

As a manuscript

MAHMOUDI NILOUFAR

COMPARATIVE MORPHOMETRIC ANALYSIS OF NEMATODES *DITYLENCHUS DESTRUCTOR* THORNE, 1945 POPULATIONS OF IRANIAN AND RUSSIAN ORIGIN AND DEVELOPMENT OF NEW TEST SYSTEMS FOR THEIR MOLECULAR GENETIC IDENTIFICATION

Specialty 4. 1. 3 Agrochemistry, agrosoil science, plant protection and quarantine

ABSTRACT

dissertation for a degree
candidate of biological sciences

Moscow- 2022

The work was carried out at the agro-biotechnological department of the Agrarian-Technological Institute of the RUDN University of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation

Scientific supervisor:

Pakina Elena Nikolaevna

doctor of agricultural sciences, Associate professor,
RUDN, department of Agrobiotechnology,
professor

Official opponents:

Doctor of Biological Sciences, **Perevertin Kirill Alexandrovich**
Leading Researcher, FGBUN Institute of Ecology and Evolution named after A.I. A. N. Severtsova
RAS

Candidate of Biological Sciences, **Lebedeva Daria Ivanovna**
Senior Researcher of the Laboratory of Animal and Plant Parasitology of the Institute of Biology of the
Karelian Scientific Center of the Russian Academy of Sciences

Lead organization:

Federal Research Center for Potato Production named after A.N. A. G. Lorkha

Defense will take place «26» December 2022 year at 12-00 at a meeting of the dissertation council
ПДЦ 2021.002 at RUDN University located at: 117198, Moscow, Miklukho-Maklaya str., 8/2.

The dissertation can be found in the library at UNIBTs (Scientific Library) RUDN University at the
address: 117198, st. Miklukho-Maklaya, 6 and on the website <https://www.rudn.ru/science/dissovet>.

The abstract was sent «__» _____ 2022 y.

Scientific secretary
of the dissertation council ПДЦ 2021.002
candidate of agricultural sciences

Vvedensky Valentin Valentinovich

I. GENERAL DESCRIPTION OF DISSERTATION

The relevance of research. Various diseases and pests can affect crops and cause a significant reduction in yields, as well as production. Nematodes, along with major plant pathogens such as fungi, viruses and bacteria, can infect cultivated crops and cause significant yield losses. The genus *Ditylenchus* Filipjev, 1936 consists of over 90 described nematode species, some of which are the longest known nematode described. Among the nematodes of the genus *Ditylenchus*, the most important economic species are: *D. destructor*, potato stem nematode; *D. dipsaci*, onion stem nematode; *D. angustus*, rice stem nematode; and *D. gigas*, legume stem nematode. However, accurate detection and identification of *D. destructor* is important as this species are under quarantine in many parts of the world. Unlike morphometric methods, nematode identification using various molecular tools provides accurate and rapid identification of the species under study. The main modern problems of potato growing are related to the quality control of potato seeds, the lack of proper crop rotation and the lack of access to appropriate production technologies. So, since 2010, the distribution and amount of damage caused by this type of nematode in the Russian Federation have been increasing annually. It is estimated that around 40,000 hectares of commercial potatoes are currently heavily infested with *D. destructor*. Usually, harvested potato tubers in infected areas produce up to 5% of infected tubers. Over-watering resulting in high levels of moisture can exacerbate infection, resulting in the percentage of infected tubers rising to 10% or more. Due to infected planting material in the Central and Volga regions of Russia in 2015-2019, crop losses amounted to about 30%. In Iran, most potato fields in the central and western regions are infected with *D. destructor* and have lost part of the crop.

The purpose of the study. Classic identification of nematodes is based on morphological and anatomical differences using microscopic image analysis. Morphological identification is among the cheaper identification methods and helps relate morphology with possible function and is an essential tool for morphologists. While most effective for nematodes that have distinct differences, nematodes that share subtle morphological and morphometric differences like body length, presence, and shape of a stylet, the shape of the tail, etc., are difficult to distinguish morphologically. Morphological identification of *Ditylenchus* genera nematodes requires taxonomic expertise and can be challenging if samples contain mixed species. Morphology may also be altered due to variation in geographic location, host plant, nutrition, and other environmental factors as is observed among some free-living and plant parasitic nematodes. Concisely, it can be difficult for non-specialists to identify a nematode species with a high level of confidence based on morphology alone, and an integration of sub-organismal data such as DNA sequence can be required for accurate identification. Many forms of DNA-based methods have been developed for the identification of nematodes. These can be broadly categorized into fingerprint- and nucleotide-based methods. Fingerprint-based methods may include Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) and the use of species-specific primers, which relies on the presence/absence of a PCR amplification product. Each of these methods has its own advantages and/or disadvantages compared to other nematode identification methods, DNA-based or otherwise. Among these identification methods, species-specific PCR is favorable to us for its simplicity, rapidity, specificity, no need for expensive equipment and highly qualified specialists for analysis. There are some universal primers for this methods that could be used for the identification of *Ditylenchus destructor*. However, a universal primer is a general-purpose coating that prepares a surface for a subsequent coating. Choosing appropriate primers is probably the single most important factor affecting the polymerase chain reaction (PCR). Specific amplification of the intended target requires that primers do not have matches to other targets in certain orientations and

within certain distances that allow undesired amplification. So in this research two pairs of new primers were developed to increase the selectivity and sensitivity of analysis for both countries populations.

The object of the study. The purpose of this work was to study geographically distant populations of *D. destructor*, and on the basis of these data to develop a new diagnostic PCR primers, as well as to test and improve the species-specific diagnostic method.

The subject of the study. Collected and analyzed the received material, processed and interpreted the data. The new primers developed to identification of *Ditylenchus destructor* between 2018 to 2022.

Scientific novelty of the research:

1. Morphological and genetic comparison of *D. destructor* individuals between populations from Russia and Iran was carried out for the first time.
2. Two sets of new species-specific primer pairs have been developed for molecular diagnostics of *D. destructor* populations from Russia and Iran.
3. Tests for sensitivity and selectivity of primers showed high efficiency of new primers dsn.1 F/R and dsn.2F/R for identification of *D. destructor*.

Theoretical and practical significance. is to develop new species-specific primers for *D. destructor*. Two pairs of primers, dsn.1 F/R and dsn.2 F/R, have been developed. Their analytical sensitivity, efficiency and specificity are shown. The proposed methods can be used for rapid diagnosis of *D. destructor* nematodes. Designing specific primers for study populations could be a useful tool to help life scientists expand and continue their research.

Methodology and research methods. DNA extraction from the test materials was done by treating the samples with proteinase K and then removing the protein without extracting with organic solvents and using the Extran-2 DNA kit, kit number NG-511-100 (Synthol). , Russian Federation) according to the manufacturer's instructions. DNA extracts were measured using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). We studied samples from Russia and Iran and isolated DNA. Sequencing was performed using an ABI-3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). The National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLAST website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) performed an initial comparison of sample results with the GenBank genetic sequence database. Sequences were verified, aligned and edited by BioEdit v.7.0.5. 3. In BioEdit, sequences were aligned with additional sequences collected from GenBank.

Provisions for the Defense:

- Receive and analyze the morphometric variability of *D. destructor* populations from Russia and Iran.
- Study the genetic variability of *D. destructor* populations.
- Develop two sets of new species-specific primer pairs for *D. destructor* molecular diagnostics.
- Test for primer selectivity.
- Test for primer sensitivity test.

The degree of reliability and approbation of the results. The results of the dissertation work were presented at the following events: Symposium, XIII International Nematological Symposium "Nematodes and other Ecdysozoa under changing environments", Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences. Nizhny Novgorod (July –August 2019). International Scientific Forum SCIENCEANDINNOVATION–MODERN CONCEPTS. НАУКА И ИННОВАЦИИ-

СОВРЕМЕННЫЕ КОНЦЕПЦИИ. Russia (Moscow, July 2020); International Scientific Forum WORLD SCIENCE: PROBLEMS AND INNOVATIONS. Russia (April 2021).

The dissertation author's independent contribution.

The applicant participated in setting the goal and objectives of the study; collected and analyzed the received material, processed and interpreted the data, prepared publications in co-authorship. The dissertation work is the result of research conducted by the author at the Agrobiotechnological Department of ATI RUDN University and on the basis of the «All-Russian Center for Plant Quarantine in 2018–2022».

Research references.

Include 123 titles: directories and regulatory documents, dissertations and abstracts, books and articles in English, online and offline resources.

Approbation of the research results.

8 articles were published on the topic of the dissertation, including 2 Scopus, 2 conferences, 1 symposium and 3 in journals recommended by the Higher Attestation Commission of the Ministry of Education and Science of Russia for publishing the results of the candidate's dissertation for technical and doctoral dissertations.

The structure of the dissertation research. The dissertation is presented on 108 pages, consists of an introduction, three chapters, conclusions and applications, contains 20 tables and 24 figures. The list of references includes 123 sources in foreign languages and one in Russian.

Acknowledgement

The author thanks Pridannikov Mikhail Viktorovich, Ph.D. Leading Researcher, Head of the Laboratory of Phytoparasitology Center of Parasitology, Institute of Ecology and Evolution named after A. N. Severtsov of the Russian Academy of Sciences, as well as for his invaluable contribution to the revision of the Russian version of the dissertation.

II. MAIN CONTENT OF WORK

Introduction. The relevance and scientific novelty of the study are substantiated, the goal and objectives are formulated, as well as the provisions submitted for defense.

Chapter 1. Literature Review. This chapter discusses the nematode *Ditylenchus destructor*, its characteristics and morphology. Information is presented on the existing methods of molecular detection and the application of newly developed primers for identification analysis and comparison of various populations between the Russian Federation and Iran.

Chapter 2. Material and methods

For molecular measurements, 50 nematodes from each population were used.

DNA isolation. All procedures were performed according to the VNIKR standard or other standards using a set of reagents [EPPO protocol, 2017].

Sequencing and phylogenetic analysis. For sequencing and further phylogenetic analysis, a PCR product with new primers was used, followed by separation in a 1% agarose gel. The amplified PCR product obtained after purification with the Thermo Scientific GeneJET gel extraction kit was sequenced using the dideoxy Sanger cycle using the Genetic Analyzer AB-3500 (Applied Biosystems, USA). Next, the sequencing results were compared with the GenBank genetic sequence database on the NCBI BLAST website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Primer Design. The eight *D. destructor* ITS sequences amplified in this study were deposited in the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) as MN122076, MN307126, MN307128, MN493767, MN658597, MN658599, MN65388637, MN658599. For the design of species-specific primers, these sequences and other initial sequences obtained from the studied populations, as well as sequences deposited in the NCBI database by other researchers for *D. destructor* were used: GQ469492, GQ469491; *D. dipsaci* MG676655, MG676656, MG676657. In addition, a number of *D. gigas* sequences KJ653270, KJ653267 were used for alignment due to their close genetic relationship with *D. destructor*. The rDNA-ITS nucleotide sequences were aligned with BioEdit 7.0.5.3 to look for conserved regions. The designed ds.n.1 F/R primers should allow amplification of the 397 bp fragment. and ds.n.2 F / R size 330 bp. The primer design was validated by BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) to rule out non-specific reactions with other closely related species. Additionally, primer quality was assessed using Oligo 6.0 software.

PCR with species-specific primers. A commercial Master mix kit (produced by Evrogen) was used to carry out the reaction.

Gel electrophoresis. The gel was placed in a BioRad electrophoresis chamber, flooded with 0.5X TBE buffer until completely immersed. 2 µl of DNA samples (amplicons) were added to each well of the gel.

Purification of PCR products. After electrophoresis, the gel bands of interest to us, visualized with a UV lamp, were cut with a scalpel 2 mm wider than the bands on each side. Thermo Scientific GeneJET was used to isolate and purify the PCR sample. The purified PCR product was stored at -20°C. DNA quality was assessed using a NanoDrop 2000/2000c spectrophotometer.

Chapter 3. Results and discussion.

Morphometric analysis of populations.

A morphological comparison of *D. destructor* from potato tubers of three populations from the Russian Federation (Nizhny Novgorod, Bryansk and Moscow regions) was carried out and samples were collected from 13 settlements of 4 regions in Iran (Hamadan, Isfahan, Zanjan and Ardebil provinces) (Figure 1, 2). By studying morphological and morphometric characteristics of the species (Table 1 to 9), it can be seen that the morphometric characteristics of the nematodes given here for the regions of Hamedan, Isfahan, Zanjan and Ardebil are consistent with the data [Hashemi and Karegar., 2019] (Table 10). For the Nizhny Novgorod, Bryansk, and Moscow regions, there are some differences from those recorded for *D. destructor* [Thorne, 1945; Hooper, 1973; Chizhov et al., 2010] (Table 11).

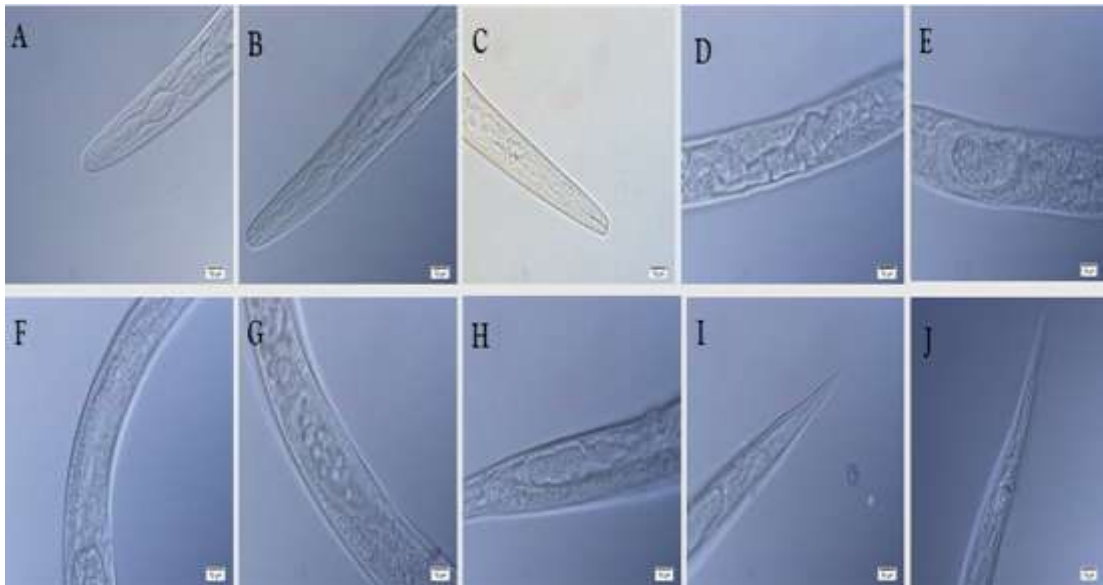


Figure 1.- Morphology of characteristic of *D. destructor* on the example of Russian populations. A. Female anterior region. B. Oesophagus. C. Stylet. D. crustaformeria. E. Egg. F. Pus. G. Spermatheca. H. Vulva to anus distance. I. Female tail. J. cloacal region

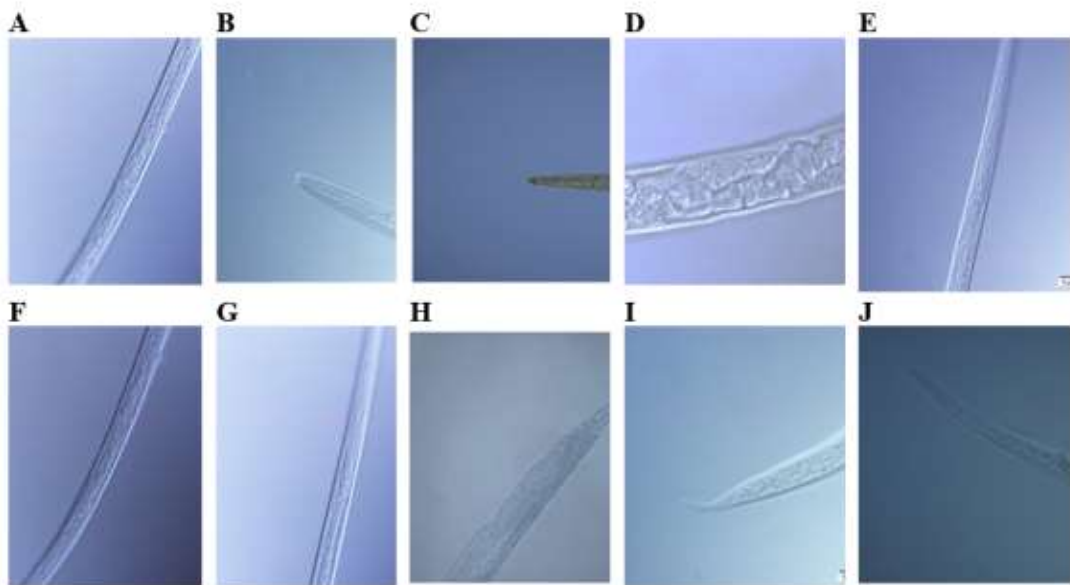


Figure 2.- Morphology of characteristic of *D. destructor* on the example of Iranian populations. A. Female anterior region. B. Oesophagus. C. Stylet. D. crustaformeria. E. Egg. F. Pus. G. Spermatheca. H. Vulva to anus distance. I. Female tail. J. cloacal region

Table 1.- Morphometry of *D. destructor* populations from the Russian Federation

	(♂) n=50	(♂) n=50	(♂) n=50	(♀) n=50	(♀) n=50	(♀) n=50
Parameter	Briansk	Moscow	Nizhny Novgorod	Briansk	Moscow	Nizhny Novgorod
Body L	(890-1340)	(835-1550)	(918-1350)	(900-1664)	(954-1600)	(916-1571)
Tail L	(64-80)	(63-79)	(65-81)	(63-80)	(63-81)	(62-81)
c (body L/tail L)	(14-17)	(14-20)	(14-16)	(15-20)	(16-20)	(15-20)
Stylet L	(10-13)	(10-14)	(10-14)	(10-14)	(10-14)	(10-14)
Pus	–	-	–	(95-120)	(95-125)	(95-112)
Pus/Anus-Vulva distance %	–	-	–	(54-90)	(53-88)	(55-86)
Spicule L	(20-24)	(20-25)	(20-25)	–	-	–
Bursa L	(37-58)	(34-62)	(39-79)	–	-	–
Tail shape	Rounded	Rounded	Rounded	Rounded	Rounded	Rounded

µm and minimum-maximum values (100 individuals)

Table 2.- Population morphometry of *D. destructor* samples from Iran, Hamedan Province

Parameter (♂) Hamedan n: 200	P1	P2	P3	P4
Body L	(650 -1100)	(600-1200)	(650-1000)	(730-1100)
Tail L	(50-63)	(50-80)	(54-65)	(53-70)
c (body L/tail L)	(13-18)	(12-15)	(12-16)	(14-16)
Stylet L	(9-12)	(9-12)	(9-12)	(8 -11)
Pus	–	–	-	-
Pus/Anus-Vulva distance %	–	–	-	-
Spicule L	(18-20)	(18-21)	(19-26)	(19-21)
Bursa L	(33-55)	(33-45)	(35-51)	(32-48)
Tail shape	Rounded	Rounded	Rounded	Rounded

P1-Hamedan, P2- Bahar, P3- Asad Abad, P4- Kabudarahang,

µm and minimum-maximum values (P1: 50, P2: 50, P3: 50, P4: 50 individuals Males)

Table 3.- Population morphometry of *D. destructor* samples from Iran, Isfahan Province

Parameter (♂) Isfahan n:200	P1	P2	P3	P4
Body L	(600-1250)	(637-1205)	(840-1200)	(600-1000)
Tail L	(45-76)	(52-71)	(67-80)	(51-67)
c (body L/tail L)	(14-17)	(13-17)	(13-15)	(12-15)
Stylet L	(9-12)	(9-12)	(9-11)	(9-11)
Pus	–	–	-	-
Pus/Anus-Vulva distance %	–	–	-	-
Spicule L	(18-21)	(19-27)	(19-21)	(18-21)
Bursa L	(33-52)	(33-56)	(31-56)	(33-52)
Tail shape	Rounded	Rounded	Rounded	Rounded

P1-Isfahan, P2- Mobarakeh, P3- Najafabad, P4- Felaverzhan,
 μ m and minimum-maximum values (P1: 50, P2: 50, P3: 50, P4: 50 individuals Males)

Table 4.- Population morphometry of *D. destructor* samples from Iran, Zanjan Province

Parameter (♂) Zanjan n: 200	P1	P2
Body L	(700-1200)	(850-1167)
Tail L	(50-66)	(61-75)
c (body L/tail L)	(14-19)	(14-16)
Stylet L	(9-12)	(9-11)
Pus	–	-
Pus/Anus-Vulva distance %	–	-
Spicule L	(18-23)	(19-27)
Bursa L	(33-56)	(35-58)
Tail shape	Rounded	Rounded

P1- Zanjan, P2- Soltaniye,
 μ m and minimum-maximum values (P1:100, P2: 100 individuals Males)

Table 5.- Population morphometry of *D. destructor* samples from Iran, Ardabil Province

Parameter (♂) Ardebil n: 200	P1	P2	P3
Body L	(750-1100)	(600-1205)	(640-1164)
Tail L	(57-75)	(44-73)	(47-72)
c (body L/tail L)	(13-15)	(14-17)	(14-17)
Stylet L	(9-12)	(8-13)	(8-13)
Pus	–	–	-
Pus/Anus-Vulva distance %	–	–	-
Spicule L	(18-27)	(19-24)	(18-26)
Bursa L	(33-50)	(35-55)	(33-56)
Tail shape	Rounded	Rounded	Rounded

P1- Ardabil, P2- Namin, P3- Nayer,
 µm and minimum-maximum values (P1: 100, P2: 50, P3:50 individuals Males)

Table 6.- Population morphometry of *D. destructor* samples from Iran, Hamedan Province

Parameter (♀) Hamedan n: 200	P1	P2	P3	P4
Body L	(875 -1110)	(809-1200)	(900-1400)	(980-1256)
Tail L	(54-71)	(78-83)	(55-64)	(81-85)
c (body L/tail L)	(14-16)	(11-15)	(17-22)	(12-15)
Stylet L	(8-13)	(9-13)	(8-12)	(8-12)
Pus	(53-98)	(53-89)	(53-90)	(53-87)
Pus/Anus-Vulva distance %	(48-71)	(42-87)	(55-91)	(44-75)
Spicule L	-	-	-	-
Bursa L	-	-	-	-
Tail shape	Rounded	Rounded	Rounded	Rounded

P1- Hamedan, P2- Bahar, P3- Asad Abad, P4- Kabudarahang,
 µm and minimum-maximum values (P1: 50, P2: 50, P3: 50, P4: 50 females)

Table 7.- Population morphometry of *D. destructor* samples from Iran, Isfahan Province

Parameter (♀) Isfahan n: 200	P1	P2	P3	P4
Body L	(800-1100)	(770-1300)	(700-1200)	(820-1310)
Tail L	(55-63)	(55-79)	(58-76)	(54-75)
c (body L/tail L)	(15-18)	(14-17)	(12-16)	(15-18)
Stylet L	(9-12)	(9-13)	(9-13)	(9-12)
Pus	(55-98)	(55-103)	(54-105)	(52-98)
Pus/Anus-Vulva distance %	(38-86)	(37-79)	(37-90)	(37-87)
Spicule L	-	-	-	-
Bursa L	-	-	-	-
Tail shape	Rounded	Rounded	Rounded	Rounded

P1- Isfahan, P2- Mobarakeh, P3- Najafabad, P4- Felaverzhan,
 μ m and minimum-maximum values (P1: 50, P2: 50, P3: 50, P4:50 individuals Females)

Table 8.- Population morphometry of *D. destructor* samples from Iran, Zanjan Province

Parameter (♀) Zanjan n: 200	P1	P2
Body L	(880-1200)	(700-1114)
Tail L	(65-76)	(58-80)
c (body L/tail L)	(14-16)	(12-14)
Stylet L	(9-13)	(8-13)
Pus	(55-86)	(58-88)
Pus/Anus-Vulva distance %	(45-86)	(37-87)
Spicule L	-	-
Bursa L	-	-
Tail shape	Rounded	Rounded

P1- Zanjan, P2- Soltaniye,
 μ m and minimum-maximum values (P1: 100, P2: 100 females)

Table 9.- Population morphometry of *D. destructor* samples from Iran, Ardabil Province

Parameter (♀) Ardebil n: 200	P1	P2	P3
Body L	(800-1200)	(760-1200)	(640-1300)
Tail L	(52-69)	(46-65)	(43-78)
c (body L/tail L)	(16-18)	(17-19)	(15-17)
Stylet L	(8-12)	(8-13)	(8-12)
Pus	(55-88)	(54-89)	(53-100)
Pus/Anus-Vulva distance %	(45-83)	(52-78)	(42-76)
Spicule L	-	-	-
Bursa L	-	-	-
Tail shape	Rounded	Rounded	Rounded

P1-Ardabil, P2- Namin, P3- Nayer

µm and minimum-maximum values (P1: 50, P2: 50, P3: 100 females)

Table 10.- Morphometry of *D. destructor* according to [Hashemi and Karegar., 2019]

Parameter	(♂)	(♀)
Body L	(600–1254)	(603–1468)
Tail L	(45–87.5)	(39.5–90.5)
c (body L/tail L)	(11.0–19.1)	(11.4–27.8)
Stylet L	(8.5–12)	(8–13)
Pus/Anus-Vulva distance %	-	(36.9– 92.6)
Spicule L	(18–28)	-
Tail shape	Rounded/Pointed	Rounded/Pointed

Table 11.- Morphometry of *D. destructor* according to [Thorne, 1945; Hooper, 1973 and Chizhov et al., 2010]

Parameter Author	♂			♀		
	Hooper (1973)	Thorne (1945)	Chizhov (2010)	Hooper (1973)	Thorne (1945)	Chizhov (2010)
Body L	(800-1900)	(750-1300)	(860-1370)	(800-1900)	(720-1440)	(1050-1630)
Tail L	-	-	(62-81)	-	-	(62-81)
c (body L/tail L)	(14-20)	(12-16)	(13.6-16.2)	(14-20)	(15-20)	(13.8-18.8)
Stylet L	(10-14)	(10)	(10-13)	(10-14)	(10)	(11-13)
Pus/Anus-Vulva distance %	-	-	-	(53-90)	-	-
Spicule L	(24-27)	(24)	(20-25)	-	-	-
Tail shape	Rounded	Rounded	-	Rounded	Rounded	-

As a result of studying the morphology of the populations, it was shown that all the studied populations belong to the species *D. destructor*. Although it was noted that the populations from Iran and Russia have minor differences in the size of individual characters, this variability does not affect the assignment of all populations to the species *D. destructor*.

Results of molecular studies

DNA sequence analysis of *Ditylenchus destructor*. From seven settlements in the Russian Federation and Iran, 350 units of nematodes were used for molecular analysis. After alignment (Mega software) and cleaning and editing sequences with BioEdit 7.0.5.3 software, we selected 56 sequences (meaning 8 sequences from each area), but we only submitted eight sequences from all areas to GenBank, and also from- for the volume of sequences, 3 in total for each region indicated in the result of the dissertation. and phylogenetic tree. A BLAST search at NCBI showed that all *D. destructor* DNA sequences from Russia and Iran obtained in this study matched the corresponding *D. destructor* sequences present in the database. Sequence analysis revealed sequence variability between different geographic populations of *D. destructor* isolated from different host plants like *Solanum tuberosum*, *Ipomoea batatas*, *Daucus carota subsp.*

Phylogenetic studies of *D. destructor* populations. Phylogenetic relationships within and between *Ditylenchus* species were estimated using the maximum likelihood method. Despite sequence variability, the phylogenetic tree strongly supports the grouping of all *D. destructor* sequences, even for populations of different geographic origins and different host plants. On the phylogenetic tree, *D. dipsaci* is used as sister species to *D. destructor* and *Xiphinema* for species identification.

The results of ITS-rRNA analysis revealed two main clades. The results of ITS-rRNA analysis revealed three main clades. Section I is divided into three subclasses. The first one consists of sequences from *D. dipsaci* populations, the second one from *D. destructor* sequences from Russian populations, and the third shows *D. destructor* populations from other countries.

The second section consists of *D. destructor* populations collected from regions of Iran that have the greatest similarity to populations in China. Section 3 shows the population outside the group (Figure 3). The results of our genetic analysis distinguish *D. destructor* from *D. dipsaci* and other recognized *Ditylenchus* species and are therefore consistent with previous studies.

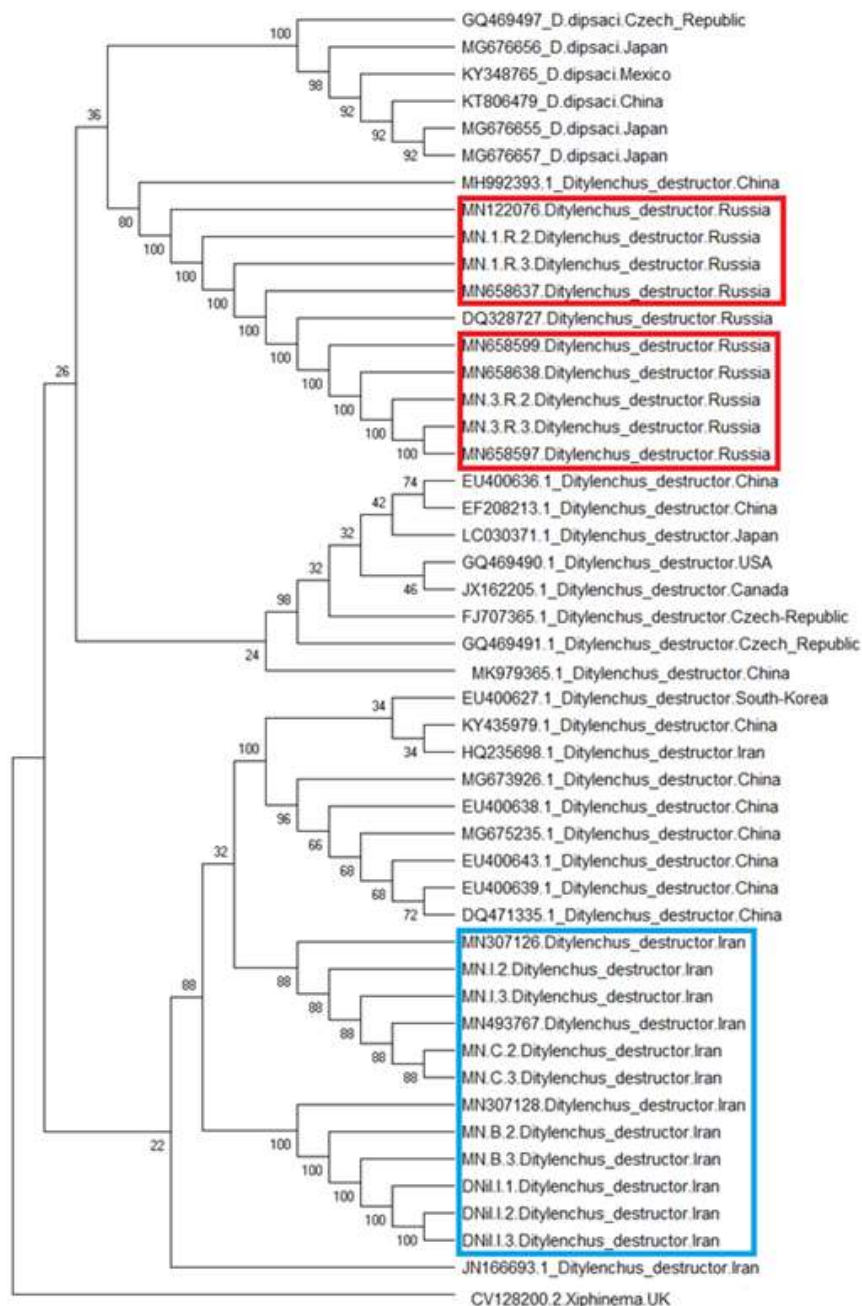


Figure 3.- Phylogenetic tree with studied populations and reference sequences (Red colors from Russia, Blue colors from Iran)

Development of species-specific primers. To design the first primer, named dsn.1 (Table 12), the mismatches code between *D. destructor* and two other species (*D. dipsaci* and *D. gigas*) were selected and aligned to get forward and reverse primers. The second primer, named dsn.2, was developed by NCBI-Primer design (Table 13) (Figure 4, 5). The reliability of primer specificity was tested on genomic DNA isolated from the studied populations. The standard conditions described for the PCR of the ITS regions were not changed for this particular amplification, except that the annealing temperature was changed. PCR amplification with species-specific primers yields a specific and distinct PCR product band for one adult for each of the studied geographic populations of *D. destructor* that were collected from the potato fields in our study. The specificity and reliability of the primers have also been demonstrated in vitro with *D. destructor*, *D. dipsaci* and *D. gigas*. Given the specificity, sensitivity, and reliability of primers for *D. destructor*, diagnostic primers can provide a fast and reliable method for identifying *D. destructor* individuals isolated from different host plants in different geographic regions. Based on the theoretically identified promising sequences, primers were designed and synthesized (Evrogen):

Table 12.- Description of species-specific primers dsn.1 F/R for the diagnosis of *D. destructor*

Primer.dsn.1 F/R	Subsequence	Annealing temperature	Product size (bp)
Forward	TTGGCACGTCTGATTCAGGG	60.3	397
Reverse	GTCAACATTGGCCAAGAGGC		

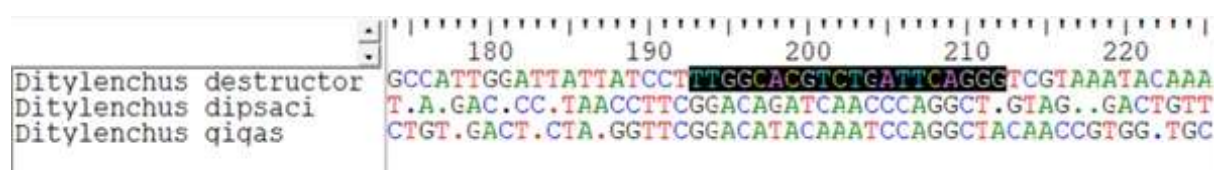


Figure 4.- Multiple sequence alignment of rDNA-ITS of *D. destructor* and other *Ditylenchus* species from GenBank used to design a species-specific forward primer (forward primer starts 193-212, reverse primer starts 318-299)

Table 13.- Description of species-specific primers dsn.2 F / R for diagnostics of *D. destructor*

Primer.dsn.2 F/R	Subsequence	Annealing temperature	Product size (bp)
Forward	TTTCGAATGCACATTGCGCC	57.7	330
Reverse	CTAGGCCAAAGAGACAGCGG		

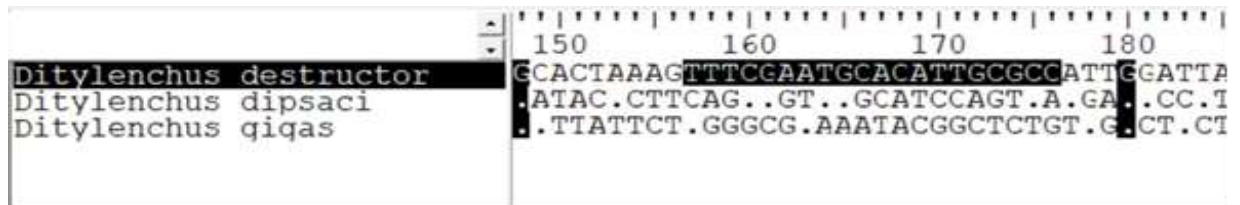


Figure 5.- Multiple sequence alignment of rDNA-ITS sequences from *D. destructor* and other *Ditylenchus* species from GenBank used to design a species-specific reverse primer (forward primer starts at 157-176, reverse primer starts at 281-262)

PCR with species-specific primers. The present study successfully developed a method to quantify *D. destructor* in potato tubers. The ITS sequences determined in this study were identical among nematodes collected from 7 different regions of the two countries, although the genetic diversity of *D. destructor* in sequence repeats between samples is relatively high. The NCBI database lists various sequences from various countries. These results suggest that the primer set developed in this study specifically amplifies the sequence present in *D. destructor* in all different regions. The method developed in the current study for PCR with species-specific primers overcomes this limitation and allows differentiation of target species. Compared to ITS-PCR-RFLP, this PCR approach reduces diagnostic time and costs.

New primer tests

Primer selectivity test. To assess the selectivity of species-specific primers, PCR amplification products were evaluated for various *D. destructor* populations amplified using two pairs of primers (ds.1F/R and dsn.2 F/R). A clear band was obtained, characterizing the 397 and 330 bp. fragment. (Figure 6-9). The method proved to be suitable for the clear identification of *D. destructor* DNA samples. The selectivity of specific primers was confirmed by obtaining the expected fragment sizes for all *D. destructor* populations, and no products were found for the tested populations of non-target *D. dipsaci* and *D. gigas* species.

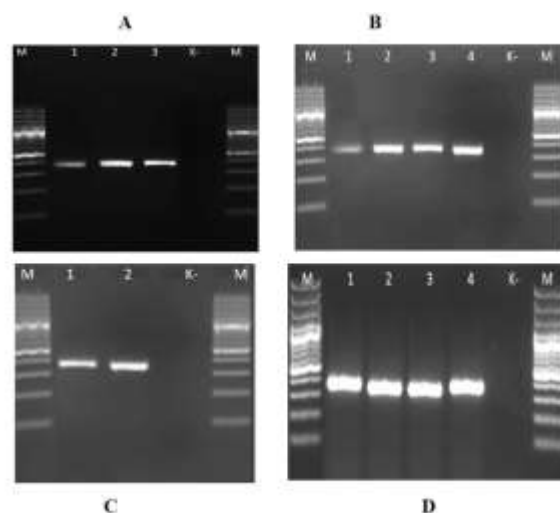


Figure 6.- Evaluation of the selectivity of a pair of primers dsn.1 F / R. for the diagnosis of *D. destructor* from different regions: A. Ardabil province; B. Isfahan Province; C. Zanjan province; D. Hamedan province; M: marker, K-: negative control (Different result band thickness may be for different DNA concentration)

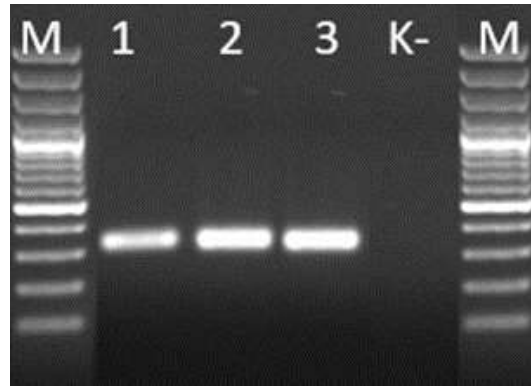


Figure 7.- Evaluate the selectivity of the dsn.1F/R primer pair. for the diagnosis of *D. destructor* from various regions: 1. Moscow region; 2. Nizhny Novgorod region; 3. Bryansk region; M: marker; K-: negative control (Different result band thickness may be for different DNA concentration)

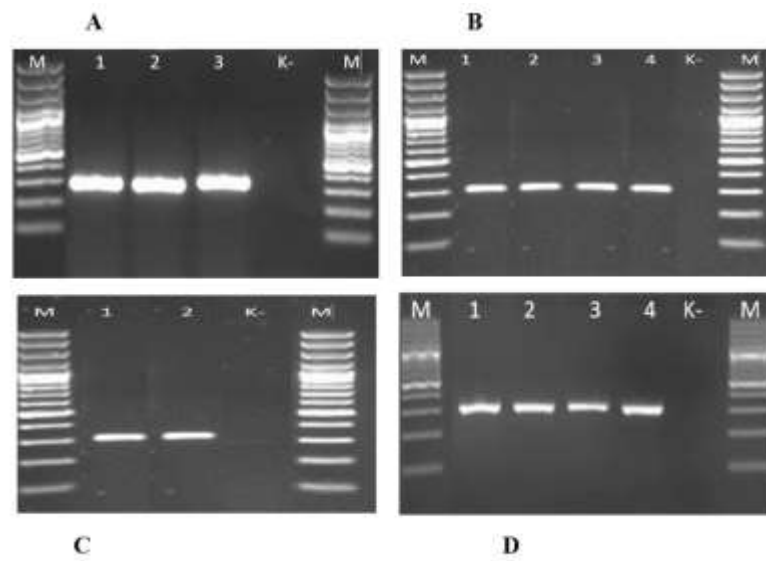


Figure 8.- Evaluation of the selectivity of a pair of primers dsn.2 F / R. for the diagnosis of *D. destructor* from different regions: A. Ardabil province; B. Isfahan Province; C. Zanzan province; D. Hamedan province; M: marker, K-: negative control (Different result band thickness may be for different DNA concentration)

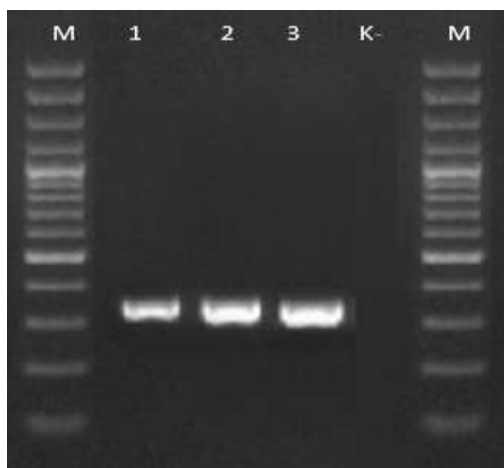


Figure 9.- Evaluate the selectivity of the dsn.2F/R primer pair. for the diagnosis of *D. destructor* from various regions: 1. Moscow region; 2. Nizhny Novgorod region; 3. Bryansk region; M: marker; K-: negative control (Different result band thickness may be for different DNA concentration)

Primer specificity test. The specificity of the method lies in the fact that it can be used to distinguish target species from closely related and morphologically similar species. In this work, DNA of three nematode species was used: *D. destructor* (target species), *D. dipsaci*, and *D. gigas*. The reaction is carried out in 4 repetitions. The results are shown in Figure 10, 11.

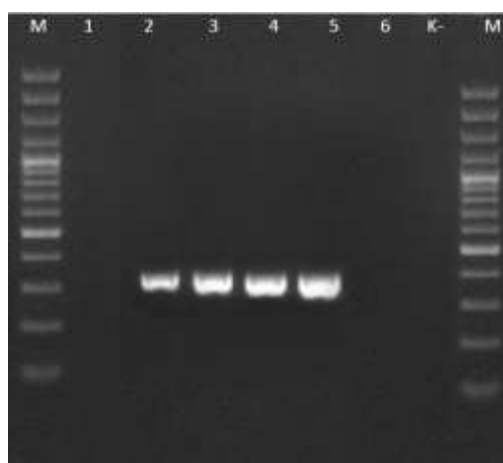


Figure 10.- Evaluation of the specificity of the created pairs of primers for *D. destructor*: 1. *D. dipsaci*; 2. Ardabil province; 3. Isfahan Province; 4. Zanzan province; 5. Hamadan province; 6. *D. gigas*; M: marker, K-: negative control (Different result band thickness may be for different DNA concentration)

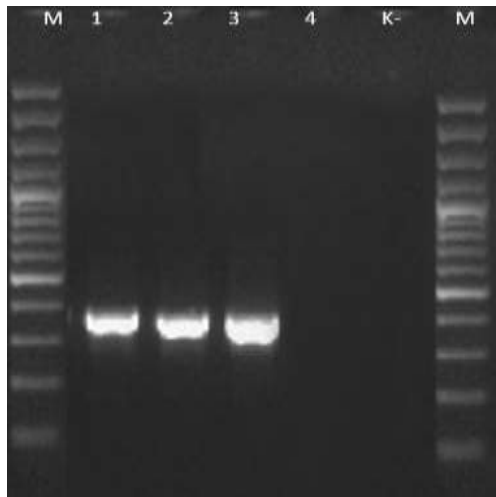


Figure 11.- Evaluation of the specificity of the generated primer pairs for *D. destructor*; 1. Moscow region; 2. Nizhny Novgorod region; 3. Bryansk region; 4. *D. dipsaci*; K-: negative control; M: Marker (Different result band thickness may be for different DNA concentration)

Primer sensitivity test. The analytical sensitivity of PCR is the minimum amount of DNA from a target that can be reliably identified using this method. To assess the specificity of PCR on new examples, a series of dilutions of *D. destructor* DNA was prepared: approximately 1 ng, 5 ng, 50 ng, 100 ng. The reaction was carried out in 4 repetitions, in each of which similar results were obtained (Figure 12, 13). It was found that the analytical sensitivity of the method with new primers is 1 ng of DNA for dsn.1 F/R and 5 ng of DNA for dsn.2 F/R. Like the first pair of primers, dsn.1 has a more specific identification.

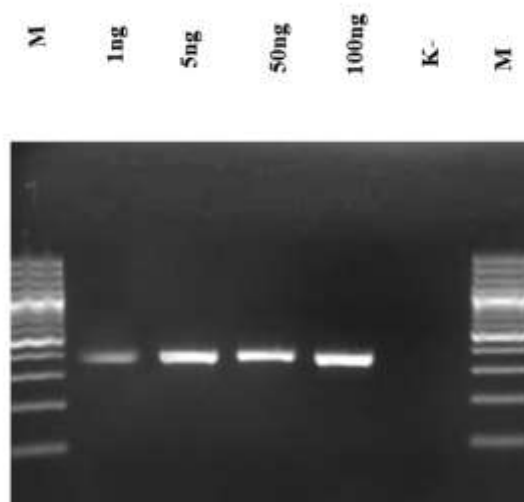


Figure 12.- Evaluation of the sensitivity of a pair of dsn.1 F/R primers with different amounts of *D. destructor* DNA. One of 4 similar repetitions. M: DNA marker, K-: negative control (Different thickness of the result band may be for a different concentration of DNA)

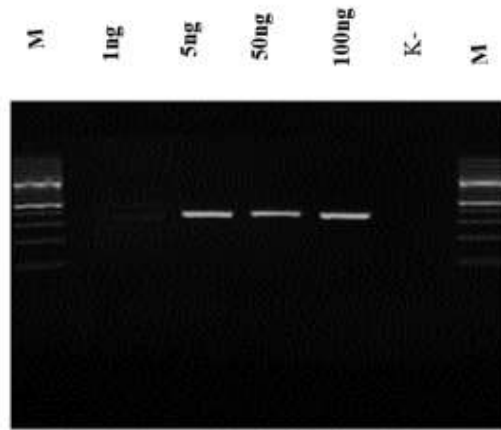


Figure 13.- Evaluation of the sensitivity of a pair of dsn.2 F/R primers with different amounts of *D. destructor* DNA. One of 4 similar repetitions. M: DNA marker, K-: negative control (Different thickness of result band may be for different concentration of DNA)

CONCLUSIONS

- As a result of studying the morphological variability of *D. destructor* populations, it was shown that all the studied populations belong to the *D. destructor* species, despite the fact that it was reported that Iranian and Russian populations had minor differences in traits; In female's features: the longest body length, stylet length, and pus belong to Russian populations and the longest tail length, c (body length /tail length) and pus/anus-vulva distance % belong to Iranian populations. In male's features: the longest body length, tail length, stylet length, bursa length and c (body length /tail length) belong to Russian populations and the longest spicule length belongs to Iranian populations.
- NCBI GenBank has been supplemented with sequences (codes: MN122076, MN307126, MN307128, MN493767, MN658597, MN658599, MN658637, MN658638), which is a contribution to expanding the world's public knowledge about the genetic diversity of the *D. destructor* species.
- According to the phylogenetic tree, the sequences of our Iranian populations were very similar to the *D. destructor* samples founded in China and our Russian populations were similar to the other Russian *D. destructor* populations that identified previously by other researchers.
- To determine which species belong to the genus *Ditylenchus*, two new pairs of species-specific primers (dsn.1 F/R and dsn.2 F/R) are proposed. It was demonstrated that the unique the primer pairs dsn.1 F/R and dsn.2 F/R were highly effective at identifying *D. destructor*. The new primers dsn.1 F/R and dsn.2 F/specificity for *D. destructor* was demonstrated, as well as their lack of false-positive reactions for *Ditylenchus* species that are related to each other closely, *D. dipsaci* and *D. gigas*.
- It was found that the analytical sensitivity of the method with new primers is 1 ng of DNA for dsn.1 F/R and 5 ng of DNA for dsn.2 F/R. Like the first pair of primers, dsn.1 has a more specific identification.

List of works published by the author on the topic of the dissertation:

Articles in publications indexed by Scopus and Web of Science

1. **Niloufar Mahmoudi**, Mikhail Pridannikov, Meisam Zargar, Yousef Naserzadeh, Liudmila Limantceva, Elena Pakina. Molecular diagnostics of *Ditylenchus destructor* based on the ITS-rDNA from Iran and Russia Federation. Research on Crops. March 2020, DOI: 10.31830/2348-7542.2020.025.
2. **Niloufar Mahmoudi**, Mikhail Pridannikov, Yousef Naserzadeh, Elena Pakina, Albert Engeribo, Liudmila Limantceva and Anton Ivanov. Developing PCR primers for identification of potato rot nematode (*Ditylenchus destructor*) in the Russian Federation and Iran. Research on Crops. December 2020, DOI: 10.31830/2348-7542.2020. 124.

Articles published in VAK

1. **Niloufar Mahmoudi**, Davoud K. Nejad, Fatemeh Shayanmehr. A new primer set for amplification of ITS-rDNA in *Ditylenchus destructor*. RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries. May2020, DOI 10.22363/2312-797X-2020-15-2-151-159, UDC 633.491:632.651:577.21.
2. **Niloufar Mahmoudi**, Yousef Naserzadeh, Elena Pakina, Liudmila Limantceva, Davoud Kartuli Nejad, Molecular identification of *Ditylenchus destructor* nematode with PCR Species-Specific primers in the Moscow region. RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries. December 2019, DOI: 10.22363/2312-797X-2019-14-4-430-436.
3. **Niloufar Mahmoudi**, Elena Pakina, Liudmila Limantceva, Anton Vladislavovich Ivanov. Diagnosis of potato rot nematode (*Ditylenchus destructor*) using PCRRFLP, RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries. DOI 10.22363/2312-797X-2020-15-4-353–362.

Scientific conferences

1. **Niloufar Mahmoudi**, Yousef Naserzadeh, Elena Pakina. The occurrence of *Ditylenchus destructor* nematode on potato in Iran. July 2020. International Scientific Forum SCIENCE AND INNOVATION – MODERN CONCEPTS. НАУКА И ИННОВАЦИИ- СОВРЕМЕННЫЕ КОНЦЕПЦИИ. Moscow. Russia. ISBN 978-5-905695-59-9.
2. **Niloufar Mahmoudi**, Yousef Naserzadeh, Elena Pakina. DISCOVERY OF POTATO TUBER NEMATODE (*DITYLENCHUS DESTRUCTOR*) IN THE MOSCOW REGION. Symposium, XIII International Nematological Symposium "Nematodes and other Ecdysozoa under changing environments", Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, July 29, 2019 – August 4, 2019.
3. **Niloufar Mahmoudi**, Mikhail Pridannikov, Elena Pakina. Development of new test systems for molecular genetic identification *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945. WORLD SCIENCE: PROBLEMS AND INNOVATIONS, April 30,2021.

ABSTRACT

COMPARATIVE MORPHOMETRIC ANALYSIS OF NEMATODES *DITYLENCHUS DESTRUCTOR* THORNE, 1945 POPULATIONS OF IRANIAN AND RUSSIAN ORIGIN AND DEVELOPMENT OF NEW TEST SYSTEMS FOR THEIR MOLECULAR GENETIC IDENTIFICATION

The main source of the appearance of *Ditylenchus* in the fields is infected planting material. The use of phytoparasitic-free seed potatoes reduces the infection load in the fields. To reduce the risk of infection in new fields, seed tubers should be pre-tested. An important component in this process is the exact species identification of *Ditylenchus* species on potatoes. In this regard, an urgent problem is the development of fast and accurate molecular test systems for the identification of harmful species of stem and root nematodes. The present research aims to develop new primers sets. Two pairs of primers, dsn.1 F/ R and dsn.2 F/ R, have been developed. Their analytical sensitivity, efficiency and specificity are shown. The proposed techniques are for rapid diagnosis of *D. destructor* nematodes. Designing specific primers for study populations could be a useful tool to help life scientists expand and continue their research.

АННОТАЦИЯ

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НЕМАТОД *DITYLENCHUS DESTRUCTOR* THORNE, 1945 ПОПУЛЯЦИЙ ИРАНСКОГО И РОССИЙСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И РАЗРАБОТКА НОВЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ИХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ

Основным источником появления дитиленхов на полях является зараженный посадочный материал. Использование очищенного от фитопаразитов семенного картофеля снижает инфекционную нагрузку на поля. Чтобы снизить риск заражения на новых полях, семенные клубни следует предварительно тестировать. Важным компонентом в этом процессе является точная видовая идентификация видов *Ditylenchus* на картофеле. В связи с этим актуальной проблемой является разработка быстродействующих и точных молекулярных тест-систем для идентификации вредоносных видов стеблевых и гниlostных нематод. Настоящее исследование направлено на разработку новых наборов праймеров. Были разработаны две пары праймеров, dsn.1 F/R и dsn.2 F/R. Показаны их аналитическая чувствительность, эффективность и специфичность. Предлагаемые методы предназначены для экспресс-диагностики нематод *D. destructor*. Разработка конкретных праймеров для изучаемых популяций может стать полезным инструментом, помогающим ученым-биологам расширять и продолжать свои исследования.

На правах рукописи

МАХМУДИ НИЛУФАР

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НЕМАТОД *DITYLENCHUS DESTRUCTOR* THORNE, 1945 ПОПУЛЯЦИЙ ИРАНСКОГО И РОССИЙСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И РАЗРАБОТКА НОВЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ИХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ

Специальности 4.1.3 Агрехимия, агропочвоведение, защита и карантин растений

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в агробиотехнологическом департаменте Аграрно-технологического института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (АТИ РУДН)

Научный руководитель:

доктор сельскохозяйственных наук,
Доцент Агробиотехнологического департамента
АТИ РУДН

Пакина Елена Николаевна,

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник ФГБУН
Института экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН

Перевертин Кирилл Александрович

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник лаборатории паразитологии животных и растений Института
биологии Карельского научного Центр РАН

Лебедева Дарья Ивановна

Ведущая организация:

Федеральный исследовательский центр картофелеводства им. А. Г. Лорха

Защита диссертации состоится «26» Декабря 2022 г. в 12-00 часов на заседании диссертационного совета ПДС 2021.002 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН) по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.8, корп.2 в аудитории 423.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке в УНИБЦ (Научной библиотеке) ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН) по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.6 и на сайте <https://www.rudn.ru/science/dissovet>.

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета ПДС 2021.002
кандидат сельскохозяйственных наук

Введенский Валентин Валентинович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Потери от болезней и вредителей сегодня значительны во всем мире, при этом одним из трудно контролируемых объектов являются нематоды, поражающие большой набор растений-хозяев. Среди многообразия нематод следует выделить род *Ditylenchus* Filipjev, 1936, который состоит из более чем 90 описанных видов. Наиболее важное хозяйственное значение среди нематод рода *Ditylenchus* имеют виды: *D. destructor*, стеблавая нематода картофеля; *D. dipsaci*, стеблевая нематода лука; *D. angustus*, стеблевая нематода риса и *D. gigas*, стеблевая нематода бобовых. Однако, точное обнаружение и идентификация видов *D. destructor* и *D. dipsaci* очень важна, так как во многих странах мира эти два вида являются объектом карантина. В отличие от морфометрических методов, идентификация нематод с использованием различных молекулярных инструментов обеспечивает точную и быструю диагностику исследуемых видов. Основные современные проблемы картофелеводства, связаны с контролем качества семенного материала, отсутствием надлежащего севооборота, а в ряде стран и отсутствием доступа к соответствующим технологиям производства. Так с 2010 г. распространение и размер ущерба, наносимого данным видом нематод в РФ ежегодно увеличиваются. По оценкам, около 40 тысяч гектар товарного картофеля в настоящее время сильно заражены *D. destructor*.

Обычно, на заселенных нематодой территориях собранный урожай картофеля дает до 5% зараженных клубней. Чрезмерный полив, приводящий к высокому уровню влажности, может усилить инфекцию, в результате чего процент инфицированных клубней повышается до 10% и более, а в последующем инфекция нарастает в геометрической прогрессии. Из-за зараженного посадочного материала в Центральном и Приволжском регионах Российской Федерации в 2015-2019 годах потери урожая составили около 30%. В Иране большинство картофельных полей в центральных и западных регионах заражены *D. destructor* и потеряли часть урожая. Для принятия своевременных мер по обнаружению и недопущению распространения паразитических нематод крайне важна их точная идентификация. Однако, известные в настоящее время молекулярные методы диагностики *D. destructor*, в отличие от идентификации близкородственного вида *D. dipsaci*, не вполне надёжны, так как не всегда дают стабильный результат.

Степень разработанности темы. Классическая идентификация нематод основана на морфологических и анатомических различиях с использованием микроскопического анализа изображений. Морфологическая идентификация относится к более дешевым методам идентификации и помогает связать морфологию с возможной функцией и является важным инструментом для морфологов. Хотя наиболее эффективны для нематод, которые имеют явные различия, нематоды, которые имеют тонкие морфологические и морфометрические различия, такие как длина тела, наличие и форма стилета, Форма кончика хвоста и т. д., трудно различимы морфологически. Морфологическая идентификация нематод рода *Ditylenchus* требует таксономической экспертизы и может быть сложной задачей, если образцы содержат смешанные виды. Морфология также может быть изменена из-за различий в географическом местоположении, растении-хозяине, питании и других факторах окружающей среды, как это наблюдается у некоторых свободноживущих и паразитирующих на растениях нематод. Короче говоря, неспециалистам может быть трудно идентифицировать виды нематод с высоким уровнем достоверности только на основе морфологии, и для точной идентификации может потребоваться интеграция данных о суборганизмах, таких как последовательность ДНК. Для идентификации

нематод было разработано множество форм методов на основе ДНК. Их можно разделить на методы, основанные на отпечатках пальцев и нуклеотидах. Методы на основе отпечатков пальцев могут включать полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (RFLP), полиморфизм длин амплифицированных фрагментов (AFLP), случайную амплификацию полиморфной ДНК (RAPD) и использование видоспецифичных праймеров, которые зависят от наличия/отсутствия ПЦР-амплификации. Каждый из этих методов имеет свои преимущества и/или недостатки по сравнению с другими методами идентификации нематод, основанными на ДНК или другими методами. Среди этих методов идентификации видоспецифическая ПЦР нам выгодна своей простотой, быстротой, специфичностью, отсутствием необходимости в дорогостоящем оборудовании и высокой квалификации специалистов для проведения анализа. Есть несколько универсальных праймеров для этих методов, которые можно использовать для идентификации *Ditylenchus destructor*. Однако универсальная грунтовка – это покрытие общего назначения, подготавливающее поверхность к последующему покрытию. Выбор подходящих праймеров, вероятно, является самым важным фактором, влияющим на полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Специфическая амплификация намеченной мишени требует, чтобы праймеры не совпадали с другими мишенями в определенных ориентациях и на определенных расстояниях, которые допускают нежелательную амплификацию. Таким образом, в этом исследовании были разработаны две пары новых праймеров для повышения селективности и чувствительности анализа для популяций обеих стран.

Цель. Целью настоящей работы стало исследование географически удалённых популяций *D. destructor*, разработка нового диагностического метода видоспецифической ПЦР, а также апробация и усовершенствование известных методов диагностики.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

- Получить и проанализировать данные морфометрической изменчивости популяций *D. destructor* из РФ и Ирана.
- Исследовать генетическую изменчивость популяций *D. destructor*.
- Разработать два набора пар новых видоспецифических праймеров для молекулярной диагностики *D. destructor*.
- Оценить селективность разработанных праймеров.
- Оценить чувствительность разработанных праймеров.

Объектом исследования. Целью данной работы было изучение географически удаленных популяций *D. destructor* и на основе этих данных разработка новых диагностических ПЦР-праймеров, а также апробация и усовершенствование видоспецифического метода диагностики.

Предметом исследования. Собран и проанализирован полученный материал, обработаны и интерпретированы данные. Новые праймеры были разработаны для идентификации *Ditylenchus destructor* в период с 2018 по 2022 год.

Научная новизна.

1. Впервые проведен сравнительный морфометрический и генетический анализ популяций *D. destructor* российского и иранского происхождения

2. Разработаны два набора пар новых видоспецифических праймеров для молекулярной диагностики популяций *D. destructor* из России и Ирана.

3. Доказана высокая чувствительность и селективность новых праймеров dsn.1 F/R и dsn.2F/R для идентификации *D. destructor*.

Теоретическая и практическая значимость. Проведенный сравнительный морфологический и генетический анализ нематод *D. destructor* показал незначительные морфологические различия между нематодами иранских и российских популяций, при этом генетический анализ выявил близость иранских нематод к китайским популяциям. Разработаны новые видоспецифичные для *D. destructor* праймеры. Доказана их аналитическая чувствительность, эффективность и специфичность. Предложенные методы могут быть использованы для быстрой диагностики нематод вида *D. Destructor* из различных регионов происхождения, что позволит избежать ошибок при идентификации подкарантинных объектов.

Методология и методы исследования. Выделение ДНК из исследуемых материалов проводили путем обработки образцов протеиназой К с последующим удалением белка без экстракции органическими растворителями с использованием набора ДНК Экстран-2, номер набора НГ-511-100 (Синтол), Российская Федерация) в соответствии с инструкциями производителя. Экстракты ДНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Исследовали образцы из России и Ирана и выделенную ДНК. Секвенирование проводили на генетическом анализаторе ABI-3500 (Applied Biosystems, США). Веб-сайт Национального центра биотехнологической информации (NCBI) BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) провел первоначальное сравнение результатов образцов с базой данных генетических последовательностей GenBank. Последовательности были проверены, выровнены и отредактированы с помощью BioEdit v.7.0.5. 3. В BioEdit последовательности были сопоставлены с дополнительными последовательностями, собранными из GenBank.

Положения, выносимые на защиту:

- Получение и анализ морфометрической изменчивости популяций *D. destructor* из России и Ирана
- Изучение генетической изменчивости популяций *D. destructor*
- Разработать два набора пар новых видоспецифичных праймеров для молекулярной диагностики *D. destructor*
- Испытание на селективность праймера
- Тест на чувствительность грунтовок

Степень достоверности и апробации результатов. Результаты диссертационной работы были представлены на следующие мероприятия: Симпозиум, XIII Международный нематологический симпозиум «Нематоды и другие экдизозоа в условиях изменяющихся условий среды», Карельский научный центр РАН. Нижний Новгород (июль – август 2019 г.). Международный научный форум НАУКА И ИННОВАЦИИ – СОВРЕМЕННЫЕ КОНЦЕПЦИИ. НАУКА И ИННОВАЦИИ- СОВРЕМЕННЫЕ КОНЦЕПЦИИ. Россия (Москва, июль 2020 г.); Международный научный форум НАУКА МИРА: ПРОБЛЕМЫ И ИННОВАЦИИ. Россия (апрель 2021 г.).

Личный вклад автора диссертации. Заявитель участвовал в постановке цели и задач исследования; собирал и анализировал полученный материал, обрабатывал и интерпретировал данные, готовил публикации в соавторстве. Диссертационная работа является результатом

исследований, проведенных автором на Агробиотехнологическом факультете АТИ РУДН и на базе «Всероссийского центра карантина растений в 2018–2022 гг.».

Список литературы. Включают 123 наименования: справочники и нормативные документы, диссертации и авторефераты, книги и статьи на английском языке, онлайн и оффлайн ресурсы.

Апробация результатов исследования. по теме диссертации опубликовано 8 статей, из них 2 Scopus, 3 в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК, 2 тезиса конференций и 1 симпозиум.

Структура диссертационного исследования. Диссертация изложена на 108 страницах, состоит из введения, трёх глав, выводов и приложений, содержит 20 таблиц и 24 рисунков. Список литературы включает 123 источников на иностранных языках и один на русском.

Благодарности

Автор благодарит Приданников Михаил Викторович, к.б.н. ведущий научный сотрудник, заведующий Лабораторией фитопаразитологии Центр паразитологии, Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова Российской академии наук, а также за неоценимый вклад в доработку русскоязычной версии диссертации.

II. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Во **введении** Обоснована актуальность и научная новизна исследования, сформулированы цель и задачи, а также положения, выносимые на защиту.

Глава 1. Обзор литературы. В этой главе рассматривается объект исследований - нематода *Ditylenchus destructor*, ее характеристики и морфология. Представлена информация о существующих методах молекулярного обнаружения и применении новых разработок для идентификационного анализа и сравнения различных популяций нематод из Российской Федерации и Ирана.

Глава 2. Материалы и методы.

Для проведения молекулярных измерений использовали 50 нематод из каждой популяции.

Выделение ДНК.

Все процедуры выполнены по стандарту ВНИИКР или другим стандартам с использованием набора реагентов [EPPO protocol, 2017].

Секвенирование и филогенетический анализ. Для проведения секвенирования и дальнейшего филогенетического анализа использовали продукт ПЦР с новыми праймерами с последующим разделением в 1% агарозном геле. Амплифицированный продукт ПЦР, полученный после очистки с помощью набора для экстракции из геля Thermo Scientific GeneJET, секвенировали с помощью дидезокси-цикла Сенгера с помощью Genetic Analyzer AB-3500 (Applied Biosystems, США). Далее проводили сравнение результатов секвенирования с базой

данных генетических последовательностей GenBank на веб-сайте NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Дизайн праймеров.

Восемь ITS-последовательностей *D.destructor*, амплифицированных в этом исследовании, были депонированы в базе данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) под номерами MN122076, MN307126, MN307128, MN493767, MN658597, MN658599, MN65388637, MN658599. Для дизайна видоспецифичных праймеров были использованы эти последовательности и другие исходные последовательности, полученные из изученных популяций, а также последовательности, депонированные в базе данных NCBI другими исследователями для *D. destructor*: GQ469492, GQ469491; *D. dipsaci* MG676655, MG676656, MG676657. Кроме того, ряд последовательностей *D. gigas* KJ653270, KJ653267 был использован для выравнивания из-за их тесного генетического родства с *D. destructor*.

Нуклеотидные последовательности рДНК-ITS были выровнены с помощью BioEdit7.0.5.3 для поиска консервативных областей. Сконструированные праймеры dsn.1 F / R должны обеспечивать амплификацию фрагмента длиной 397 п.н. и dsn.2 F / R размером 330 п.н. Дизайн праймера был подтвержден с помощью BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), чтобы исключить неспецифические реакции с другими близкородственными видами. Дополнительно качество праймеров оценивали с помощью программного обеспечения Oligo 6.0.

ПЦР с видоспецифическими праймерами.

Для проведения реакции использовали коммерческий набор Master mix (производства «Евроген»).

Гель-электрофорез.

Гель помещали в камеру для электрофореза BioRad, заливали буфером 0,5X TBE до полного погружения. Вносили по 2 мкл образцов ДНК (ампликонов) в каждую лунку геля. Для определения размера ампликонов в крайние лунки добавляли маркер («DNA ladder») на 1500 пар нуклеотидов. Электрофорез проводили при напряжении 150 В в течение 30-60 минут при комнатной температуре. Результаты визуализировали с помощью гель-документирующей системы BioRad с УФ-детектором с использованием программного обеспечения GDS Version 3.32.

Очистка продуктов ПЦР.

После электрофореза интересующие нас полосы геля, визуализированные с помощью УФ-лампы, вырезали скальпелем на 2 мм шире полосы с каждой стороны. Для выделения и очистки образца ПЦР использовали Thermo Scientific GeneJET. Очищенный продукт ПЦР хранили при -20 ° С. Качество ДНК оценивали с помощью NanoDrop 2000/2000c спектрофотометр, для этого наносили 1 мкл каждого образца на анализатор предварительно

откалиброванного (по дистиллированной воде) прибора. Обработка каждого образца проводилась автоматически.

Глава 3. Результаты и обсуждение

Морфометрический анализ популяций.

Проведено морфологическое сравнение *D. destructor* из клубней картофеля трех популяций из Российской Федерации (Нижегородская, Брянская и Московская области) и отобраны образцы из 13 населенных пунктов 4 регионов Ирана (провинции Хамадан, Исфахан, Зенджан и Ардебиль) (рисунок 1, 2). Изучая морфологические и морфометрические характеристики видов (таблица 1- 9), можно увидеть, что приведенные здесь морфометрические характеристики нематод для районов Хамадан, Исфахан, Зенджан и Ардебиль согласуются с данными [Хашеми и Карегар. , 2019] (таблица 10). Для Нижегородской, Брянской и Московской областей имеются некоторые отличия от отмеченных для *D. destructor* [Торн, 1945; Хупер, 1973; Чижов и др., 2010] (таблица 11).

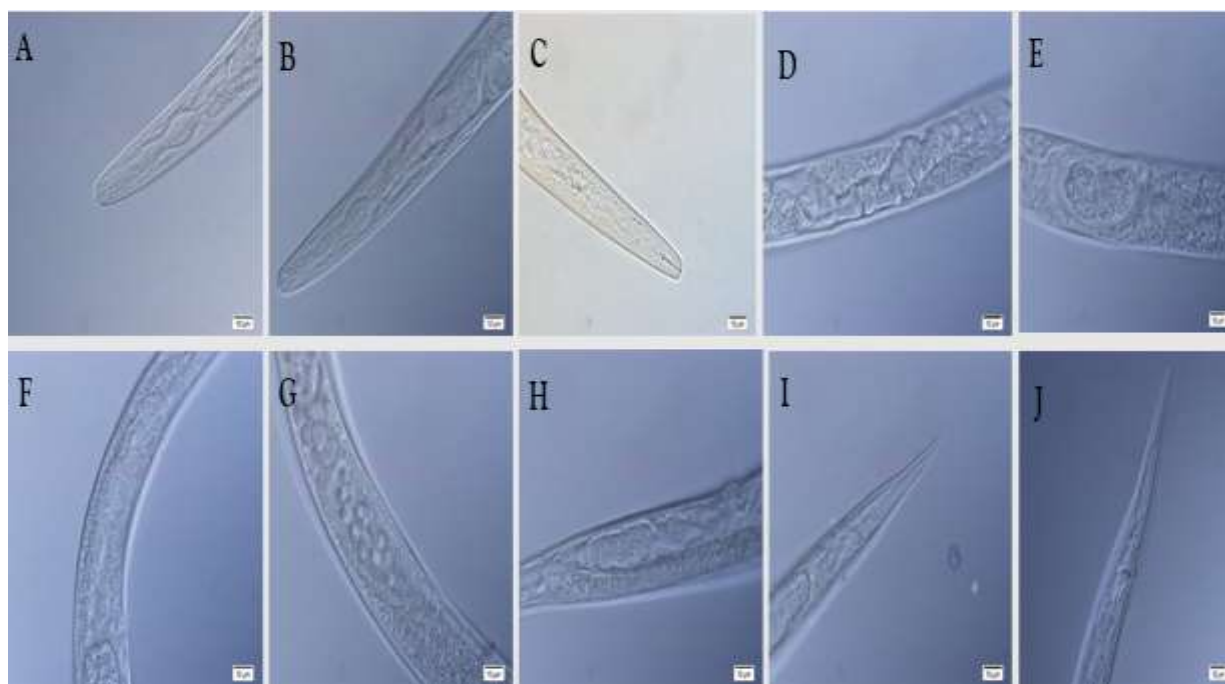


Рисунок 1.- Морфология особей *D. destructor* на примере Московской популяции. А. головной конец. В. глотка. С. стилет. D. крустаформерия. Е. Яйцо внутри тела самки. F. PUS (поствульварный часть маточного мешка). G. Сперматека. H. Область анус-вульва. I. Хвост самки. J. Хвост самца

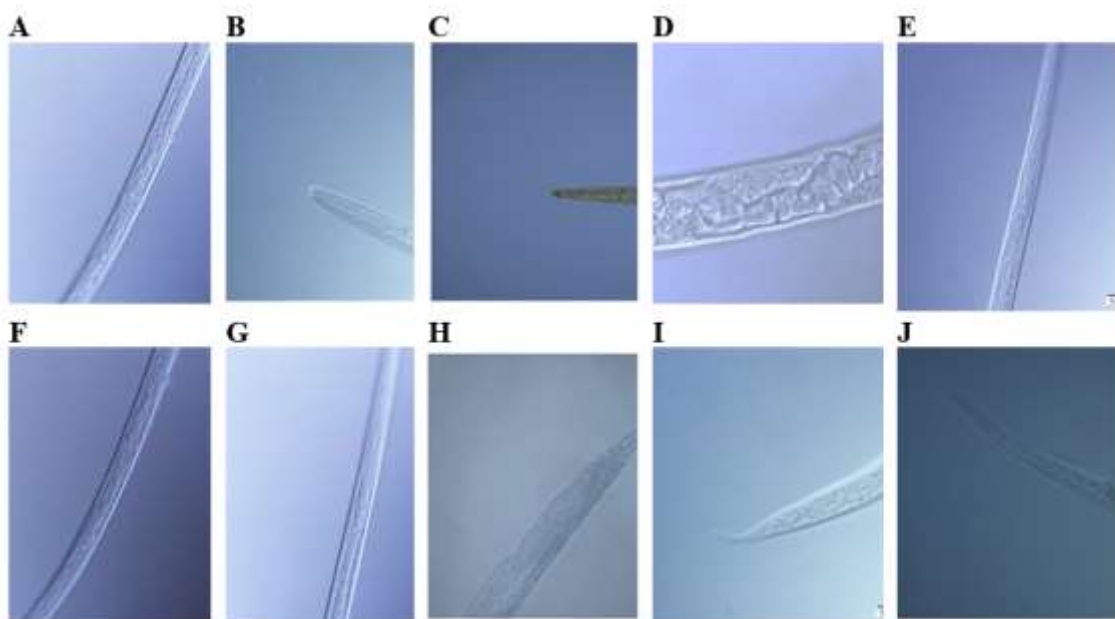


Рисунок 2.- Морфология характерных особей *D. destructor* на примере Иранские популяции. А. головной конец. В. глотка. С. стилет. D. крустаформерия. Е. Яйцо внутри тела самки. F. PUS (поствульварный часть маточного мешка). G. Сперматека. H. Область анус-вульва. I. Хвост самки. J. Хвост самца

Таблица 1.- Морфометрия популяций *D. destructor* из Российской Федерации

	(♂) n=50 Брянск	(♂) n=50 Москва	(♂) n=50 Нижний Новгород	(♀) n=50 Брянск	(♀) n=50 Москва	(♀) n=50 Нижний Новгород
Длина тела	(890-1340)	(835-1550)	(918-1350)	(900-1664)	(954-1600)	(916-1571)
Длина хвоста	(64-80)	(63-79)	(65-81)	(63-80)	(63-81)	(62-81)
c (длина тела/ длина хвоста)	(14-17)	(14-20)	(14-16)	(15-20)	(16-20)	(15-20)
Длина стилета	(10-13)	(10-14)	(10-14)	(10-14)	(10-14)	(10-14)
PUS(поствульварный часть маточного мешка)	–	-	–	(95-120)	(95-125)	(95-112)
PUS/расстояние вульва-анус, %	–	-	–	(54-90)	(53-88)	(55-86)
Длина Спикулы	(20-24)	(20-25)	(20-25)	–	-	–
Длина бурсы (в% от длина хвосты)	(37-58)	(34-62)	(39-79)	–	-	–
Форма кончика хвоста	Закругленный	Закругленный	Закругленный	Закругленный	Закругленный	Закругленный

мкм и минимально-максимальные значения (100 особей)

Таблица 2.- Морфометрия популяций *D. destructor* образцы из Ирана, Провинция Хамедан

Параметр (♂) мкм (n: 200)	P1	P2	P3	P4
Длина тела	(650 -1100)	(600-1200)	(650-1000)	(730-1100)
Длина хвоста	(50-63)	(50-80)	(54-65)	(53-70)
c (длина тела/ длина хвоста)	(13-18)	(12-15)	(12-16)	(14-16)
Длина стилета	(9-12)	(9-12)	(9-12)	(8 -11)
PUS(поствувльварный часть маточного мешка)	–	–	-	-
PUS/расстояние вульва-анус, %	–	–	-	-
Длина Спикулы	(18-20)	(18-21)	(19-26)	(19-21)
Длина бурсы (в% от длина хвосты)	(33-55)	(33-45)	(35-51)	(32-48)
Форма кончика хвоста	Закругленный	Закругленный	Закругленный	Закругленный

P1 - Хамедан, P2 - Бахар, P3- Асад-Абад, P4 - Кабудараханг,
мкм и минимально-максимальные значения (P1: 50, P2: 50, P3: 50, P4: 50 особей, самцы)

Таблица 3.- Морфометрия популяций *D. destructor* образцы из Ирана, Провинция Исфахан

Параметр (♂), мкм (n:200)	P1	P2	P3	P4
Длина тела	(600-1250)	(637-1205)	(840-1200)	(600-1000)
Длина хвоста	(45-76)	(52-71)	(67-80)	(51-67)
c (длина тела/ длина хвоста)	(14-17)	(13-17)	(13-15)	(12-15)
Длина стилета	(9-12)	(9-12)	(9-11)	(9-11)
PUS(поствувльварный часть маточного мешка)	–	–	-	-
PUS/расстояние вульва-анус, %	–	–	-	-
Длина Спикулы	(18-21)	(19-27)	(19-21)	(18-21)
Длина бурсы (в% от длина хвосты)	(33-52)	(33-56)	(31-56)	(33-52)
Форма кончика хвоста	Закругленный	Закругленный	Закругленный	Закругленный

P1 - Исфахан, P2 - Мобараке, P3 - Наджафабад, P4 –Фелавержан,
мкм и минимально-максимальные значения (P1: 50, P2: 50, P3: 50, P4: 50 особей. самцы)

Таблица 4.- Морфометрия популяций *D. destructor* образцы из Ирана, Провинция Зенджан

Параметр (♂), мкм (n: 200)	P1	P2
Длина тела	(700-1200)	(850-1167)
Длина хвоста	(50-66)	(61-75)
c (длина тела/ длина хвоста)	(14-19)	(14-16)
Длина стилета	(9-12)	(9-11)
PUS(поствульварный часть маточного мешка)	–	-
PUS/расстояние вульва-анус, %	–	-
Длина Спикулы	(18-23)	(19-27)
Длина бурсы (в% от длина хвосты)	(33-56)	(35-58)
Форма кончика хвоста	Закругленный	Закругленный

P1 - Зенджан, P2 - Солтание,
мкм и минимально-максимальные значения (P1:100, P2: 100 особей, самцы)

Таблица 5.- Морфометрия популяций *D. destructor* образцы из Ирана, Провинция Ардебиль

Параметр (♂), мкм (n:200)	P1	P2	P3
Длина тела	(750-1100)	(600-1205)	(640-1164)
Длина хвоста	(57-75)	(44-73)	(47-72)
c (длина тела/ длина хвоста)	(13-15)	(14-17)	(14-17)
Длина стилета	(9-12)	(8-13)	(8-13)
PUS(поствульварный часть маточного мешка)	–	–	-
PUS/расстояние вульва-анус, %	–	–	-
Длина Спикулы	(18-27)	(19-24)	(18-26)
Длина бурсы (в% от длина хвосты)	(33-50)	(35-55)	(33-56)
Форма кончика хвоста	Закругленный	Закругленный	Закругленный

P1 - Ардебиль, P2 - Намин, P3 – Найер,
мкм и минимально-максимальные значения (P1: 100, P2: 50, P3:50 особей, самцы)

Таблица 6.- Морфометрия популяций *D. destructor* образцы из Ирана, Провинция Хамедан

Параметр (♀), мкм (n: 200)	P1	P2	P3	P4
Длина тела	(875 -1110)	(809-1200)	(900-1400)	(980-1256)
Длина хвоста	(54-71)	(78-83)	(55-64)	(81-85)
c (длина тела/ длина хвоста)	(14-16)	(11-15)	(17-22)	(12-15)
Длина стилета	(8-13)	(9-13)	(8-12)	(8-12)
PUS(поствульварный часть маточного мешка)	(53-98)	(53-89)	(53-90)	(53-87)
PUS/расстояние вульва-анус, %	(48-71)	(42-87)	(55-91)	(44-75)
Длина Спикулы	-	-	-	-
Длина бурсы (в% от длина хвосты)	-	-	-	-
Форма кончика хвоста	Закругленный	Закругленный	Закругленный	Закругленный

P1 - Хамедан, P2 - Бахар, P3 - Асад Абад, P4 – Кабудараханг,
мкм и минимально-максимальные значения (P1: 50, P2: 50, P3: 50, P4: 50 особей, самки)

Таблица 7.- Морфометрия популяций *D. destructor* образцы из Ирана, Провинция Исфahan

Параметр (♀), мкм, (n: 200)	P1	P2	P3	P4
Длина тела	(800-1100)	(770-1300)	(700-1200)	(820-1310)
Длина хвоста	(55-63)	(55-79)	(58-76)	(54-75)
c (длина тела/ длина хвоста)	(15-18)	(14-17)	(12-16)	(15-18)
Длина стилета	(9-12)	(9-13)	(9-13)	(9-12)
PUS(поствульварный часть маточного мешка)	(55-98)	(55-103)	(54-105)	(52-98)
PUS/расстояние вульва-анус, %	(38-86)	(37-79)	(37-90)	(37-87)
Длина Спикулы	-	-	-	-
Длина бурсы (в% от длина хвосты)	-	-	-	-
Форма кончика хвоста	Закругленный	Закругленный	Закругленный	Закругленный

P1- Исфahan, P2- Мобараке, P3- Наджафабад, P4. Фелавержан,
мкм и минимально-максимальные значения (P1: 50, P2: 50, P3: 50, P4:50 особей, самки)

Таблица 8.- Морфометрия популяций *D. destructor* образцы из Ирана, Провинция Зенджан

Параметр (♀), мкм (n: 200)	P1	P2
Длина тела	(880-1200)	(700-1114)
Длина хвоста	(65-76)	(58-80)
c (длина тела/ длина хвоста)	(14-16)	(12-14)
Длина стилета	(9-13)	(8-13)
PUS(поствульварный часть маточного мешка)	(55-86)	(58-88)
PUS/расстояние вульва-анус, %	(45-86)	(37-87)
Длина Спикулы	-	-
Длина бурсы (в% от длина хвосты)	-	-
Форма кончика хвоста	Закругленный	Закругленный

P1 - Зенджан, P2 – Солтание,
мкм и минимально-максимальные значения (P1: 100, P2: 100 особей, самк

Таблица 9.- Морфометрия популяций *D. destructor* образцы из Ирана, Провинция Ардебиль

Параметр (♀), мкм (n: 200)	P1	P2	P3
Длина тела	(800-1200)	(760-1200)	(640-1300)
Длина хвоста	(52-69)	(46-65)	(43-78)
c (длина тела/ длина хвоста)	(16-18)	(17-19)	(15-17)
Длина стилета	(8-12)	(8-13)	(8-12)
PUS(поствульварный часть маточного мешка)	(55-88)	(54-89)	(53-100)
PUS/расстояние вульва-анус, %	(45-83)	(52-78)	(42-76)
Длина Спикулы	-	-	-
Длина бурсы (в% от длина хвосты)	-	-	-
Форма кончика хвоста	Закругленный	Закругленный	Закругленный

P1 - Ардебиль, P2 - Намин, P3 – Найер,
мкм и минимально-максимальные значения (P1: 50, P2: 50, P3: 100 особей, самки)

Таблица 10.- Морфометрия *D. destructor* по [Hashemi and Karegar, 2019]

Показатель	(♂)	(♀)
Длина тела	(600–1254)	(603–1468)
Длина хвоста	(45–87.5)	(39.5–90.5)
с (длина тела/ длина хвоста)	(11.0–19.1)	(11.4–27.8)
Длина стилета	(8.5–12)	(8–13)
PUS/расстояние вульва-анус, %	-	(36.9– 92.6)
Длина Спикулы	(18–28)	-
Форма кончика хвоста	Закругленный/Острый	Закругленный/Острый

Таблица 11. - Морфометрия *D. destructor* по [Thorne, 1945, Hooper, 1973 и Chizhov et al., 2010]

Показатель Автор	(♂)			(♀)		
	Хупер (1973)	Торн (1945)	Чижев (2010)	Хупер (1973)	Торн (1945)	Чижев (2010)
Длина тела	(800-1900)	(750-1300)	(860-1370)	(800-1900)	(720-1440)	(1050-1630)
Длина хвоста	-	-	(62-81)	-	-	(62-81)
с (длина тела/ длина хвоста)	(14-20)	(12-16)	(13.6-16.2)	(14-20)	(15-20)	(13.8-18.8)
Длина стилета	(10-14)	(10)	(10-13)	(10-14)	(10)	(11-13)
PUS/расстояние вульва-анус, %	-	-	-	(53-90)	-	-
Длина Спикулы	(24-27)	(24)	(20-25)	-	-	-
Форма кончика хвоста	Закругленный	Закругленный	-	Закругленный	Закругленный	-

В результате исследования морфологии популяций было показано, что все изученные популяции принадлежат к виду *D. destructor*. Несмотря на то, что популяции из Ирана и России имеют незначительные отличия по размерности отдельных признаков, эта вариабельность не влияет на отнесение всех популяций к виду *D. destructor*.

Результаты молекулярных исследований

Анализ последовательности ДНК *D. destructor*.

Из семи населенных пунктов в Российской Федерации и Иране для молекулярного анализа было использовано 350 единиц нематод. После выравнивания (программное обеспечение Mega), очистки и редактирования последовательностей с помощью программного обеспечения BioEdit 7.0.5.3 были выбраны 56 последовательностей (по 8 последовательностей из каждой области).

Поиск BLAST в NCBI показал, что все, полученные в этом исследовании последовательности ДНК *D. destructor* из России и Ирана, совпадают с соответствующими последовательностями *D. destructor*, присутствующими в базе данных.

Анализ последовательностей выявил вариабельность последовательностей между различными географическими популяциями *D. destructor*, выделенными из разных растений-хозяев, такие как *Solanum tuberosum*, *Ipomoea batatas*, *Daucus carota subsp.*

Филогенетические исследования популяций *D. destructor*.

Филогенетические различия внутри и между видами р. *Ditylenchus* оценивались по методу максимального правдоподобия. Несмотря на вариабельность последовательностей, филогенетическое дерево убедительно поддерживает группировку всех последовательностей *D. destructor* даже для популяций разного географического происхождения и разных растений-хозяев.

На филогенетическом дереве *D. dipsaci* используется в качестве сестринских видов *D. destructor* и *Xiphinema* для идентификации вида. Результаты анализа ITS-rРНК выявили две основные клады. Результаты анализа ITS-rРНК выявили три основные клады. Раздел I разделен на три подкласса. Первый состоит из последовательностей популяций *D. dipsaci*, второй - из последовательностей *D. destructor* из российских популяций, а третий показывает популяции *D. destructor* из других стран.

Второй раздел состоит из популяций *D. destructor*, собранных в регионах Ирана, которые имеют наибольшее сходство с популяциями Китая. В разделе 3 показаны популяции вне группы (Рисунок 4). Результаты нашего анализа выявили генетические отличия *D. destructor* от *D. dipsaci* и других признанных видов *Ditylenchus*, следовательно, соответствуют результатам предыдущих исследований.

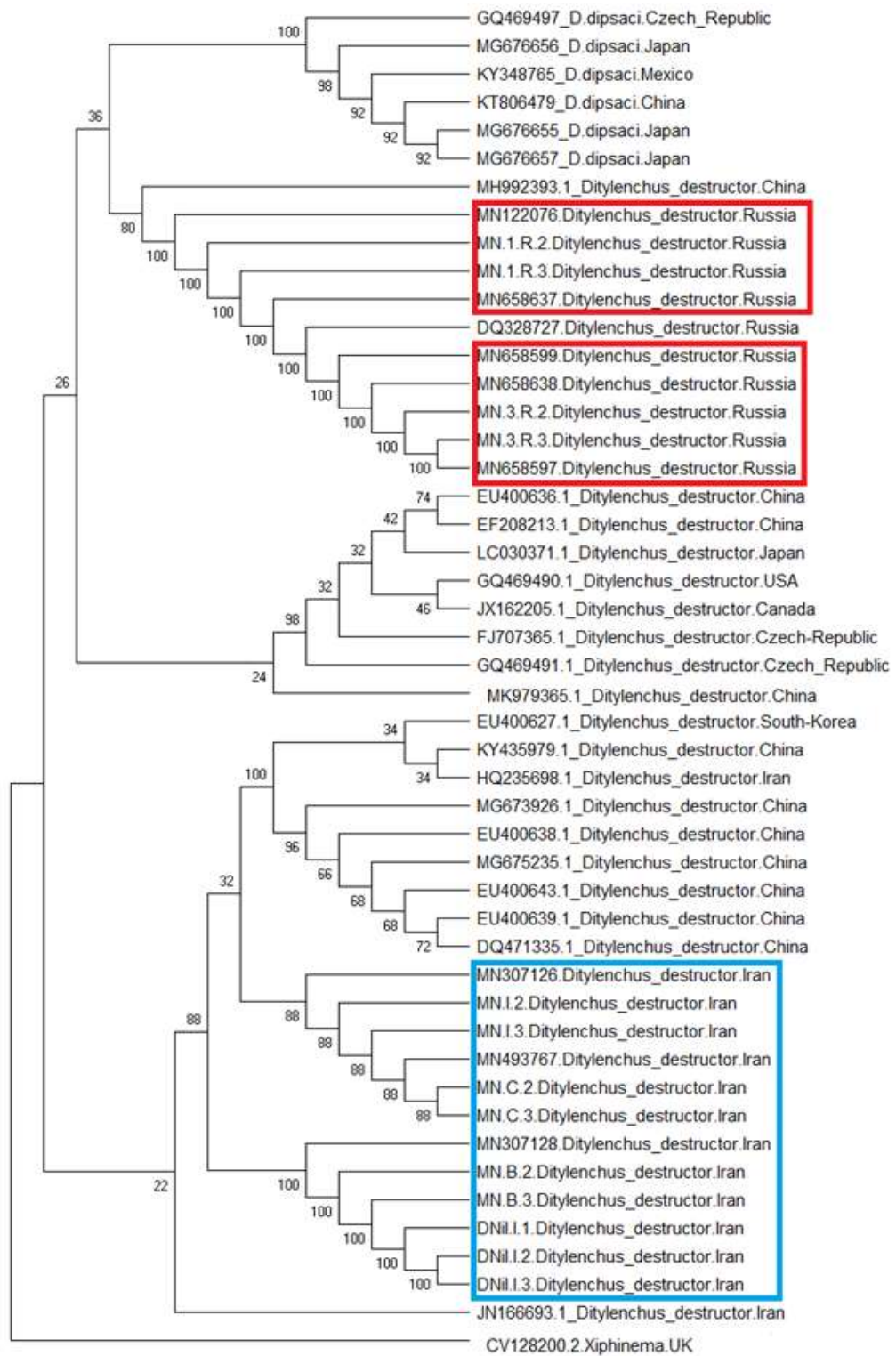


Рисунок 3.- Филогенетическое дерево с изученными популяциями и эталонными последовательностями (красные цвета из России, синие цвета из Ирана)

Разработка видоспецифических праймеров.

Для создания первого праймера, названного dsn.1 (таблица 12), код несоответствия между *D.destructor* и двумя другими видами (*D.dipsaci* и *D. gigas*) был выбран и сопоставлен для получения прямого и обратного праймеров. Второй праймер, названный dsn.2, был разработан NCBI-Primer design (Таблица 13) (Рисунок 4, 5). Достоверность специфичности праймеров проверяли на геномной ДНК, выделенной из исследуемых популяций. Стандартные условия, описанные для ПЦР ITS-областей, не были изменены для этой конкретной амплификации, за исключением того, что была изменена температура отжига. ПЦР-амплификация с помощью видоспецифических праймеров даёт специфическую и чёткую полосу ПЦР продукта для одной взрослой особи для каждой из изученных географических популяций *D. destructor*, которые были собраны с полей картофеля в нашем исследовании.

Специфичность и надёжность праймеров также была продемонстрирована *in vitro* с *D. destructor*, *D. dipsaci* и *D. gigas*. Учитывая специфичность, чувствительность и надёжность праймеров для *D.destructor*, диагностические праймеры могут обеспечить быстрый и надёжный метод для идентификации особей *D. destructor*, выделенных из разных растений-хозяев в разных географических регионах. По теоретически выявленным перспективным последовательностям были сконструированы и синтезированы праймеры (Евроген):

Таблица 12.- Описание видоспецифических праймеров dsn.1 F/R для диагностики *D. destructor*

Праймер.dsn.1 F/R	Последовательность	Температура отжига	Размер продукта (б.п.)
прямой	TTGGCACGTCTGATTCAGGG	60.3	397
обратный	GTCAACATTGGCCAAGAGGC		

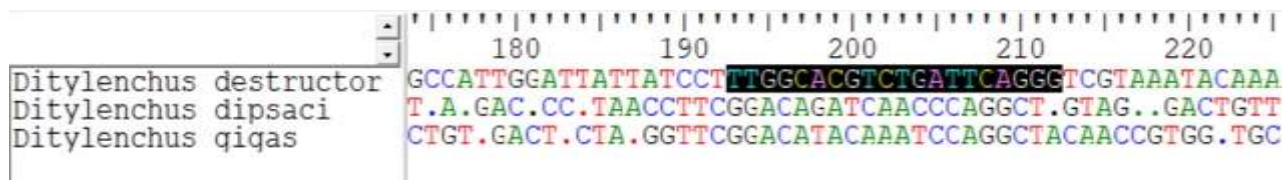


Рисунок 4.- Множественное выравнивание последовательностей рДНК-ITS *D. destructor* и других видов *Ditylenchus* из GenBank, используемых для разработки видоспецифического прямого праймера (прямой праймер начинается с 193-212, обратный праймер начинается с 318-299).

Таблица 13.- Описание видоспецифических праймеров dsn.2 F/R для диагностики *D. destructor*

Праймер.dsn.2 F/R	Последовательность	Температура отжига	Размер продукта (б.п.)
прямой	TTTCGAATGCACATTGCGCC	57.7	330
обратный	CTAGGCCAAAGAGACAGCGG		

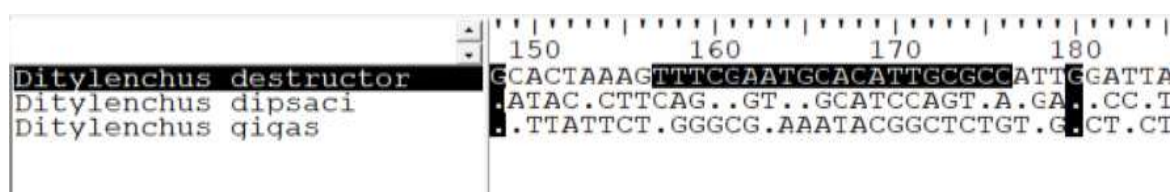


Рисунок 5.- Множественное выравнивание последовательностей рДНК-ITS *D. destructor* и других видов *Ditylenchus* из GenBank, используемых для разработки видоспецифического обратного праймера (прямой праймер начинается с 157-176, обратный праймер начинается с 281-262)

ПЦР в видоспецифическими праймерами. В настоящем исследовании успешно разработан метод количественного определения *D. destructor* в клубнях картофеля. Последовательности ITS, определенные в этом исследовании, были идентичны среди нематод, собранных в 7 разных регионах двух стран, хотя генетическое разнообразие *D. destructor* в повторях последовательностей между образцами относительно велико. В базе данных NCBI перечислены различные последовательности для материала из разных стран мира. Эти результаты позволяют предположить, что набор праймеров, разработанный в этом исследовании, специфически амплифицирует последовательность, присутствующую в *D. destructor*, из различных областей. Метод, разработанный в текущем исследовании для ПЦР с видоспецифическими праймерами, преодолевает это ограничение и позволяет дифференцировать целевые виды. По сравнению с ITS-PCR-RFLP этот метод ПЦР сокращает время и затраты на диагностику.

Тесты новых праймеров

Тест на селективность праймеров. Для оценки селективности видоспецифических праймеров были оценены продукты ПЦР-амплификации для различных популяций *D. destructor*, амплифицированных с использованием двух пар праймеров (ds.1F/R и dsn.2F/R). Была получена чёткая полоса, характеризующая фрагмент длиной 397 и 330 п.н. (Рисунок 6-9). Метод оказался подходящим для чёткой идентификации образцов ДНК *D. destructor*. Специфичность и надёжность конкретных праймеров были подтверждены получением ожидаемых размеров фрагментов для всех популяций *D. destructor*, а для протестированных популяций нецелевых видов *D. dipsaci* и *D. gigas* не было обнаружено никаких продуктов.

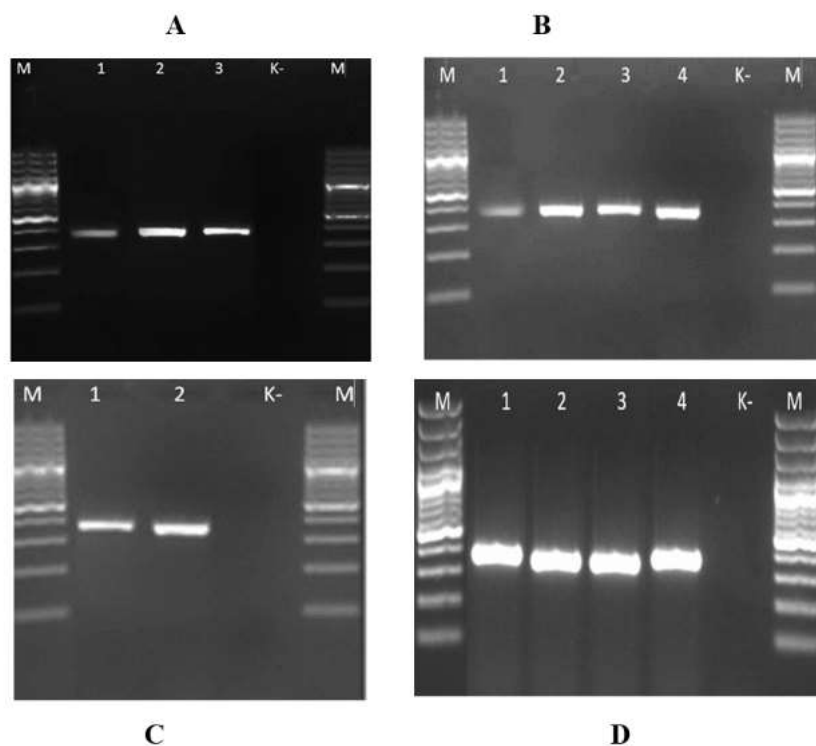


Рисунок 6.- Оценка селективности пары праймеров dsn.1 F / R. для диагностики *D. destructor* из разных регионов: А - провинция Ардебиль; В - провинция Исфахан; С - провинция Зенджан; D - провинция Хамадан; К- отрицательный контроль; М - маркер; (неодинаковая толщина полосы результатов может быть связана с различной концентрацией ДНК)

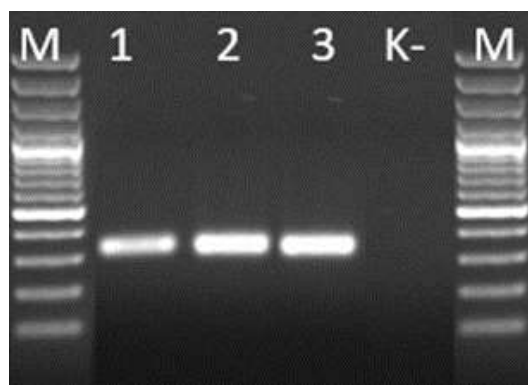


Рисунок 7.- Оценка селективности пары праймеров dsn.1F/R. для диагностики *D. destructor* из различных регионов: 1 - Московская область; 2 - Нижегородская область; 3 - Брянская область; К- отрицательный контроль; М - маркер; (неодинаковая толщина полосы результатов может быть связана с различной концентрацией ДНК)

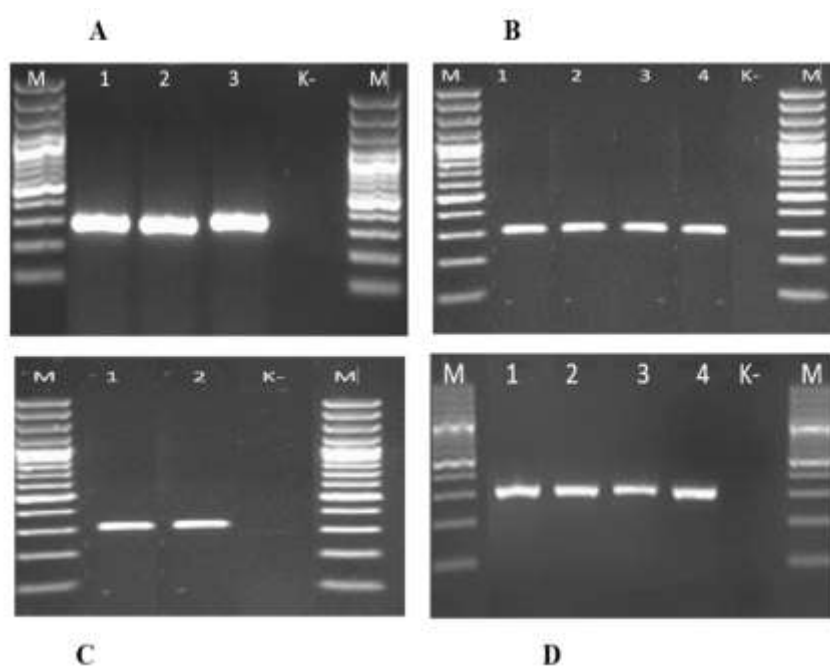


Рисунок 8. - Оценка селективности пары праймеров dsn.2 F / R. для диагностики *D. destructor* из разных регионов: А - провинция Ардебиль; В - провинция Исфахан; С - провинция Зенджан; D - провинция Хамадан; К- отрицательный контроль; М - маркер (неодинаковая толщина полосы результатов может быть связана с различной концентрацией ДНК)

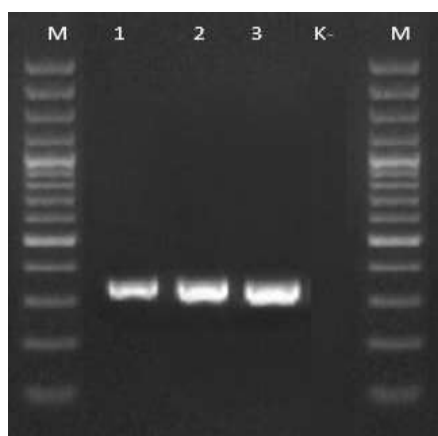


Рисунок 9.- Оценка селективности пары праймеров dsn.2F/R. для диагностики *D. destructor* из различных регионов: 1 - Московская область; 2- Нижегородская область; 3 -Брянская область; К-отрицательный контроль; М- маркер (неодинаковая толщина полосы результатов может быть связана с различной концентрацией ДНК)

Амплификация с парами праймеров dsn.1 F/R и dsn.2 F/R была успешной во всех образцах *D. destructor*, полученных из Ирана и России. Все образцы показали одну яркую и чёткую целевую полосу ожидаемого размера: около 397 п.н. для dsn.1 F/R и 330 п.н. для dsn.2 F/R. Фрагменты отсутствовали в отрицательном контроле. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности созданных праймеров (рисунок 4-7).

Тест на специфичность праймеров. Специфика метода заключается в том, что с его помощью можно отличить целевые виды от близкородственных и морфологически близких видов. В данной работе использовались ДНК трёх видов нематод: *D. destructor* (виды-мишени), *D. dipsaci* и *D. gigas*. Реакция проводилась в 4-х повторностях. Результаты представлены на рисунках 10 и 11.

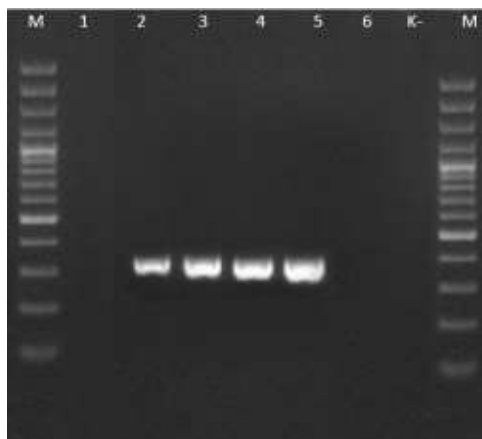


Рисунок 10.- Оценка специфичности созданных пар праймеров для *D. destructor*: 1 - *D. dipsaci* ; 2 - провинция Ардебиль; 3 - провинция Исфахан; 4 - провинция Зенджан; 5 - провинция Хамадан; 6 - *D. gigas*; К- отрицательный контроль; М - маркер (неодинаковая толщина полосы результатов может быть связана с различной концентрацией ДНК)

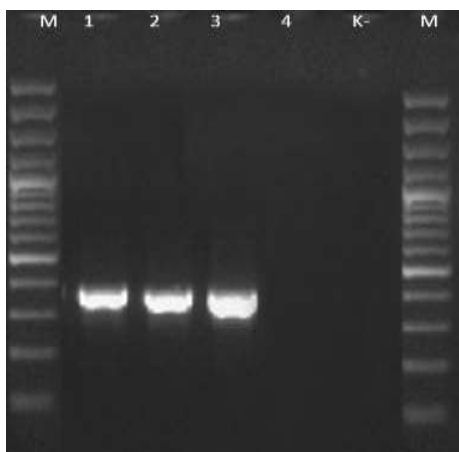


Рисунок 11.- Оценка специфичности созданных пар праймеров для *D. destructor*; 1 - Московская область; 2 - Нижегородская область; 3 - Брянская область; 4 - *D. dipsaci*; К - отрицательный контроль; М - маркер (неодинаковая толщина полосы результатов может быть связана с различной концентрацией ДНК)

Тест на чувствительность праймеров. Аналитическая чувствительность ПЦР это минимальное количество ДНК от мишени, которое может быть надёжно идентифицировано с

помощью данного метода. Для оценки чувствительности ПЦР на новых примерах была приготовлена серия разведений ДНК *D. destructor*: примерно 1 нг, 5 нг, 50 нг, 100 нг. Реакцию проводили в 4 повторах, в каждой из которых были получены аналогичные результаты (рисунок 12 и 13). Установлено, что аналитическая чувствительность метода с новыми праймерами составляет 1 нг ДНК для dsn.1 F/R и 5 нг ДНК для dsn.2 F/R. Как и первая пара праймеров, dsn.1 имеет более специфическую идентификацию.

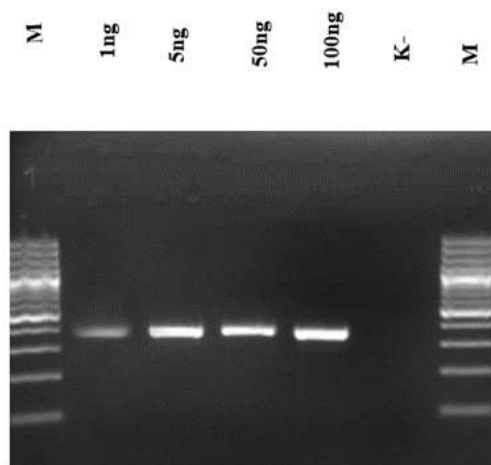


Рисунок 12.- Оценка чувствительности пары праймеров dsn.1 F/R с различным количеством ДНК *D. destructor*. Одна из 4 аналогичных повторностей. М - ДНК-маркер, К- отрицательный контроль

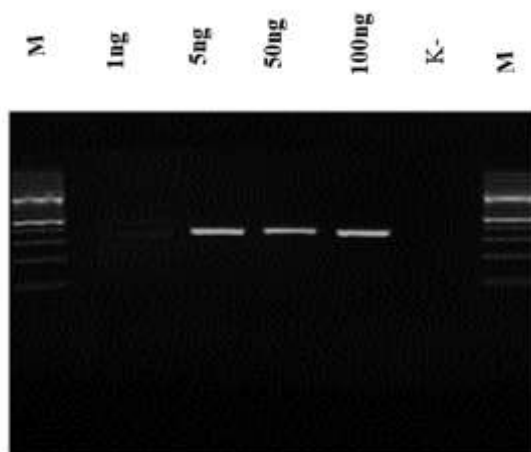


Рисунок 13.- Оценка чувствительности пары праймеров dsn.2 F/R с различным количеством ДНК *D. destructor*. Одна из 4 аналогичных повторностей. М - ДНК-маркер, К- :отрицательный контроль

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

● В результате изучения морфологической изменчивости популяций *D. destructor* было показано, что все исследованные популяции относятся к виду *D. destructor*, несмотря на то, что сообщалось, что иранские и российские популяции имели незначительные различия по признакам; По признакам самки: самая большая длина тела, длина стилета и PUS (поствульварный часть маточного мешка) принадлежат русским популяциям, а самая большая длина хвоста, отношение с (длина тела/ длина хвоста) и расстояния PUS/расстояние вульва-анус, % принадлежат иранским популяциям. По признакам самца: наибольшая длина тела, длина хвоста, длина стилета, Длина бурсы (в% от длина хвосты) и отношение с (длина тела/ длина хвоста) у русских популяций, а наибольшая длина спикул у иранских популяций.

● NCBI GenBank дополнен последовательностями (коды: MN122076, MN307126, MN307128, MN493767, MN658597, MN658599, MN658637, MN658638), что является вкладом в расширение знаний мировой общественности о генетическом разнообразии видов *D. destructor*.

● Согласно филогенетическому дереву, последовательности наших иранских популяций были очень похожи на образцы *D. destructor*, обнаруженные в Китае, а наши русские популяции были похожи на другие российские популяции *D. destructor*, которые ранее были идентифицированы другими исследователями.

● Для определения принадлежности видов к роду *Ditylenchus* предложены две новые пары видоспецифических праймеров (dsn.1 F/R и dsn.2 F/R). Было продемонстрировано, что уникальные пары праймеров dsn.1 F/R и dsn.2 F/R высокоэффективны для идентификации *D. destructor*. Показана специфичность новых праймеров dsn.1 F/R и dsn.2 F/ для *D. destructor*, а также отсутствие у них ложноположительных реакций для близкородственных друг другу видов *Ditylenchus*, *D. dipsaci* и *D. gigas*.

● Установлено, что аналитическая чувствительность метода с новыми праймерами составляет 1 нг ДНК для dsn.1 F/R и 5 нг ДНК для dsn.2 F/R. Как и первая пара праймеров, dsn.1 имеет более специфическую идентификацию.

Список литературы включает 123 наименований: справочники и нормативные документы, диссертации и авторефераты, книги и статьи на английском языке, интернет- и офлайн-ресурсы.

Список опубликованных работ по теме диссертации *Статьи в изданиях, индексируемых Scopus и Web of Science*

1. **Niloufar Mahmoudi**, Mikhail Pridannikov, Meisam Zargar, Yousef Naserzadeh, Liudmila Limantceva, Elena Pakina. Molecular diagnostics of *Ditylenchus destructor* based on the ITS-rDNA from Iran and Russia Federation. Research on Crops. March 2020, DOI: 10.31830/2348-7542.2020.025.
2. **Niloufar Mahmoudi**, Mikhail Pridannikov, Yousef Naserzadeh, Elena Pakina, Albert Engeribo, Liudmila Limantceva and Anton Ivanov. Developing PCR primers for identification of potato

rot nematode (*Ditylenchus destructor*) in the Russian Federation and Iran. Research on Crops. December 2020, DOI: 10.31830/2348-7542.2020. 124.

Статьи в изданиях из списка ВАК

1. **Niloufar Mahmoudi**, Davoud K. Nejad, Fatemeh Shayanmehr. A new primer set for amplification of ITS-rDNA in *Ditylenchus destructor*. RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries. May2020, DOI 10.22363/2312-797X-2020-15-2-151-159, UDC 633.491:632.651:577.21.
2. **Niloufar Mahmoudi**, Yousef Naserzadeh, Elena Pakina, Liudmila Limantceva, Davoud Kartuli Nejad, Molecular identification of *Ditylenchus destructor* nematode with PCR Species-Specific primers in the Moscow region. RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries. December 2019, DOI: 10.22363/2312-797X-2019-14-4-430-436.
3. Diagnosis of potato rot nematode (*Ditylenchus destructor*) using PCRRFLP, **Niloufar Mahmoudi**, Elena Pakina, Liudmila Limantceva, Anton Vladislavovich Ivanov. RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries. DOI 10.22363/2312-797X-2020-15-4-353–362.

Материалы научных конференций

1. **Niloufar Mahmoudi**, Yousef Naserzadeh, Elena Pakina. The occurrence of *Ditylenchus destructor* nematode on potato in Iran. July 2020. International Scientific Forum SCIENCE AND INNOVATION – MODERN CONCEPTS. НАУКА И ИННОВАЦИИ- СОВРЕМЕННЫЕ КОНЦЕПЦИИ. Moscow. Russia. ISBN 978-5-905695-59-9.
2. **Niloufar Mahmoudi**, Yousef Naserzadeh, Elena Pakina. DISCOVERY OF POTATO TUBER NEMATODE (*DITYLENCHUS DESTRUCTOR*) IN THE MOSCOW REGION. Symposium, XIII International Nematological Symposium "Nematodes and other Ecdysozoa under changing environments", Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, July 29, 2019 – August 4, 2019.
3. **Niloufar Mahmoudi**, Mikhail Pridannikov, Elena Pakina. Development of new test systems for molecular genetic identification *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945. WORLD SCIENCE: PROBLEMS AND INNOVATIONS, April 30, 2021.

АННОТАЦИЯ

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НЕМАТОД *DITYLENCHUS DESTRUCTOR* THORNE, 1945 ПОПУЛЯЦИЙ ИРАНСКОГО И РОССИЙСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И РАЗРАБОТКА НОВЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ИХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ

Основным источником появления дитиленхов на полях является зараженный посадочный материал. Использование очищенного от фитопаразитов семенного картофеля снижает инфекционную нагрузку на поля. Чтобы снизить риск заражения на новых полях, семенные клубни следует предварительно тестировать. Важным компонентом в этом процессе является точная видовая идентификация видов *Ditylenchus* на картофеле. В связи с этим актуальной проблемой является разработка быстродействующих и точных молекулярных тест-систем для идентификации вредоносных видов стеблевых и гниlostных нематод. Настоящее исследование

направлено на разработку новых наборов праймеров. Были разработаны две пары праймеров, dsn.1 F/R и dsn.2 F/R. Показаны их аналитическая чувствительность, эффективность и специфичность. Предлагаемые методы предназначены для экспресс-диагностики нематод *D. destructor*. Разработка конкретных праймеров для изучаемых популяций может стать полезным инструментом, помогающим ученым-биологам расширять и продолжать свои исследования.

SUMMARY

COMPARATIVE MORPHOMETRIC ANALYSIS OF NEMATODES *DITYLENCHUS DESTRUCTOR* THORNE, 1945 POPULATIONS OF IRANIAN AND RUSSIAN ORIGIN AND DEVELOPMENT OF NEW TEST SYSTEMS FOR THEIR MOLECULAR GENETIC IDENTIFICATION

The main source of the appearance of *Ditylenchus* in the fields is infected planting material. The use of phytoparasitic-free seed potatoes reduces the infection load in the fields. To reduce the risk of infection in new fields, seed tubers should be pre-tested. An important component in this process is the exact species identification of *Ditylenchus* species on potatoes. In this regard, an urgent problem is the development of fast and accurate molecular test systems for the identification of harmful species of stem and rot nematodes. The present research aims to develop new primers sets. Two pairs of primers, dsn.1 F/ R and dsn.2 F/ R, have been developed. Their analytical sensitivity, efficiency and specificity are shown. The proposed techniques are for rapid diagnosis of *D. destructor* nematodes. Designing specific primers for study populations could be a useful tool to help life scientists expand and continue their research.