinga: kairomonai - sąveika naudinga informacijos gavėjui; alomonai - sąveika naudinga informacijos siuntėjui; sinomonai - sąveika naudinga informacijos gavėjui ir siuntėjui; antimonai - sąveika nenaudinga nei siuntėjui nei gavėjui; o

apneumonai apibūdinami, kaip negyvo organizmo išskiriamos cheminės medžiagos, kurios yra naudingos informacijos gavėjui (5 pav.) (Būda, 2006).

Infocheminiai junginiai gali sukelti chemotaksį, kuomet IJ nukreipia savo judėjimą pagal tam tikras savo aplinkoje esančias chemines medžiagas arba niktaciją, kuomet EPN pakelia savo kūną nuo paviršiaus ir atsistoja ant uodegos, kad galėtų lengviau pasiekti šeimininką (Ishibashi ir Takii, 1993; Dunn ir kt., 2004). Svarbu paminėti, kad EPN svarbūs ne tik atraktantai ieškant tinkamų vabzdžių šeimininkų, bet ir repelentai norint išvengti netinkamų objektų dirvožemio aplinkoje (Hummadi ir kt., 2021).

Yra žinomi keli pagrindiniai cheminių junginių šaltiniai, kurie yra svarbūs EPN ieškant tinkamų vabzdžių šeimininkų. Vienas dažniausių yra anglies dioksidas, kurį išskiria dauguma gyvų organizmų, įskaitant augalus ir vabzdžius, kurie parodo EPN, kad netoliese gali būti vabzdžiai šeimininkai (Zhang ir kt., 2021). Kiti cheminių junginių šaltiniai, padedantys nematodams rasti vabzdžius šeimininkus, yra pačių vabzdžių šeimininkų skleidžiami junginiai, jų pažeistų augalų išskiriami lakieji junginiai, kurie parodo, kad netoliese gali būti vabzdžiai bei tie cheminiai junginiai, kuriuos išskiria jau EPN užkrėsti vabzdžiai (Zhang ir kt., 2021).

1.6.1. Vidrūšinės *Steinernema* sąveikos

Nematodų feromonai - askarozidai yra svarbūs EPN vystymuisi ir elgesiui (Kaplan ir kt., 2012). Askarozidus sudaro centrinis askarilozės cukrus su kintama lipidų šonine grandine. Tiek lipidų grandinė, tiek askarilozės cukrus gali turėti modifikacijų. Iš daugiau nei 20 skirtingų dirvožemio nematodų buvo atrasta ir identifikuota apie 200 askarozidų, tačiau svarbu paminėti, kad skirtingi askarozidai, askarozidų deriniai arba skirtingos tų pačių askarozidų koncentracijos gali turėti skirtingą poveikį nematodams (Yang ir kt., 2023).

Vienas iš daugiausiai ištirtų EPN feromonų yra ascr#9. Šis askarozidas yra randamas EPN vabzdžių šeimininkų lavonuose, užkrėstuose skirtingomis EPN rūšimis. Ascr#9 yra struktūrinis ascr#11 analogas. Abu šie feromonai sukelia IJ išėjimą/dispersiją iš vabzdžių šeimininkų lavonų, o tai rodo, kad EPN gali atpažinti vienas kito sklaidos signalus iš šeimininkų lavonų (Kaplan ir kt., 2020).

Yra žinoma, kad EPN giminingos, dirvožemyje gyvenančios nematodų ekologinės grupės - laisvai dirvožemyje gyvenančių nematodų (angl. *free living*) atskiri askrozidai ar jų mišiniai reguliuoja poravimosi, agregacijos elgesį, veikia atraktyviai ar repelentiškai bei sukelia dispersiją (sklaidą) (Kaplan ir kt., 2020). Pavyzdžiui ascr#2, ascr#3, ascr#4 ir ascr#8

reguliuoja laisvai dirvožemyje gyvenančių nematodų vystymąsi bei veikia kaip lytiniai feromonai, kurie pritraukia priešingą lytį (Yang ir kt., 2023).

1.6.2. *Steinernema* sąveikos su augalais

Tyrimai parodė, kad augalų išskiriami cheminiai junginiai, priklausantys aldehidų, alkoholių, ketonų, terpenų ir kt. junginių grupėms, veikia EPN arba kaip atraktantai, arba kaip repelentai (Zhang ir kt., 2021) (1; 2 lentelės). Vabzdžių pažeistos augalų šaknys išskiria specifinį/kitokį cheminių junginių mišinį, palyginus su nepažeistais augalais (Rizaludin ir kt., 2021).

Šiai dienai iš viso yra žinoma 14 cheminių junginių, išskirtų iš devynių augalų rūšių, kurie veikia atraktyviai *S. carpocapsae* bei 12 cheminių junginių, išskirtų iš septynių augalų rūšių, kurie veikia *S. carpocapsae* repelentiškai (1 lentelė) (Zhang ir kt., 2021). Svarbu paminėti, kad vieno augalo rūšies, pavyzdžiui bulvės *Solanum tuberosum*, išskiriami vieni cheminiai junginiai, gali būti patrauklūs *S. carpocapsae* (oktanas, nonanas ir 1,2,4-trimetilbenzenas), o kiti (2-etil-1-heksanolis) atbaidantys (1 lentelė) (Zhang ir kt., 2021). O į morkos *Daucus carota* išskiriamą bornilo acetatą (1 lentelė) EPN reakcija priklauso nuo šios cheminės medžiagos koncentracijos (t. y. ši medžiaga gali būti arba atraktyvi, arba repelentiška) (Zhang ir kt., 2021; Von Reuss ir Machado, 2022). Nepaisant to, kad 2-nononą ir heptano rūgštį išskiria augalai, nėra tiksliai identifikuota, kurios augalų rūšys šiuos junginius išskiria.

1 lentelė. Augalinės kilmės cheminės medžiagos, veikiančios *Steinernema carpocapsae* elgseną, pagal Hallem ir kt., 2011; Zhang ir kt., 2021

	Cheminis junginys	Augalo rūšis
ATRAKTANTAI	Oktanolis	Raudonėlis (<i>Origanum sipyleum</i>)
	Nonanolis	Vaistinis augalas (<i>Curcuma amada</i>)
	(<i>E</i>)- β -K-ariofilenas	Kukurūzai (<i>Zea mays</i>)
	Linalolis	
	Nonanalis	Bulvės (<i>Solanum tuberosum</i>)
	Oktanolas	
	1,2,4-Trimetilbenzenas	
	2-nonanonas	nežinoma
	Bornilo acetatas	Morkos (<i>Daucus carota</i>)
	Pentanolis	Trūkažolės (<i>Cichorium endivia</i>)
	Ocilo acetatas	Sidabrinis sausmedis (<i>Lonicera japonica</i>)
	Heptanolis	Siauralapis raibsteglis (<i>Aspalathus linearis</i>)
	Heksanolis	Kanapinis kemeras (<i>Eupatorium cannabinum</i>)
REPELENTAI	Terpinolenas	Morkos (<i>D. carota</i>)
	α -Pinenas	
	2-Etilheksanolis	
	Bornilo acetatas	
	2-Etil-1-heksanolis	Bulvės (<i>S. tuberosum</i>)
	Heksano rūgštis	Alyvmedis (<i>Olea europaea</i>)
	Acto rūgštis	Obuoliai (<i>Malus domestica</i>)
	Heptano rūgštis	nežinoma
	Limonenas	Iš augalų pavyzdžiui, citrinžolės
	Heksanas	Obuoliai (<i>Malus domestica</i>)
	Heksadekano rūgštis	Saulėgražos (<i>Helianthus annuus</i>)
	3-Karenas	Aromatinė ksilopija (<i>Xylopija aromatica</i>)

Šiuo metu yra atlikta labai mažai mokslinių tyrimų, susijusių su cheminių junginių poveikiu *S. kraussei*. Yra iširtas tik trijų, žemės ūkyje svarbių, augalų rūšių (*Brassica napus*, *D. carota*, *S. tuberosum*) išskiriamų cheminių junginių poveikis *S. kraussei* (2 lentelė) (Zhang ir kt., 2021). Tik vienas cheminis junginys, išskiriamas *S. tuberosum* - dekanolas veikia atraktyviai *S. kraussei*, o devyni cheminiai junginiai, išskiriami *B. napus* bei *D. carota* veikia *S. kraussei* repelentiškai (Zhang ir kt., 2021).

2 lentelė. Augalinės kilmės cheminės medžiagos, veikiančios *Steinernema kraussei* elgseną, pagal Zhang ir kt., 2021

ATRAKTANTAS	Cheminis junginys	Augalo rūšis
	Dekanas	Bulvės (<i>Solanum tuberosum</i>)
REPELENTAI	Dimetil sulfidas	Juodosios garstyčios (<i>Brassica napus</i>)
	Dimetil disulfidas	
	Dimetil trisulfidas	
	Alilo izotiocianatas	
	Feniletilo izotiocianatas	
	Benzonitrilis	
	2,4-Di-tret-butilfenolis	Morkos (<i>Daucus carota</i>)
	α -Pinenas	
	Terpinolenas	

1.6.3. *Steinernema* sąveikos su vabzdžiais šeimininkais

Vabzdžių šeimininkų išskiriami cheminiai junginiai padeda EPN nustatyti jų buvimo vietą (Turlings ir kt., 1990; Rasmann ir kt., 2005). Vabzdžiai nuolat išskiria chemines medžiagas, tokias kaip feromonus, frasą (išmatas) ir kt. į savo aplinką (Jagodič ir kt., 2019). Įprasti vabzdžių šeimininkų signalai, sukeltys chemotaksį ir/arba EPN niktaciją yra cheminės medžiagos, tokios kaip biologiniai šalinimo produktai, pavyzdžiui šlapimo rūgštis, karbamidas, amoniakas ir kt. (Zhang ir kt., 2021).

Tyrimai rodo, kad šešių rūšių vabzdžių šeimininkų išskiriamos devynios cheminės medžiagos yra atraktyvios *S. carpocapsae* (3 lentelė) (Zhang ir kt., 2019). Repelentiškai *S. carpocapsae* veikia heksanas ir 2,3-butandionas, šiuos cheminius junginius išskiriamų vabzdžių rūšys nenustatytos (Zhang ir kt., 2021).

3 lentelė. Vabzdžių išskiriami cheminiai junginiai, veikiantys *Steinernema carpocapsae* elgseną, pagal Zhang ir kt., 2021

	Cheminis junginys	Vabzdžių rūšis
ATRAKTANTAI	2-Propanonas	Vėdarėlis (<i>Armadillidium vulgare</i>)
	Tetradekanas	
	Tetrahidrofuranas	<i>Euborellia femoralis</i>
	α -Pinenas	Vaškinė kandis (<i>Galleria mellonella</i>)
	4-Metilfenolis	<i>Scapteriscus borellii</i>
	1,4-Benzochinonas	
	Heksanolis	Vaškinė kandis (<i>G.mellonella</i>)
	Anglies dioksidas	Didysis milčius (<i>Tenebrio molitor</i>)
	4,5-Dimetiltiazolas	<i>Zoofobus</i> (<i>Zophobas morio</i>)
	REPELENTAI	Heksanas
2,3-Butandionas		

Vabzdžių šeimininkų išskiriamų cheminių junginių poveikis *S. kraussei* nėra tirtas, o šių tyrimų trūkumas rodo poreikį atlikti tyrimus, norint suprasti šios nematodų rūšies chemoekologines sąveikas.

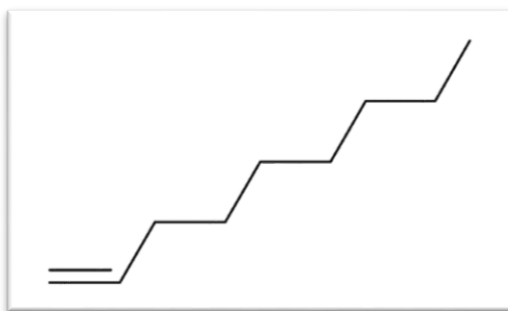
1.6.4. *Steinernema* sąveikos su EPN užkrėstais vabzdžiais

Vabzdžių-EPN-bakterijų kompleksas (t. y. EPN užkrėstas vabzdys) taip pat išskiria cheminius junginius, kurie turi įtakos kitų EPN elgsenai (Zhang ir kt., 2021). Užkrėsto šeimininko išskiriami cheminiai junginiai skiriasi priklausomai nuo infekcijoje dalyvaujančių EPN, bakterinių simbiotų ir vabzdžių rūšių (Grunseich ir kt., 2021).

Vadovaujantis užkrėstų šeimininkų išskiriamomis cheminėmis medžiagomis EPN gali atskirti sveikus ir užsikrėtusius šeimininkus ir net šeimininkus, užkrėstus specifiniais ar heterospecifiniais EPN (Baiocchi ir kt., 2017). Šiai dienai ištirti bei aprašyti tik keli užkrėstų vabzdžių junginiai, kurių poveikis EPN yra ištirtas. Tai prenolis (3-metil-2-buten-1-olis), 3-hidroksi-2-butanonas (AMC) (Kin ir kt., 2019; Baiocchi ir kt., 2017) butilintas hidroksitoluenas (BHT) (Zhang ir kt., 2019) ir dimetildisulfidas (DMDS) (Fu ir kt., 2021). Šie junginiai susiję su vėlyvosios infekcijos atpažinimo ženklais. Įdomu tai, kad visi šie junginiai yra repelentiški, išskyrus BTH, kuris yra atraktyvus IJ ir sveikiems vabzdžiams, o tai galėtų padidinti IJ tikimybę užkrėsti naujus vabzdžius (Zhang ir kt., 2019). Iš minėtų junginių *S. carpocapsae* reakcija buvo tirta į prenoį (Kin ir kt., 2019, Baiocchi ir kt., 2017) ir DMDS (Fu ir kt., 2021), o *S. kraussei* nei į vieną iš jų.

1.7. 1-Nonenas

Kaip buvo minėta anksčiau, EPN užkrėstų vabzdžių išskiriami lakieji mišiniai skiriasi priklausomai nuo infekcijoje dalyvaujančių EPN, bakterinių simbiotų ir vabzdžių rūšių ir retai kada persidengia (Zhang ir kt., 2019). Tačiau neseniai buvo nustatyta, kad dvi skirtingos vabzdžių rūšys (*Galleria mellonella* ir *Acalymma vittatum*), infekuotos trimis skirtingomis EPN rūšimis (*H. bacteriophora*, *S. riobrave* ir *S. carpocapsae*) išskiria 25 junginius tarp kurių yra vienas bendras visoms infekcijoms junginys - 1-nonenas (6 pav.) (Grunseich ir kt., 2021). 1-Nonenas yra alkenas, turintis vieną dvigubą ryšį.



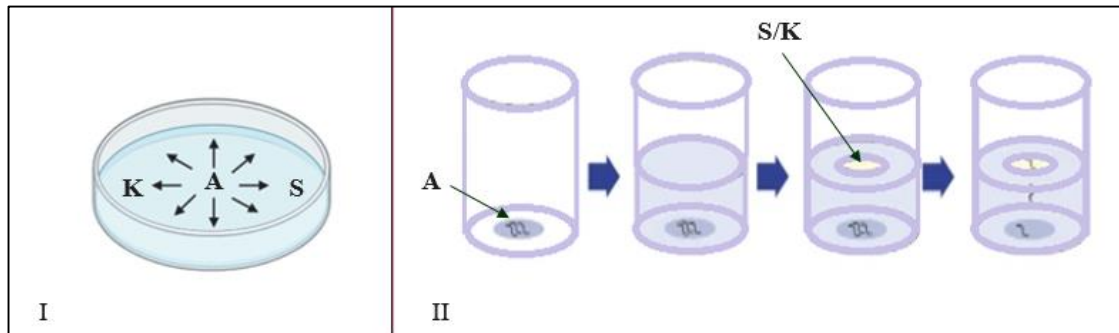
6 pav. 1-Nonenas

1.8. Metodai EPN chemoekologinėms sąveikoms tirti

EPN natūraliai gyvena dirvožemyje bei juda vandeniu tarp dirvožemio dalelių (Richardson ir kt., 1988; Lewis ir kt., 2006;), todėl norint tirti nematodų elgseną, šią sąlygą būtina užtikrinti. Įprastai EPN elgsena tiriama: (1) ant terpės/terpėje vandens pagrindu (nesukelia stebėjimo, matavimo ir kt. sunkumų) (Baiocchi ir kt., 2020), (2) dirvožemyje (geriausiai imituoja natūralią EPN aplinką).

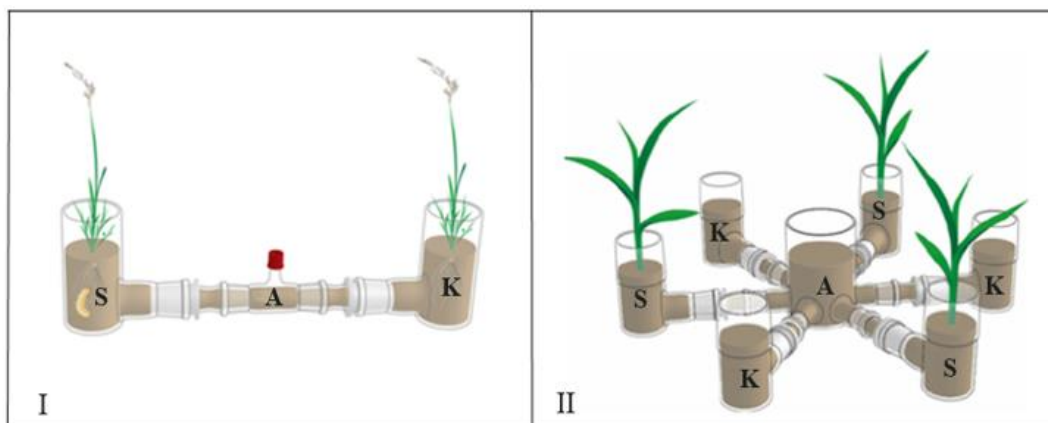
Biotestai ant terpės ar terpėse vandens pagrindu, pavyzdžiui, ant agarų ar pluroniname gelyje dažniausiai atliekami Petri lėkštelėse arba šulinėliuose. Šio tipo biotestai dažniau pasirenkami, kadangi IJ yra lengvai stebimi bei gali būti tiksliai kiekybiškai įvertinami (7 pav.) (Williamson ir Čepulytė, 2017; Shivakumara ir kt., 2018). Pluroninis gelis (PF-127) yra hidrogelis, pagamintas iš hidrofilinių polimerų, galinčių sulaukyti didelius vandens kiekius ir sudaryti trimačius polimerinius tinklus. Kaip ir agaras, ši terpė yra skaidri, todėl galima lengvai stebėti IJ judėjimą. Pluroniniame gelyje IJ juda trimatėje erdvėje, panašiai kaip dirvožemio biotestuose (Chunjie ir kt., 2019), kai tuo tarpu ant agarų nematodai juda dvimatėje erdvėje.

Svarbu paminėti, kad lyginant pluroninį gelį su agaru terpę, pluroninis gelis yra žymiai brangesnis.



7 pav. Entomopatogeninių nematodų elgsenai tirti skirti biotestai ant terpės (I) ir tepėje (II) vandens pagrindu. (I) nematodai užnešami (A) ant terpės vienodu atstumu tarp kontrolės (K) ir stimulo (S). (II) Nematodai užnešami (A) ant indo dugno, užpilami pluroniniu geliu ir ant gelio užnešamas stimulus arba kontrolė (S/K), pagal Baiocchi ir kt., 2020; Lillis ir kt., 2023

Biotestai dirvožemyje. Smėlis yra natūralų dirvožemį imituojantis substratas, todėl leidžia ištirti nematodų elgseną tokiomis sąlygomis, kurios labai panašios į jų natūralią buveinę (Baiocchi ir kt., 2020). EPN biotestai dirvožemyje dažniausiai vykdomi naudojant specialiai sukonstruotus įrenginius, pavyzdžiui, įvairaus ilgio vamzdelius, o kartais ir sudėtingesnius įrenginius, tokius kaip olfaktometriai su skirtingų atšakų skaičiumi (pavyzdžiui, dviejų, keturių ar šešių) pripildytus dirvožemiu (smėliu). Naudojant kelių atšakų olfaktometrus EPN suteikiama galimybė rinktis ne tik vieną stimulą, bet ir keletą stimulų iš karto (8 pav.) (Turlings ir kt., 2012; Zhang ir kt., 2019; Grunseich ir kt., 2021).



8 pav. Olfaktometriai, skirti tirti entomopatogeninių nematodų elgseną. Nematodai užnešami ant smėlio įrenginio viduryje (A) (I) nematodams suteikiama galimybė rinktis tarp stimulo (S) ir kontrolės (K). (II) Nematodams suteikiama galimybė rinktis tarp trijų stimulų (S) ir trijų kontrolių (K), pagal Turlings ir kt., 2012, Kergunteuil ir kt., 2018

Svarbu paminėti, kad atliekant biotestus dirvožemyje yra susiduriama su iššūkiais, tokiais kaip apsunkintas EPN stebėjimas, taip pat prisideda papildomas etapas - EPN

išskyrimas iš smėlio. Dažniausiai nematodams išskirti iš smėlio naudojamas Baermann piltuvėlių metodas, kai smėlis su nematodais dedamas ant filtravimo popieriaus į piltuvėlį, kurio galas yra užspaustas spaustuku. Tada į piltuvėlį įpilamas vanduo taip, kad apsemtų smėlį su nematodais. Po ≥ 12 val. nematodai dėl gravitacijos nusėda ties spaustuku, jį atleidus nematodai išleidžiami į indą ir suskaičiuojami (Viglierchio ir Schmitt, 1983). Atliekant biotestus smėlyje, tyrimų tikslumas labai priklauso nuo tyrėjų gebėjimo išskirti visus IJ iš dirvožemio, be to tai daug laiko reikalaujantis procesas (Baiocchi ir kt., 2020).

1.9. EPN svarba (panaudojimas žemės ūkyje)

Pirmą kartą, kaip biologinės kontrolės priemonė, EPN (*N. glaseri*) buvo panaudoti 1930 m., kuomet R. W. Glaseriui pavyko pakankamai padauginti nematodų bei panaudoti juos lauko sąlygomis prieš Japoninį vabalą (*Popillia japonica*) (Glaser ir Fox, 1930). Tačiau tai, kas galėjo būti EPN, kaip biologinės kontrolės judėjimo pradžia, neįvyko dėl vyraujančios pesticidų sėkmės aptariamam laikotarpiu. Pakartotinas susidomėjimas EPN, kaip biologinės kontrolės priemonės iškilo septintajame dešimtmetyje, kai buvo pripažintas galimas cheminių pesticidų žalingas poveikis aplinkai (Zyl ir Malan, 2014). EPN naudojimas biologinėje kontrolėje tradiciškai buvo siejamas su dirvožemyje gyvenančių vabzdžių kenkėjų populiacijų mažinimu, tačiau pastarųjų dviejų dešimtmečių tyrimų rezultatai rodo, kad jie taip pat gali kontroliuoti antžeminius vabzdžius kenkėjus, tačiau tik tam tikromis sąlygomis, kurios užtikrintų EPN išgyvenamumą, ypač palaikant drėgmę, kad nematodai iš karto nežiūtų (Kallali ir kt., 2024).

Šiai dienai EPN yra laikomi išskirtinai saugia priemone biologinėje kontrolėje prieš vabzdžius kenkėjus, kadangi jie nekelia jokio pavojaus aplinkai, yra saugūs netikslinių organizmų bei augalų atžvilgiu, o tuo pačiu ir žmogui (Flores ir kt., 2021). Kelios EPN rūšys, tokios kaip *S. carpocapsae*, *S. feltiae*, *S. scapterisci*, *S. glaseri*, *S. riobrave* ir *H. bacteriophora* yra masiškai auginamos ir taikomos vabzdžių kenkėjų kontrolei visame pasaulyje (Zyl ir Malan, 2014). EPN yra kultivuojami naudojant *in vivo* arba *in vitro* technologijas. *In vivo* technologija apima imlių EPN vabzdžių užkrėtimą norima EPN rūšimi, tačiau, kai prireikia daugiau EPN, gamyba *in vitro* yra praktiškesnė, nes fermentacijos būdu, galima efektyviai padauginti daug didesnę IJ skaičių. EPN dauginimas *in vitro* pagrįstas nematodų įvedimu į gryną jų simbiotinių bakterijų kultūrą maistinėje terpėje, dideliuose fermentacijos rezervuaruose (Smart, 1995; Shapiro-Ilan ir kt., 2006).

Svarbu paminėti, kad yra būtina tobulinti esamą EPN panaudojimo praktiką prieš vabzdžius kenkėjus, kad pasiekti didesnę vabzdžių kenkėjų užkrečiamumo lygį bei pasiekti tokį

efektyvumą, kuris būtų didesnis už cheminius pesticidus. Nepaisant to, kad EPN jau plačiai taikomi kovai su ekonomiškai svarbiais vabzdžiai kenkėjais, geresnis EPN chemoekologinių sąveikų pažinimas padėtų EPN efektyviau taikyti kovai su šiais kenkėjais (Zhang ir kt., 2021).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

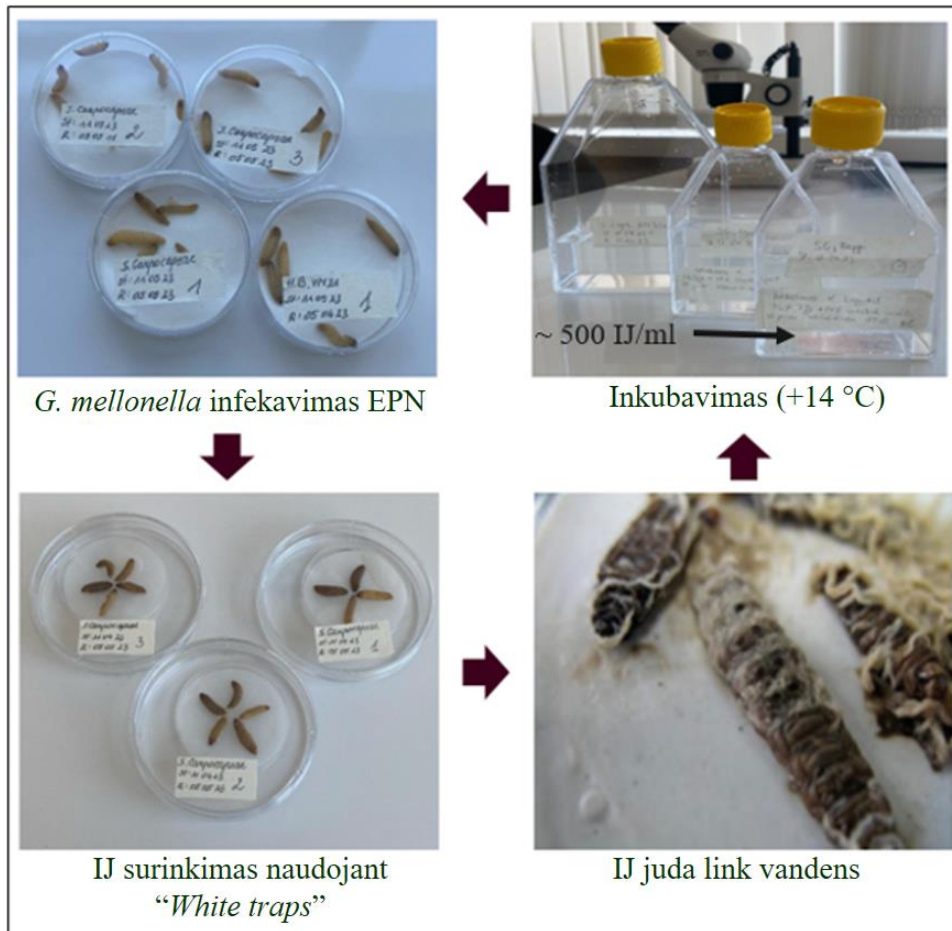
2.1. Vabzdžio *Galleria mellonella* dauginimas ir auginimas

Galleria mellonella (Lepidoptera: Pyralidae) vaškinės kandies lervos yra plačiai naudojamos kaip modelinis organizmas EPN kultūroms dauginti. Šios kandys yra bičių šeimų kenkėjai, kurių EPN neinfekuoja natūralioje aplinkoje. Šių lervų naudojimo EPN dauginimui privalumai yra didelis lervų jautrumas EPN ir lengvas auginimas (Kotchofa ir Baimey, 2019). Pradinė *G. mellonella* kultūra buvo gauta iš dr. Raquel Campos-Herrera (*Institute of Grapevine and Wine Sciences*, Ispanija). *Galleria mellonella* laboratorinėmis sąlygomis buvo auginama ir dauginama kambario temperatūroje (21 °C) ant natūralių bičių korių penkių litrų stikliniuose induose. EPN auginimui ir dauginimui buvo naudojamos paskutinės stadijos lervos, kurios buvo išrenkamos ir laikomos orui pralaidžiuose plastikinėse dėžutėse su medžio drožlėmis, 12 °C iki panaudojimo.

2.2. Entomopatogeninių nematodų dauginimas ir inkubavimas

Steinernema carpocapsae IJ buvo įsigyti iš Koppert, Nyderlandai, o *S. kraussei* IJ iš Basf, UK. EPN auginimui ir dauginimui buvo naudojamos penkios paskutinio ūgio *G. mellonella* lervos, kurios buvo dedamos ant filtravimo popierėlio, įdėto į plastikinę 55 mm skersmens Petri lėkštelę. Ant kiekvienos *G. mellonella* lervos buvo užlašinamas dejonizuotas vanduo su ~300 IJ (9 pav.). Petri lėkštelės buvo atitinkamai pažymimos, t. y. užrašoma EPN rūšis, užkrėtimo data ir lėkštelės numeris. Lėkštelė buvo inkubuojama septynias dienas, kambario temperatūroje (21 °C), tamsoje. Po septynių dienų, IJ surinkimui buvo naudojamos nematodų gaudyklės vandens pagrindu (angl. *White traps*) (White, 1927), nes dėl teigiamo hidrotaksio pasibaigus maisto šaltiniui (pilnai IJ išekspluotavus vabzdį) IJ palieka vabzdį ir juda link vandens. Tam, *G. mellonella* lervos buvo sudedamos žvaigždute ant filtravimo popierėlio (9 pav.) į 55 mm skersmens Petri lėkštelę. Ši Petri lėkštelė buvo dedama į kitą 90 mm skersmens Petri lėkštelę, į kurią buvo įpilami septyni mililitrai dejonizuoto vandens (į kurį vėliau numigrudavo IJ). Šios lėkštelės buvo etiketuojamos: užrašoma EPN rūšis, užkrėtimo data, *G. mellonella* perdėjimo į *White traps* data bei lėkštelės numeris. Lėkštelės buvo inkubuojamos kambario temperatūroje (21 °C), tamsoje. Po septynių dienų nematodai, numigravę į vandenį, pipetės pagalba buvo surenkami. Po to nematodai buvo tris kartus praplauti sedimentacijos būdu, t. y. dejonizuotas vanduo su IJ buvo supilamas į atskirą 50 mL stiklinėlę, po ~15 min. IJ nusėdavo indo dugne, o vanduo buvo atsargiai nupilamas (kad dugne liktų nematodai) ir užpilamas

švari, kambario temperatūros (21 °C) dejonizuotu vandeniu. Šis veiksmas buvo kartojamas tris kartus, kol vanduo tapo visiškai švarus. Po to IJ suspensija buvo supilama į audinių kultūrų indus (250 mL) (9 pav.). Suspensijos koncentracija buvo ~500 IJ/mL. IJ suspensija buvo inkubuojama 14 °C iki 21 dienos (panaudojimo eksperimentuose), indą pavertus horizontaliai geresnei areacijai.



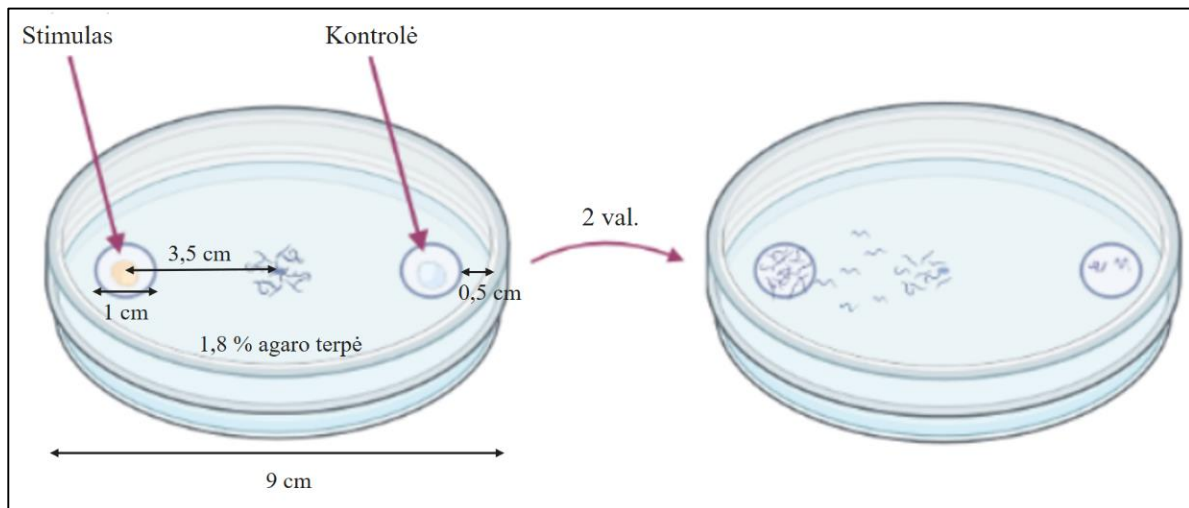
9 pav. Entomopatogeninių nematodų laboratorinių kultūrų palaikymas

2.3. Tyrime naudotų cheminių junginių paruošimas

Kadangi 1-nonenas netirpsta vandenyje, bet tirpsta etanolyje, pirmiausiai buvo tiriama *S. carpocapsae* ir *S. kraussei* IJ reakciją į etanolį (96 %, Vilniaus degtinė, Lietuva). Etanolis buvo skiedžiamas dejonizuotu vandeniu dešimt ir 100 kartų. 1-Noneno (96 %, Sigma Aldrichas, JAV) 1 M, 500 mM, 200 mM, 20 mM, 2 mM, 200 μM, 20 μM, 2 μM, 0,2 μM ir 0,02 μM koncentracijos buvo paruoštos etanolyje (neskiestame). Etanolio, ir 1-noneno tirpalai buvo laikomi 4 °C, tamsaus stiklo buteliukuose (2 mL), apsuktuose parafilmu (kad mažinti garavimą) iki naudojimo. Šviežios etanolio ir 1-noneno koncentracijos buvo paruošiamos kas dvi savaites.

2.4. Dviejų pasirinkimų elgesio testas

Siekiant įvertinti *S. carpocapsae* ir *S. kraussei* IJ reakciją į cheminius stimulus nematodų elgsena buvo tiriama atliekant dviejų pasirinkimų elgesio testus ant agaro terpės. Testai buvo atliekami iš anksto paruoštuose 90 mm skersmens Petri lėkštelėse (kurios buvo tolygiai užpildytos ~15 mL 1,8 % agaro (Agar-Agar, Kobe I, Grida) ir laikomos 4 °C temperatūroje). Prieš biotestų atlikimą Petri lėkštelės su agaru buvo laikomos traukos spintoje, kambario temperatūroje (~15 min.), drėgmės pertekliui pašalinti. Po to ant Petri lėkštelių dugno buvo pažymimi taškai tiriamų cheminių stimulų, jų kontrolių ir IJ užnešimo vietai pažymėti naudojant iš anksto paruoštą šabloną. Du taškai priešingose lėkštelių pusėse vieno centimetro atstumu nuo krašto žymėjo stimulus ir kontrolės užnešimo vietą, o taškas lėkštelės centre - IJ užnešimo vietą (10 pav.).



10 pav. Dviejų pasirinkimų entomopatogeninių nematodų elgesio testas

Kontrolė. Biotestuose buvo naudojama dviejų tipų kontrolė – teigiama ir neutrali. Parenkant kontroles buvo atliekami bandomieji tyrimai. Dejonizuotas vanduo buvo pasirinktas kaip neutrali kontrolė, kadangi bandomuosiuose tyrimuose jis nebuvo patrauklus ar repelentiškas IJ, t. y. EPN į jį nereagavo. Be to, ši kontrolė nurodė ar vienodomis sąlygomis IJ Petri lėkštelėje pasiskirstė tolygiai ir ar jų judėjimui įtakos neturėjo kiti veiksniai. Kaip teigiama kontrolė buvo pasirinktas *G. mellonella* paskutinės stadijos lervos supernatantas - *G. mellonella* lerva, susmulkinta piestele 300 µL dejonizuoto vandens, kadangi preliminarūs tyrimai parodė, kad *G. mellonella* supernatantas buvo patrauklus IJ lyginant su dejonizuotu vandeniu. Be to, ši kontrolė parodė bei atspindėjo IJ gyvybingumą ir aktyvumą. Jei *G. mellonella* supernatantas buvo patrauklus IJ ir IJ tolygiai pasiskirstydavo lėkštelėse tik su dejonizuotu vandeniu, tokie IJ buvo naudojami tolesniems tyrimams.

Stimulus. IJ atsakas į etanolį buvo tiriamas, kai 10 µL etanolio (neskiesto arba dešimt ir 100 kartų praskiesto dejonizuotu vandeniu) buvo užnešama vienoje Petri lėkštelės pusėje, o 10 µL dejonizuoto vandens (kontrolės) buvo užnešama priešingoje Petri lėkštelės pusėje. IJ atsakas į 1-noneno skirtingas koncentracijas (1 M, 500 mM, 200 mM, 20 mM, 2 mM, 200 µM, 20 µM, 2 µM, 0,2 µM ir 0,02 µM) buvo tiriamas, kai 10 µL 1-noneno buvo užnešama vienoje Petri lėkštelės pusėje, o 10 µL etanolio (neskiesto, kontrolės) buvo užnešama priešingoje Petri lėkštelės pusėje. Etanolis vs. etanolis, vanduo vs. vanduo, *G. mellonella* supernatantas vs. vanduo buvo naudojamos kaip kontrolės abiejų stimulų (etanolio ir 1-noneno) tyrime ir buvo užnešamos ant Petri lėkštelių tokiu pat būdu kaip stimulai.

Kiekvienas etanolio ir 1-noneno skiedimas bei kontrolės buvo tirtos trijose Petri lėkštelėse tuo pačiu metu. Kiekvienas tyrimas buvo kartojamas šešis kartus. Tyrimo pradžia buvo fiksuojama iškart po to, kai išdžiūdavo vanduo (kuriame nematodai buvo užnešami ant lėkštelės), stabdantis (dėl įtempimo jėgos) laisvą IJ judėjimą. Lėkštelės buvo laikomos dvi val., tamsoje. Po to IJ buvo suskaičiuojami kontrolės ir stimulo zonose - IJ skaičiavimo zonose - 1 cm skersmens apskritime, kurio centras buvo taškai priešingose lėkštelių pusėse (10 pav.).

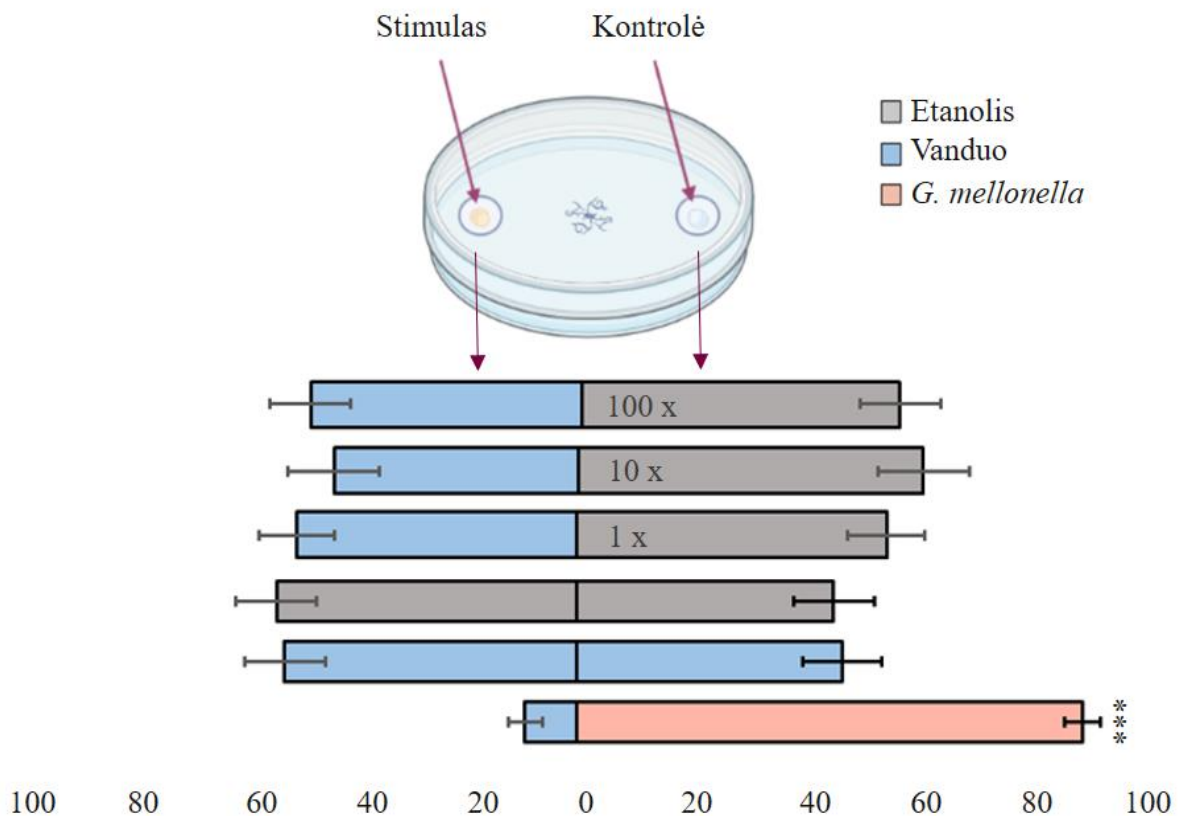
2.5. Statistinė analizė

EPN IJ pasirinkimas buvo apskaičiuojamas procentais. Biotestuose buvo skaičiuojami tik tie IJ, kurie patekdavo į kontrolės (K) ir stimulo (S) skaičiavimo zoną (1 cm skersmens apskritimas kiekvienoje lėkštelės pusėje). 100 % buvo laikomi visi IJ, kurie patekdavo į K ir S zonas sudėjus. IJ S zonoje buvo apskaičiuojami procentais, kai visi IJ esantys S zonoje, buvo dalinami iš IJ sumos S ir K zonose - $(S / (S + K)) \times 100$ %. IJ K zonoje apskaičiuojami procentais, kai visi IJ esantys K zonoje, dalinami iš IJ sumos S ir K zonose $(K / (S + K)) \times 100$ %. Statistinei analizei buvo naudojamos procentinės vertės ir taikomas *Wilcoxon signed-rang* testas. Skirtumas tarp duomenų buvo laikomas statistiškai reikšmingu, kai $p < 0,05$. Grafikai buvo braižomi naudojant *Microsoft Excel*. Statistinė analizė buvo atliekama naudojant PAST 4.03.

3. REZULTATAI

3.1. Reakcija į 1-noneno tirpiklį etanolį: *S. carpocapsae*

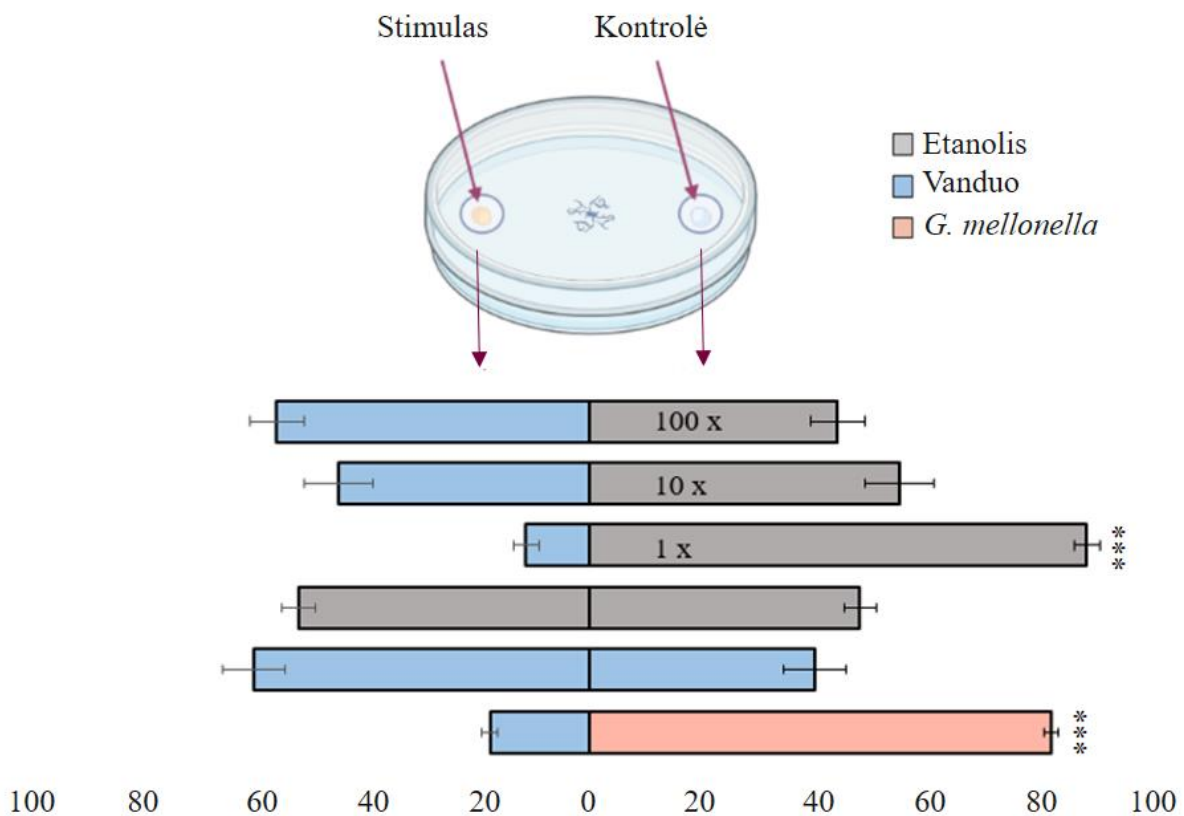
Neskiestas, dešimt ir 100 kartų praskiestas etanolis nebuvo nei patrauklus, nei repelentiškas *S. carpocapsae* IJ, nes atsakas į etanolį reikšmingai nesiskyrė nuo vandens kontrolės: panašus procentas IJ pasirinko stimulą, t. y. 53,9 %, 58,4 %, ir 52,4 % atitinkamai (11 pav.). Kontrolė - sutrintos *G. mellonella* lervos supernatantas *S. carpocapsae* IJ buvo patrauklus – maždaug 90 % IJ ($p < 0,001$) rinkosi lėkštelės pusę su supernatantu. Vandens vs. vandens bei etanolio vs. etanolio kontroliniuose biotestuose *S. carpocapsae* IJ apytiksliai vienodai rinkosi abi lėkštelės puses: 53,6 % ir 46,4 % bei 52,3 % ir 47,7 % atitinkamai.



11 pav. *Steinernema carpocapsae* infekuojančių juvenilių (IJ) atsakas į skirtingus etanolio (1-noneno tirpiklio) skiedimus. Procentai (vidurkis \pm SEM) rodo IJ, pasirinkusių kontrolės ir stimulo zonas, santykį. Sutrintos *Galleria mellonella* lervos supernatantas vs. vanduo, vanduo vs. vanduo bei etanolis vs. etanolis - kontrolės. Statistiškai reikšmingi skirtumai įvertinti naudojant *Wilcoxon signed-rank* testą, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. SEM – standartinė vidurčio paklaida

3.2. Reakcija į 1-noneno tirpiklį etanolį: *S. kraussei*

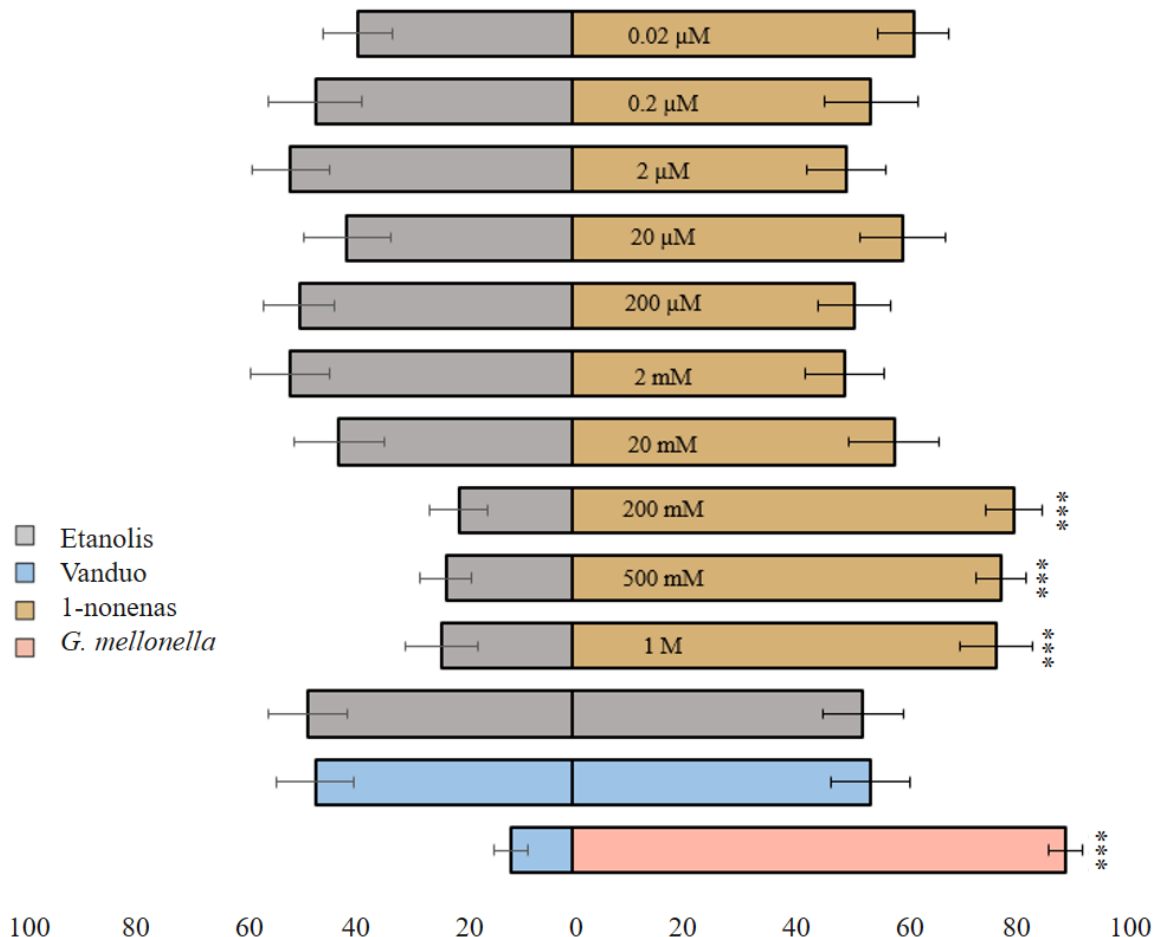
Neskiestas etanolis buvo patrauklus *S. kraussei* IJ, kadangi 88,6 % IJ pasirinko etanolį, o vandenį tik 11,4 % ($p < 0,001$), be to, šis IJ atsakas buvo labai panašus į atsaką į sutrintos *G. mellonella* lervos supernatantą – teigiamą kontrolę, kurios lėkštelės pusę pasirinko 82,2 % IJ. Dešimt ir 100 kartų praskiestas etanolis nebuvo nei patrauklus, nei repelentiškas *S. kraussei*, nes panašus procentas IJ rinkosi ir stimulą, ir kontrolę: dešimt kartų praskiestą etanolį pasirinko 55,3 %, vandenį 44,7 % IJ; o 100 kartų praskiestą etanolį pasirinko 44,2 %, vandenį 55,8 % IJ (12 pav.). Vandens vs. vandens bei etanolio vs. etanolio kontroliniuose biotestuose *S. kraussei* IJ apytiksliai vienodai rinkosi abi lėkštelės puses: 59,9 % ir 46,4 % bei 52,3 % ir 47,7 % atitinkamai.



12 pav. *Steinernema kraussei* infekuojančių juvenilių (IJ) atsakas į skirtingus etanolio (1-noneno tirpiklio) skiedimus. Procentai (vidurkis \pm SEM) rodo IJ, pasirinkusių kontrolės ir stimulo zonas, santykį. Sutrintos *Galleria mellonella* lervos supernatantas vs. vanduo, vanduo vs. vanduo bei etanolis vs. etanolis - kontrolės. Statistiškai reikšmingi skirtumai įvertinti naudojant *Wilcoxon signed-rank* testą, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. SEM – standartinė vidurkio paklaida

3.3. Reakcija į 1-noneną: *S. carpocapsae*

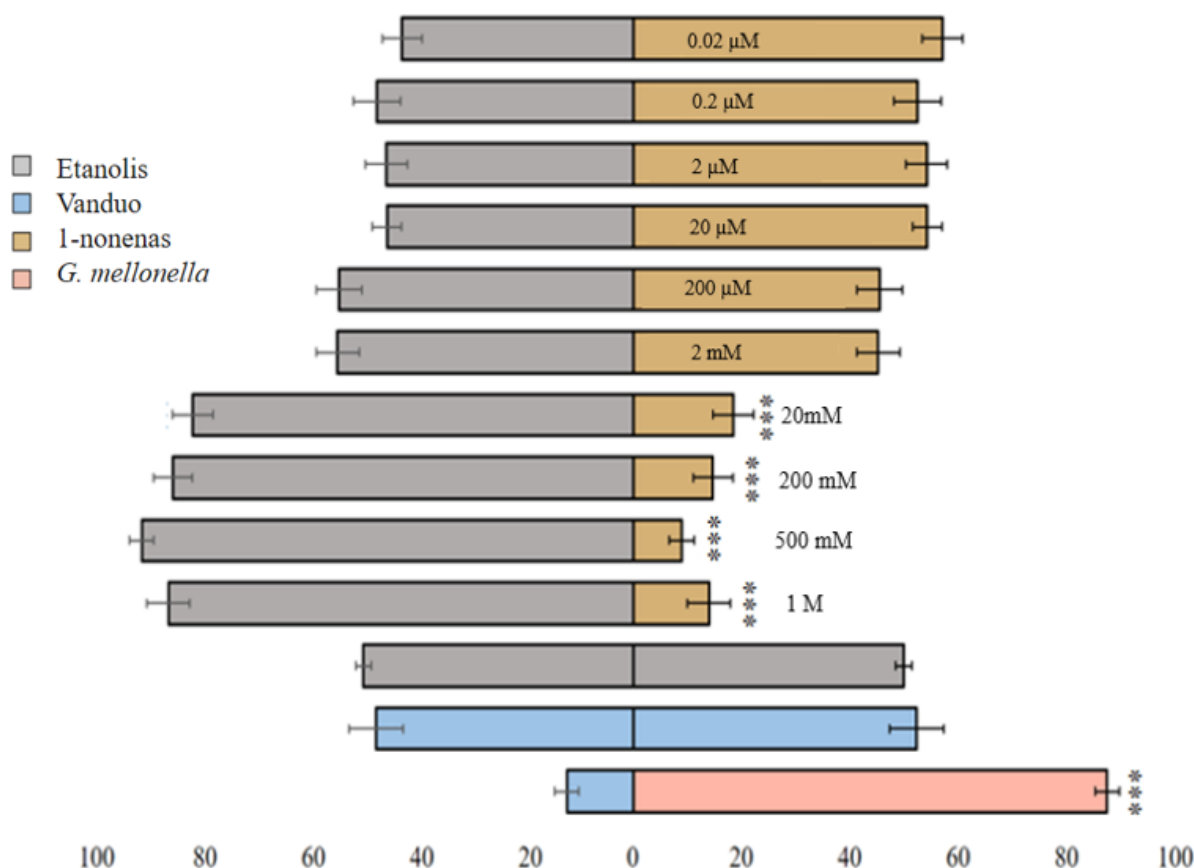
Ištirtos didžiausios 1-noneno koncentracijos buvo patrauklios *S. carpocapsae* IJ: 76,3 % IJ pasirinko 1 M 1-noneną, 77,1 % IJ pasirinko 500 mM 1-noneną ir 77,1 % IJ pasirinko 200 mM 1-noneną bei buvo užfiksuoti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp IJ reakcijos į šias tris didžiausias tirtas 1-noneno koncentracijas ir reakcijos į kontrolę - etanolį ($p < 0,001$) (13 pav.). Be to, *S. carpocapsae* IJ reakcija į minėtas tris didžiausias 1-noneno koncentracijas buvo panaši į reakciją *G. mellonella* lervos supernatantą – teigiamą kontrolę, kurią rinkosi 90,1 % ($p < 0,001$) IJ. Mažesnės tirtos 1-noneno koncentracijos nuo 20 mM iki 0,02 μM *S. carpocapsae* IJ nebuvo nei patrauklios nei repelentiškos palyginus su etanolio kontrole, statistiškai reikšmingų skirtumų tarp reakcijos į stimulą ir kontrolę neužfiksuota. Vandens vs. vandens bei etanolio vs. etanolio kontroliniuose biotestuose *S. carpocapsae* IJ apytiksliai vienodai rinkosi abi lėkštelės puses: 52,3 % ir 47,7 % bei 53,8 % ir 46,2 % atitinkamai.



13 pav. *Steinernema carpocapsae* infekuojančių juvenilių (IJ) atsakas į skirtingas 1-noneno koncentracijas. Procentai (vidurkis \pm SEM) rodo IJ, pasirinkusių kontrolės ir stimulo zonas, santykį. Sutrintos *Galleria mellonella* lervos supernatantas vs. vanduo, vanduo vs. vanduo bei etanolis vs. etanolis - kontrolės. Statistiškai reikšmingi skirtumai įvertinti naudojant *Wilcoxon signed-rank* testą, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. SEM – standartinė vidurkio paklaida

3.4. Reakcija į 1-noneną: *S. kraussei*

Ištirtos didžiausios 1-noneno koncentracijos 1 M, 500 mM, 200 mM ir 20 mM buvo stipriai repelentiškos *S. kraussei* IJ, kadangi dauguma *S. kraussei* IJ nesirinko zonų su šiomis koncentracijomis, bet rinkosi etanolio kontrolės zoną: 86,1 %; 91,0 %; 85,3 % ir 81,5 % IJ atitinkamai bei buvo užfiksuoti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp IJ reakcijos į šias didžiausias tirtas 1-noneno koncentracijas ir reakcijos į kontrolę etanolį ($p < 0,001$) (14 pav.). *Steinernema kraussei* IJ reakcija į minėtas didžiausias 1-noneno koncentracijas buvo panaši į reakciją *G. mellonella* lervos supernatantą – teigiamą kontrolę, kuria rinkosi 87,7 % IJ ($p < 0,001$). Mažesnės tirtos 1-noneno koncentracijos nuo 2 mM iki 0,02 μM nebuvo nei atraktyvios, nei repelentiškos, statistiškai reikšmingo IJ atsako į šias koncentracijas lyginant su kontrole etanoliumi nebuvo užfiksuota. Vandens vs. vandens bei etanolio vs. etanolio kontroliniuose biotestuose *S. kraussei* IJ apytiksliai vienodai rinkosi abi lėkštelės puses: 52,4 % ir 47,6 % bei 50,1 % ir 49,9 % atitinkamai.



14 pav. *Steinernema kraussei* infekuojančių juvenilių (IJ) atsakas į skirtingas 1-noneno koncentracijas. Procentai (vidurkis \pm SEM) rodo IJ, pasirinkusių kontrolės ir stimulo zonas, santykį. Sutrintos *Galleria mellonella* lervos supernatantas vs. vanduo, vanduo vs. vanduo bei etanolis vs. etanolis - kontrolės. Statistiškai reikšmingi skirtumai įvertinti naudojant *Wilcoxon signed-rank* testą, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. SEM – standartinė vidurkio paklaida

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Etanolis. EPN elgesio tyrimų rezultatai atskleidė, kad į neskiestą etanolį (1-noneno tirpiklį) *S. carpocapsae* nereagavo, tačiau jis buvo patrauklus *S. kraussei* IJ. Tuo tarpu į dešimt ir 100 kartų praskiestą etanolį jau abi tirtos EPN rūšys nereagavo. Svarbu paminėti, kad tikslios etanolio koncentracijos ant agarų buvo mažesnės vertinant bei skaičiuojant IJ, kadangi etanolis yra lakus ir greitai garuoja. Gautas rezultatas su *S. carpocapsae* IJ sutapo su ankstesnio tyrimo (Hallem ir kt., 2011) rezultatais, kai buvo nustatyta, kad neskiestas etanolis *S. carpocapsae* IJ taip pat buvo nei patrauklus, nei repelentiškas. Tačiau minėtame tyrime buvo nustatyti dar penki augalinės ir/ar bakterinės kilmės alkoholiai, patrauklūs šios rūšies IJ – oktanolis, nonanolis, heksanolis, heptanolis, pentanolis (Hallem ir kt. 2011). Svarbu paminėti, kad nonanolį, kaip feromoną, gausiai išskiria *G. mellonella* patinai tam, kad priviliotų pateles (Romel ir kt., 1992; Svensson ir kt., 2014). *Steinernema kraussei* reakcija į etanolį ar kitus alkoholius anksčiau nebuvo tirta. Iš gautų rezultatų galima teigti, kad *S. carpocapsae* etanolis (plačiame tirtų koncentracijų diapazone) nėra svarbus aplinkos signalas ieškant vabzdžių šeimininkų, tačiau galėtų būti reikšmingas *S. kraussei* rūšiai. Visgi, ar toks tarp rūšinis atsakas į etanolį skirtumas atspindi skirtingą prisitaikymą prie aplinkos, lieka nežinoma, tačiau gauti rezultatai praplečia žinias apie etanolio poveikį šioms EPN rūšims.

1-Nonenas. Žinoma, kad pagrindiniai cheminių junginių šaltiniai, padedantys EPN rasti vabzdžius šeimininkus yra anglies dvideginis, vabzdžių šeimininkų skleidžiami junginiai, jų pažeistų augalų išskiriami lakieji junginiai bei tie cheminiai junginiai, kuriuos išskiria jau EPN užkrėsti vabzdžiai (Zhang ir kt., 2019). EPN užkrėsto šeimininko išskiriami cheminiai junginiai skiriasi priklausomai nuo infekcijoje dalyvaujančių EPN, jų bakterinių simbiotų ir vabzdžių rūšių bei beveik nepersidengia (Grunseich ir kt., 2021). Tačiau neseniai buvo nustatyta, kad tarp cheminių junginių, kuriuos į aplinką išskiria EPN užkrėsti vabzdžiai yra 1-nonenas, kuris yra vienintelė bendra medžiaga, skleidžiama dviejų skirtingų vabzdžių rūšių, infekuotų trimis skirtingomis EPN rūšimis (Grunseich ir kt., 2021). EPN reakcija į šį junginį iki šiol tirta nebuvo. Šio darbo metu buvo nustatyta *S. carpocapsae* ir *S. kraussei* IJ reakcija į skirtingas 1-noneno koncentracijas. Abiejų tirtų EPN rūšių atsakas į 1-noneną labai skyrėsi. *Steinernema carpocapsae* IJ buvo atraktyvios didelės 1-noneno koncentracijos (1 M, 500 mM ir 200 mM), tuo tarpu *S. kraussei* tos pačios 1-noneno koncentracijos bei netgi dar dešimt kartų mažesnė (20 mM) buvo repelentiškos. Abi EPN rūšys į mažesnes 1-noneno koncentracijas (nuo 20 mM iki 0,02 μM ir nuo 2 mM iki 0,02 μM *S. carpocapsae* ir *S. kraussei* atitinkamai) nereagavo t. y. jos nebuvo nei patrauklios, nei repelentiškos. Svarbu pabrėžti, kad tiriant *S. kraussei* reakciją

į 1-noneną, IJ turėjo rinktis tarp atraktyvios kontrolės - etanolio ir tarp 1-noneno tirpintu etanolyje, tačiau gautas rezultatas parodė, kad 1-nonenas vis tiek buvo repelentiškas net ir mišinyje su patraukliu junginiu. Skirtingi dviejų EPN rūšių IJ atsakai į 1-noneną, kuri išskyrė EPN infekuoti šeimininkai, gali parodyti tarprūšinius mitybos skirtumus. Darant prielaidą, kad daugiau 1-noneno išsiskiria vėlesnėse EPN infekcijos stadijose (tai patvirtina matavimai prieš užsikrėtimą ir praėjus kelioms dienoms po užsikrėtimo (Grunseich ir kt., 2021) ir žinant, kad *S. carpocapsae* didelės 1-noneno koncentracijos buvo patrauklios, galima būtų teigti, kad *S. carpocapsae* galėtų infekuoti vėlesnės infekcijos stadijos vabzdžius. Be to, buvo pastebėta, kad būtent šios rūšies EPN galėjo infekuoti sušaldytus (mirusius) vabzdžius, t. y. elgtis kaip maitėdos (San-Blas ir facult Gowen, 2008). Tuo tarpu *S. kraussei* vėlesnės EPN infekcijos stadijos vabzdžių infekuoti negalėtų, nes didelės 1-noneno koncentracijos šiai rūšiai buvo repelentiškos. Taigi 1-nonenas *S. carpocapsae* IJ galėtų būti apibrėžiamas kaip apneumonas (junginys, kuri išskiria negyvas organizmas ir kuris yra naudingas kitiems organizmams) (Nordlund ir Lewis, 1976). Tačiau šiai ekologinei junginių grupei 1-noneno priskirti dar negalima, nes lieka nežinomas tikrasis jo šaltinis: lervos lavonas, nematodai, bakterijos ar net visų trijų derinys. Tačiau galima būtų daryti prielaidą, kad 1-noneną galėtų išskirti EPN simbiotinės bakterijos, nes žinoma, kad bent dvi bakterijų rūšys, būtent *Comamonas sediminis* ir *Pseudomonas monteilii* gamina ir išskiria į aplinką 1-noneną (Wolfgang ir kt., 2019). Įdomu, kad gamtoje 1-noneną išskiria ir pelėsiniai grybai, tokie kaip *Penicillium chrysogenum* (Wilkins ir kt., 2000, Matysik ir kt., 2008) ir *P. palitans* (Wilkins ir kt., 2000). Taip pat 1-nonenas įeina į augalų eterinių aliejų sudėtį pavyzdžiui, *Ruta graveolens* (Chaaban ir kt., 2019) ir *Achillea ligustica* (Bader ir kt., 2022). Tad ateityje būtų įdomu ištirti, ar bakterijos ir grybai, susiję su augalais, galėtų signalizuoti EPN (išskirdamos 1-noneną), kad šalia jų yra maistui tinkamų vabzdžių.

Svarbu pabrėžti, kad labai mažai žinoma apie konkrečius cheminius junginius, susijusius su EPN elgesiu, ypač lyginant su augalų parazitais nematodais, kur žinoma daugiau nei 500 junginių, sukeliančių elgesio reakcijas (Čepulytė ir Būda, 2022). Šiai dienai iš viso yra nustatyti tik 23 cheminiai junginiai (skirtingų cheminių junginių klasių), kurie veikia *S. carpocapsae* elgseną ir tik devyni cheminiai junginiai (skirtingų cheminių junginių klasių), kurie veikia *S. kraussei* elgseną. Be to, šiai dienai yra žinoma tik keletas medžiagų, išskirtų iš EPN infekuotų vabzdžių, į kurias ištirta EPN reakcija. Tai prenolis (3-metil-2-buten-1-olis), 3-hidroksi-2-butanonas (AMC) (Kin ir kt., 2019, Baiocchi ir kt., 2017) butilintas hidroksitoluenas (BHT) (Zhang ir kt., 2019) ir dimetildisulfidas (DMDS) (Fu ir kt., 2021). Visi šie junginiai yra

repelentiški, išskyrus BTH, kuris yra atraktyvus IJ. Iš minėtų junginių *S. carpocapsae* reakcija buvo tirta į prenoį (Kin ir kt., 2019, Baiocchi ir kt., 2017) ir DMDS (Fu ir kt., 2021), o *S. kraussei* nei į vieną iš jų. Taigi, 1-nonenas papildė žinias apie medžiagas, išskirtas iš EPN infekuotų vabzdžių į kurį ištirta EPN reakcija.

Šio mokslinio tyrimo metu nustatyta EPN IJ rūšių *S. carpocapsae* ir *S. kraussei* reakcija į du cheminius junginius - etanolį ir 1-noneną. Šios žinios ateityje galėtų būti panaudotos siekiant padidinti EPN, kaip biokontrolinės priemonės efektyvumą.

IŠVADOS

1. Į neskiestą etanolį (kontrolę) *S. carpocapsae* nereaguoja, o *S. kraussei* jis yra atraktyvus. Dešimt ir 100 kartų praskiestas etanolis neturi reikšmės šių rūšių elgsenai.
2. Didžiausios 1-noneno koncentracijos 1 M, 500 mM ir 200 mM yra atraktyvios *S. carpocapsae*, o *S. kraussei* tos pačios ir netgi dešimt kartų mažesnė (20 mM) yra repelentiškos. Abi EPN rūšys į mažesnes 1-noneno koncentracijas - nuo 20 mM iki 0,02 μ M ir nuo 2 mM iki 0,02 μ M atitinkamai - nereaguoja.
3. EPN *S. carpocapsae* ir *S. kraussei* nustatyti mokslui nauji biologiškai aktyvus cheminiai junginiai.

REZULTATŲ SKLAIDA

1. Čepulytė, R., Tiškevičiūtė, D., **Osinska, E.**, Būda, V. **2024**. Responses of two entomopathogenic nematode species from the genus *Steinernema* to ethanol and 1-nonene. *Biological Control*, 192: art. no. 105505. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2024.105505>
2. Priimtas pranešimas 39-ajame metiniame tarptautinės cheminės ekologijos draugijos susitikime, vykstančiame **2024** m. liepos 14-18 d., Prahoje, Čekijoje – „Responses of three entomopathogenic nematode species from the genus *Steinernema* to ethanol and 1-nonene“, Rasa Čepulytė, Deimantė Tiškevičiūtė, **Evelina Osinska**, Vincas Būda.
3. Ruošiama publikacija: Čepulytė, R., **Osinska, E.** V. Apšegaitė, Tiškevičiūtė, D., Būda, V. **2024**. „1-Nonene in entomopathogenic nematode-infected larva: behavioral response of *Steinernema kraussei* and relative emissions from cadavers with different coinfections“. *Pest Control*.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

EVELINA OSINSKA
Magistro baigiamasis darbas

ENTOMOPATOGENINIŲ NEMATODŲ *STEINERNEMA CARPOCAPSAE* IR *S. KRAUSSEI* REAKCIJA Į 1-NONENĄ

SANTRAUKA

Entomopatogeniniai nematodai (EPN) - nesegmentuotos apvaliosios kirmėlės, kurios parazituoja vabzdžius kenkėjus. Žinios apie tai, kaip EPN infekuojančios juvenilės (IJ) randa savo grobį – vabzdį šeimininką, gali būti panaudotos siekiant padidinti EPN, kaip biokontrolinės priemonės efektyvumą.

Chemorecepcija yra vienas svarbiausių veiksnių, padedančių EPN gerai orientuotis chemiškai sudėtingoje dirvožemio aplinkoje. Šiai dienai yra mažai žinoma apie cheminius junginius, susijusius su EPN elgesiu ieškant grobio, todėl šio darbo tikslas - ištirti cheminio junginio - 1-noneno poveikį dviejų EPN rūšių (*S. carpocapsae* ir *S. kraussei*) elgsenai. Tyrimo tikslui pasiekti buvo išskirti uždaviniai: ištirti *S. carpocapsae* ir *S. kraussei* reakciją į 1-noneno tirpiklį etanolį (kontrolę) bei ištirti *S. carpocapsae* ir *S. kraussei* reakciją į skirtingas 1-noneno koncentracijas. Atlikus dviejų pasirinkimų biotestus, *S. carpocapsae* ir *S. kraussei* reakcijai į 1-noneno tirpiklį etanolį (kontrolę), nustatyta, kad neskiestas etanolis nėra nei patrauklus, nei atstumiantis *S. carpocapsae*, tačiau patrauklus *S. kraussei*, o dešimt ir 100 kartų praskiestas etanolis neturi reikšmės šių rūšių elgsenai. Ištyrus EPN rūšių elgseną į skirtingas 1-noneno koncentracijas buvo nustatyta, kad didžiausios 1-noneno koncentracijos yra patrauklios *S. carpocapsae* IJ, priešingai nei *S. kraussei* IJ, kuriems didžiausios koncentracijos yra repelentiškos, o mažos 1-noneno koncentracijos šių rūšių elgsenai poveikio neturi.

Atliktas tyrimas papildė cheminių junginių sąrašą į kurios reaguoja *S. carpocapsae* ir *S. kraussei* IJ, todėl taikant EPN tvarioje kenkėjų kontrolėje galima atsižvelgti į skirtingų EPN rūšių elgesio ypatumus reaguojant į 1-noneną.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER

EVELINA OSINSKA
Master thesis

**REACTION OF THE ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES *STEINERNEMA*
CARPOCAPSAE AND *S. KRAUSSEI* TO 1-NONENE**

SUMMARY

Entomopathogenic nematodes (EPN) are unsegmented roundworms that parasitize insect pests. Understanding how infective juveniles (IJ) locate their prey - the insect host - can be used to enhance the effectiveness of EPN as a biocontrol agent.

Chemoreception is one of the most important factors, that helping EPN navigate in chemically complex soil environments. Currently, not much is known about the chemical compounds involved in the prey-seeking behavior of EPN. Thus, this study aimed to investigate the effect of the chemical compound 1-nonene on the behavior of two EPN species (*S. carpocapsae* and *S. kraussei*). To achieve this goal, the following objectives were set: to examine the response of *S. carpocapsae* and *S. kraussei* to the 1-nonene solvent ethanol (control) and to study the reaction of *S. carpocapsae* and *S. kraussei* to different concentrations of 1-nonene. In two-choice bioassays, it was determined that undiluted ethanol was neither attractive nor repellent to *S. carpocapsae*, but was attractive to the *S. kraussei* species. However, ethanol diluted ten and 100 times had no significant effect on the behavior of these species. When the behavior of EPN species to different concentrations of 1-nonene was investigated, it was found that the highest 1-nonene concentrations were attractive to *S. carpocapsae* IJ, while they were repellent to *S. kraussei* IJ. Lower concentrations of 1-nonene were neither repellent nor attractive, and there was no statistically significant response from *S. kraussei* IJ or *S. carpocapsae* IJ compared to the controls.

This study adds to the list of chemical compounds, that *S. carpocapsae* and *S. kraussei* IJ respond, 1-nonene. The fact that different EPN species have different behavioral characteristics in response to 1-nonene, can be considered when applying EPN in sustainable pest control.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju nuostabiam žmogui ir tuo pačiu savo darbo vadovei dr. Rasai Čepulytei už suteikta motyvaciją siekti, ieškoti bei domėtis mokslu. Pastovus palaikymas bei rūpestis padėjo man augti moksliniame lygmenyje ir įkvėpė mane tobulėti. AČIŪ JUMS už Jūsų vertingus patarimus bei perduotą patirtį. Taip pat nuoširdžiai dėkoju savo darbo konsultantei Deimantei Tiškevičiūtei, už gebėjimą tinkamai nukreipti iškilus problemoms ir nuoširdumą.

LITERATŪROS ŠALTINIAI

1. Abd-Elgawad M. M. M. (2023). Optimizing Entomopathogenic Nematode Genetics and Applications for the Integrated Management of Horticultural Pests. *Horticulturae*, 9(8), 865. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9080865>
2. Ali S. S., Pervez R., Hussain M. A. ir Ahmad R. (2007). Effect of temperature on survival of *Steinernema seemae*, *S. masoodi* and *S. carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) and their subsequent infectivity to prepupa of *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 40(3), 183–187. <https://doi.org/10.1080/03235400500383750>
3. Ansari M. A., Shah F. A. ir Butt T. M. (2009). The entomopathogenic nematode *Steinernema kraussei* and *Metarhizium anisopliae* work synergistically in controlling overwintering larvae of the black vine weevil, *Otiorhynchussulcatus*, in strawberry growbags. *Biocontrol Science and Technology*. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09583150903420031>
4. Alonso V., Nasrolahi S. ir Dillman A. (2018). Host-Specific Activation of Entomopathogenic Nematode Infective Juveniles. *Insects*, 9(2), 59. <https://doi.org/10.3390/insects9020059>
5. Bader A., AlQathama A., Cioni P. L., Ceccarini L., Abdelhady M. I. S., Al-Shareef W., ... Flamini G. (2022). Essential Oil Biodiversity of *Achillea ligustica* All. Obtained from Mainland and Island Populations. *Plants*, 11(8), 1054. <https://doi.org/10.3390/plants11081054>
6. Baiocchi T., Braun L. ir Dillman, A. R. (2019). Touch-stimulation increases host-seeking behavior in *Steinernema Carpocapsae*. *Journal of Nematology*, 51(1), 1–5. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2019-067>
7. Baiocchi T., Lee G., Choe D.-H. ir Dillman A. R. (2017). Host seeking parasitic nematodes use specific odors to assess host resources. *Scientific Reports*, 7(1), 6270. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06620-2>
8. Baiocchi T., Li C. ir Dillman A. R. (2020). EPNs Exhibit Repulsion to Prenol in Pluronic Gel Assays. *Insects*, 11(8), 457. <https://doi.org/10.3390/insects11080457>
9. Basyoni M. M. A. ir Rizk E. M. A. (2016). Nematodes ultrastructure: Complex systems and processes. *Journal of Parasitic Diseases*, 40(4), 1130–1140. <https://doi.org/10.1007/s12639-015-0707-8>
10. Bhat A. H., Chaubey A. K. ir Askary T. H. (2020). Global distribution of entomopathogenic nematodes, *Steinernema* and *Heterorhabditis*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-0212-y>
11. Brivio M. ir Mastore M. (2018). Nematobacterial Complexes and Insect Hosts: Different Weapons for the Same War. *Insects*, 9(3), 117. <https://doi.org/10.3390/insects9030117>
12. Brown S. E., Cao A. T., Dobson P., Hines E. R., Akhurst R. J. ir East P. D. (2006). Txp40, a Ubiquitous Insecticidal Toxin Protein from *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), 1653–1662. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1653-1662.2006>

13. Burnell A. ir Stock S. P. (2000). *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts—Lethal pathogens of insects. *Nematology*, 2(1), 31–42. <https://doi.org/10.1163/156854100508872>
14. Būda, V. (2006). Cheminė ekologija: organizmų sąveikos infocheminėmis medžiagomis. Vilnius
15. Byers J. A. (1991). PHEROMONES AND CHEMICAL ECOLOGY OF LOCUSTS. *Biological Reviews*, 66(4), 347–378. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1991.tb01146.x>
16. Campbell J. F. ir Gaugler R. R. (2002). *Inter-specific variation in entomopathogenic nematode foraging strategy: Dichotomy or variation along a continuum?*. *Fundamental and Applied Nematology* 20(4):393-398. https://www.researchgate.net/publication/32969596_Interspecific_variation_in_entomopathogenic_nematode_foraging_strategy_Dichotomy_or_variation_along_a_continuum
17. Chaaban, S. B., Hamdi, S. H., Mahjoubi K., Jemaa J. M. B. (2019). Composition and insecticidal activity of essential oil from *Ruta graveolens*, *Mentha pulegium* and *Ocimum basilicum* against *Ectomyelois ceratoniae* Zeller and *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Plant Diseases and Protection*. <https://link.springer.com/article/10.1007/s41348-019-00218-8>
18. Chang D. Z., Serra L., Lu D., Mortazavi A. ir Dillman A. R. (2019). A core set of venom proteins is released by entomopathogenic nematodes in the genus *Steinernema*. *PLOS Pathogens*, 15(5), e1007626. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007626>
19. Chaudhary M. Z., Majeed S., Tayyib M., Javed N., Farzand A., Moosa A. ir Shehzad M. (2017). Antagonistic potential of *Steinernema kraussei* and *Heterorhabditis bacteriophora* against Dengue fever mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 5(5): 865-869 <https://www.entomoljournal.com/archives/2017/vol5issue5/PartL/5-4-380-913.pdf>
20. Cimen H., Lee M.-M., Hatting J., Hazir S. ir Stock S. P. (2014). *Steinernema tophus* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. *Zootaxa*, 3821(3). <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3821.3.3>
21. Čepulytė R. ir Būda V. (2022). Toward Chemical Ecology of Plant-Parasitic Nematodes: Kairomones, Pheromones, and Other Behaviorally Active Chemical Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 2022, 70, 5, 1367–1390. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.1c04833>
22. Dara, S. K. (2019). The New Integrated Pest Management Paradigm for the Modern Age. *Journal of Integrated Pest Management*, 10(1). <https://doi.org/10.1093/jipm/pmz010>
23. Dillman A. R., Chaston J. M., Adams B. J., Ciche T. A., Goodrich-Blair H., Stock S. P. ir Sternberg P. W. (2012). An Entomopathogenic Nematode by Any Other Name. *PLoS Pathogens*, 8(3), e1002527. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002527>
24. Edmunds C., Post R. J., Wilding C. S. ir Rae R. (2018). A survey investigating the diversity and distribution of entomopathogenic nematodes in the UK and the first

- confirmed UK record of *Steinernema carpocapsae*. *Nematology*, 20(9), 851–858. <https://doi.org/10.1163/15685411-00003180>
25. Fitters P. F. L. ir Griffin C. T. (2006). Survival, starvation, and activity in *Heterorhabditis megidis* (Nematoda: Heterorhabditidae). *Biological Control*, 37(1), 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.08.005>
 26. Flores P., Alvarado A., Lankin G., Lax P., Prodan S. ir Aballay E. (2021). Morphological, molecular and ecological characterization of a native isolate of *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) from southern Chile. *Parasites & Vectors*, 14(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04548-7>
 27. Forst S. ir Clarke D. (2002). Bacteria-nematode symbiosis. In R. Gaugler (Ed.), *Entomopathogenic nematology* (1st ed., pp. 57–77). UK: CABI Publishing. <https://doi.org/10.1079/9780851995670.0057>
 28. Fu Y., Wang W., Chen C., Shan S., Wei X., Liu Y., ... Ruan W. (2021). Chemotaxis behaviour of *Steinernema carpocapsae* in response to *Galleria mellonella* (L.) larvae infected by con- or hetero-specific entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science and Technology*, 31(3), 299–313. <https://doi.org/10.1080/09583157.2020.1853049>
 29. Gaffke A., Romero M. ir Alborn H. (2023). What Is More Important to Host-Seeking Entomopathogenic Nematodes, Innate or Learned Preference? *Agriculture*, 13(9), 1802. <https://doi.org/10.3390/agriculture13091802>
 30. Gerritsen L. J., De Raay G. ir Smits P. H. (1992). Characterization of form variants of *Xenorhabdus luminescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(6), 1975–1979. <https://doi.org/10.1128/aem.58.6.1975-1979.1992>
 31. Ghorbanzadeh B., Naem S. ir Farshid A. A. (2020). Microscopic Study of Mechanoreceptors and Chemoreceptors of Anterior and Posterior Ends of *Toxocara Canis* Using Scanning Electron Microscopy (SEM) and Light Microscope (LM). *Archives of Razi Institute*, (Online First). <https://doi.org/10.22092/ari.2020.342252.1457>
 32. Glaser R. W. ir Fox H. (1930). A Nematode Parasite of the Japanese Beetle (*Popillia japonica* Newm.). *Science*, V. 71, I. 1827. <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.71.1827.16.c>
 33. Glazer I. ir Lewis E. E. (2000). Bioassays for entomopathogenic nematodes. In A. Navon & K. R. S. Ascher (Eds.), *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes*. (1st ed., pp. 229–247). UK: CABI Publishing. <https://doi.org/10.1079/9780851994222.0229>
 34. Gokce C., Yilmaz H., Erbas Z., Demirbag Z. ir Demir I. (2013). *First Record of Steinernema kraussei* (Rhabditida: Steinernematidae) from Turkey and Its Virulence against *Agrotis segetum* (Lepidoptera: Noctuidae). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3873901/>
 35. Goodrich-Blair H. ir Clarke D. J. (2007). Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: Two roads to the same destination. *Molecular Microbiology*, 64(2), 260–268. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05671.x>

36. Griffin C. T., Gwynn R. L. ir Masson J. P. (1995). *Ecology and transmission strategies of entomopathogenic nematodes*. Biotechnology. <https://edepot.wur.nl/215425>
37. Grunseich J. M., Aguirre N. M., Thompson M. N., Ali J. G. ir Helms A. M. (2021). Chemical Cues from Entomopathogenic Nematodes Vary Across Three Species with Different Foraging Strategies, Triggering Different Behavioral Responses in Prey and Competitors. *Journal of Chemical Ecology*, 47(10–11), 822–833. <https://doi.org/10.1007/s10886-021-01304-8>
38. Hallem E. A., Dillman A. R., Hong A. V., Zhang Y., Yano J. M., DeMarco S. F. ir Sternberg P. W. (2011). A Sensory Code for Host Seeking in Parasitic Nematodes. *Current Biology*, 21(5), 377–383. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.01.048>
39. Haukeland S. (1992). *Scanning electronmicrographs of the anterior region of nematodes in the genus Steinernema (Steinernematidae: Rhabditida)*. *Fundam. appl. Nematology*, 16 (1), 57-61 https://www.researchgate.net/publication/32975876_Scanning_electronmicrographs_of_the_anterior_region_of_nematodes_in_the_genus_Steinernema_Steinernematidae_Rhabditida
40. Helmberger M. S., Shields E. J. ir Wickings K. G. (2017). Ecology of belowground biological control: Entomopathogenic nematode interactions with soil biota. *Applied Soil Ecology*, 121, 201–213. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.10.013>
41. Heungens K., Cowles C. E. ir Goodrich-Blair H. (2002). Identification of *Xenorhabdus nematophila* genes required for mutualistic colonization of *Steinernema carpocapsae* nematodes. *Molecular Microbiology*, 45(5), 1337–1353. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03100.x>
42. Hummadi E. H., Dearden A., Generalovic T., Clunie B., Harrott A., Cetin Y., ... Butt T. (2021). Volatile organic compounds of *Metarhizium brunneum* influence the efficacy of entomopathogenic nematodes in insect control. *Biological Control*, 155, 104527. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104527>
43. Hussein H., Adel M. ir Gelbič I. (2012). Effectiveness of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* in agar gel formulations against larvae of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say.) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Open Life Sciences*, 7(1), 77–82. <https://doi.org/10.2478/s11535-011-0090-0>
44. Ishibashi N. ir Takii S. (1993). Effects of Insecticides on Movement, Nictation, and Infectivity of *Steinernema carpocapsae*. *Journal of Nematology* 25(2):204-13. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19279760/>
45. Yang B., Wang J., Zheng X. ir Wang X. (2023). Nematode Pheromones: Structures and Functions. *Molecules*, 28(5), 2409. <https://doi.org/10.3390/molecules28052409>
46. Jagodič A., Trdan S. ir Laznik Ž. (2019). Entomopathogenic nematodes: Can we use the current knowledge on belowground multitrophic interactions in future plant protection programmes? - Review. *Plant Protection Science*, 55(4), 243–254. <https://doi.org/10.17221/24/2019-PPS>
47. Poinar G. O. ir Grewal P. S. (2012). History of Entomopathogenic Nematology. *Journal of Nematology* 44(2): 153–161. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3578475/>

48. Kaya, H. K. ir Gaugler, R. (1993). Entomopathogenic nematodes. *Annual review of entomology*, 38:181.206. <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev.en.38.010193.001145>
49. Kallali N. S., Oujja A., Goura K., Laasli S.-E., Kenfaoui J., Benseddik Y., ... Lahlali R. (2024). From soil to host: Discovering the tripartite interactions between entomopathogenic nematodes, symbiotic bacteria and insect pests and related challenges. *Journal of Natural Pesticide Research*, 7, 100065. <https://doi.org/10.1016/j.napere.2023.100065>
50. Kaplan F., Alborn H. T., Von Reuss S. H., Ajredini R., Ali J. G., Akyazi F., ... Teal P. E. (2012). Interspecific Nematode Signals Regulate Dispersal Behavior. *PLoS ONE*, 7(6), e38735. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038735>
51. Kaplan F., Shapiro-Ilan D. ir Schiller K. C. (2020). Dynamics of entomopathogenic nematode foraging and infectivity in microgravity. *Npj Microgravity*, 6(1), 20. <https://doi.org/10.1038/s41526-020-00110-y>
52. Kergunteuil A., Röder G. ir Rasmann S. (2018). Environmental gradients and the evolution of tri-trophic interactions. *Ecology letters*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ele.13190>
53. Kin K., Baiocchi T. ir Dillman A. R. (2019). Dispersal and Repulsion of Entomopathogenic Nematodes to Prenol. *Biology*, 8(3), 58. <https://doi.org/10.3390/biology8030058>
54. Kong C.-H., Xuan T. D., Khanh T. D., Tran H.-D. ir Trung N. T. (2019). Allelochemicals and Signaling Chemicals in Plants. *Molecules*, 24(15), 2737. <https://doi.org/10.3390/molecules24152737>
55. Koppenhöfer A. M., Shapiro-Ilan D. I. ir Hiltbold I. (2020). Entomopathogenic Nematodes in Sustainable Food Production. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4, 125. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00125>
56. Kotchofa R. ir Baimey H. (2019). *In vivo* production of entomopathogenic nematodes using *Galleria mellonella*: Costs and effect of diets on nematode pathogenicity. *Journal of Nematology*, 51(1), 1–15. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2019-066>
57. Kumari B. ir Kanwar R. S. (2022). Use of entomopathogenic nematodes in recent trends: A review. *The Pharma Innovation Journal*, SP-11(4): 30-38. <https://www.thepharmajournal.com/archives/2022/vol11issue4S/PartA/S-11-3-238-398.pdf>
58. Labaude S. ir Griffin C. (2018). Transmission Success of Entomopathogenic Nematodes Used in Pest Control. *Insects*, 9(2), 72. <https://doi.org/10.3390/insects9020072>
59. Lee J. H., Dillman A. R. ir Hallem E. A. (2016). Temperature-dependent changes in the host-seeking behaviors of parasitic nematodes. *BMC Biology*, 14(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0259-0>

60. Lewis E. E., Campbell J., Griffin C., Kaya H. ir Peters A. (2006). Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. *Biological Control*, 38(1), 66–79. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.11.007>
61. Lillis P. E., Kennedy I. P., Carolan J. C. ir Griffin C. T. (2023). Low-temperature exposure has immediate and lasting effects on the stress tolerance, chemotaxis and proteome of entomopathogenic nematodes. *Parasitology*, 150(1), 15–28. <https://doi.org/10.1017/S0031182022001445>
62. Matysik, S., Herbarth, O., Mueller A. (2008). Determination of volatile metabolites originating from mold growth on wallpaper and synthetic media. *J. Microbiol. Methods*, 75, pp. 182-187. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167701208002248>
63. Moens T., Verbeeck L., De Maeyer A., Swings J. ir Vincx M. (1999). Selective attraction of marine bacterivorous nematodes to their bacterial food. *Marine Ecology Progress Series*, 176, 165–178. <https://doi.org/10.3354/meps176165>
64. Muangpat P., Suwannaroj M., Yimthin T., Fukruksa C., Sitthisak S., Chantratita N., ... Thanwisai A. (2020). Antibacterial activity of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* isolated from entomopathogenic nematodes against antibiotic-resistant bacteria. *PLOS ONE*, 15(6), e0234129. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234129>
65. Nguyen K. B., Gozel U., K-Ppenh-Fer H. S. ir Adams B. J. (2006). *Heterorhabditis floridensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Florida. *Zootaxa*, 1177(1). <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1177.1.1>
66. Nordlund, D. A., Lewis, W. J. (1976). Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. *J. Chem. Ecol.*, 2 (2), pp. 211-220. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19760541484>
67. Nurashikin-Khairuddin W., Abdul-Hamid S. N. A., Mansor M. S., Bharudin I., Othman Z. ir Jalinas J. (2022). A Review of Entomopathogenic Nematodes as a Biological Control Agent for Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae). *Insects*, 13(3), 245. <https://doi.org/10.3390/insects13030245>
68. Peat, S. M. ir Adams, B. J. (2008). Natural selection on the luxA gene of bioluminescent bacteria. *Symbiosis*, ISSN 0334-5114. <https://dalspace.library.dal.ca/bitstream/handle/10222/78371/VOLUME%2046-NUMBER%202-2008-PAGE%20101.pdf?sequence=1>
69. Peters A., Katz P. ir Elias E. (2008). Entomopathogenic nematodes for biological control of codling moth. <https://orgprints.org/id/eprint/13713/1/284-286.pdf>
70. Peters, A. (1996). The Natural Host Range of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. and Their Impact on Insect Populations. *Biocontrol science and technology*. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09583159631361>
71. Richardson W. H., Schmidt T. M. ir Neelson K. H. (1988). Identification of an anthraquinone pigment and a hydroxystilbene antibiotic from *Xenorhabdus luminescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(6), 1602–1605. <https://doi.org/10.1128/aem.54.6.1602-1605.1988>

72. Rizaludin M. S., Stopnisek N., Raaijmakers J. M. ir Garbeva P. (2021). The Chemistry of Stress: Understanding the ‘Cry for Help’ of Plant Roots. *Metabolites*, 11(6), 357. <https://doi.org/10.3390/metabo11060357>
73. Romel K. E., Scott-Dupree C. D. ir Carter M. H. (1992). Qualitative and quantitative analyses of volatiles and pheromone gland extracts collected from *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of chemical ecology*, v. 18, p. 1255–1268. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00980078>
74. Sajnaga E. ir Kazimierczak W. (2020). Evolution and taxonomy of nematode-associated entomopathogenic bacteria of the genera *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: An overview. *Symbiosis*, 80(1), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s13199-019-00660-0>
75. San-Blas E. ir Gowen S. R. (2008). Facultative scavenging as a survival strategy of entomopathogenic nematodes. *International Journal for Parasitology*, 38(1), 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.06.003>
76. Serra L., Macchietto M., Macias-Muñoz A., McGill C. J., Rodriguez I. M., Rodriguez B., ... Mortazavi A. (2019). Hybrid Assembly of the Genome of the Entomopathogenic Nematode *Steinernema carpocapsae* Identifies the X-Chromosome. *G3 Genes/Genomes/Genetics*, 9(8), 2687–2697. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400180>
77. Shapiro-Ilan D. I., Gouge D. H., Piggott S. J. ir Fife J. P. (2006). Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control. *Biological Control*, 38(1), 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.09.005>
78. Sharmila R., Priya M. S., Subramanian S., Poornima K. ir Pandiyan M. (2018). Review on ecology of entomopathogenic nematodes. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(4): 1086-1093. <https://www.entomoljournal.com/archives/2018/vol6issue4/PartS/6-3-335-467.pdf>
79. Shivakumara T. N., Dutta T. K. ir Rao U. (2018). A novel in vitro chemotaxis bioassay to assess the response of *Meloidogyne incognita* towards various test compounds. *Journal of Nematology*, 50(4), 487–494. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2018-047>
80. Smart G. C. (1995). Entomopathogenic Nematodes for the Biological Control of Insects. *Journal of Nematology* 27(4S): 529–534. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2619649/>
81. Svensson G. P., Gündüz E. A., Sjöberg N., Hedenström E., Lassance J.-M., Wang H.-L., ... Anderbrant O. (2014). Identification, Synthesis, and Behavioral Activity of 5,11-Dimethylpentacosane, A Novel Sex Pheromone Component of the Greater Wax Moth, *Galleria Mellonella* (L.). *Journal of Chemical Ecology*, 40(4), 387–395. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0410-8>
82. Tofangszie N., Arthurs S. P. ir Giblin-Davis R. M. (2012). Entomopathogenic Nematodes (Nematoda: Rhabditida: families Steinernematidae and Heterorhabditidae): EENY-530/IN944, 8/2012. *EDIS*, 2012(8). <https://doi.org/10.32473/edis-in944-2012>
83. Torres-Barragan A., Suazo A., Buhler W. G. ir Cardoza Y. J. (2011). Studies on the entomopathogenicity and bacterial associates of the nematode *Oscheius carolinensis*. *Biological Control*, 59(2), 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.05.020>

84. Tumialis D., Gromadka R., Skrzecz I., Pezowicz E., Mazurkiewicz A. ir Popowska - Nowak E. (2014). *Steinernema kraussei* (Steiner, 1923) (Rhabditida: Steinernematidae) — the first record from Poland. *Helminthologia*, 51(2), 162–166. <https://doi.org/10.2478/s11687-014-0224-9>
85. Turlings T. C. J., Tumlinson J. H. ir Lewis W. J. (1990). Exploitation of Herbivore-Induced Plant Odors by Host-Seeking Parasitic Wasps. *Science*, 250(4985), 1251–1253. <https://doi.org/10.1126/science.250.4985.1251>
86. Turlings T. C. J., Hiltbold I. ir Rasmann S. (2012). The importance of root-produced volatiles as foraging cues for entomopathogenic nematodes. *Plant and Soil*, 358(1–2), 51–60. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1295-3>
87. Viglierchio D. R. ir Schmitt V. (1983). On the Methodology of Nematode Extraction from Field Samples: Baermann Funnel Modifications. *Journal of Nematology*, 15(3):438-444. 1983. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2618288/pdf/438.pdf>
88. Von Reuss S. H. ir Machado R. A. R. (2022). Chemical Ecology of Nematodes. *CHIMIA*, 76(11), 945. <https://doi.org/10.2533/chimia.2022.945>
89. Zhang X., Li L., Kesner L. ir Robert, C. A. M. (2021). Chemical host-seeking cues of entomopathogenic nematodes. *Current Opinion in Insect Science*, 44, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2021.03.011>
90. Zhang X., Machado R. A., Doan C. V., Arce C. C., Hu L. ir Robert, C. A. (2019). Entomopathogenic nematodes increase predation success by inducing cadaver volatiles that attract healthy herbivores. *eLife*, 8, e46668. <https://doi.org/10.7554/eLife.46668>
91. Zhang Y., Wang F. ir Zhao Z. (2022). Metabonomics reveals that entomopathogenic nematodes mediate tryptophan metabolites that kill host insects. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1042145. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1042145>
92. Zyl C. V. ir Malan A. P. (2014). The Role of Entomopathogenic Nematodes as Biological Control Agents of Insect Pests, with Emphasis on the History of Their Mass Culturing and *in vivo* Production. *African Entomology*, 22(2), 235–249. <https://doi.org/10.4001/003.022.0222>
93. White G. F. (1927). A Method for Obtaining Infective Nematode Larvae from Cultures. *Science*, Vol. 66, No. 1709, pp. 302-303. <https://www.jstor.org/stable/pdf/1651653.pdf>
94. Wilkins K., Larsen K., Simkus M. (2000). Volatile metabolites from mold growth on building materials and synthetic media. *Chemosphere*, 41 (3), pp. 437-446. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653599002738>
95. Wolfgang, A., Taffner, J., Guimarães, R. A., Coyne, D., Berg, G. (2019). Novel strategies for soil-born diseases: exploiting the microbiome and volatile-based mechanisms toward controlling *Meloidogyne*-based disease complexes. *Front. Microbiol.*, 10, p. 1296. <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2019.01296/full>