

Апробация метода ПЦР для видовой идентификации рисовой листовой нематоды *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942

А.В. ИВАНОВ¹, М.В. УШКОВА²

ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия

¹ e-mail: tonijons8@mail.ru

² e-mail: ushkovamariavladislavovna@gmail.com

АННОТАЦИЯ

Статья посвящена *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942 – рисовой листовой нематоды. Она распространена во многих странах мира, возделывающих рис. В настоящее время она исключена из Единого перечня карантинных объектов Евразийского экономического союза, однако является регулируемой рядом стран – импортеров российской продукции.

Вредитель является полифагом и поражает большой круг растений. В странах Европейской и Средиземноморской организации по карантину и защите растений (ЕОКЗР) основными растениями-хозяевами, которые подвергаются наибольшему риску заражения нематодой *A. besseyi*, являются рис и клубника (PM 7/39 (1), 2004). Поскольку рис является важным продуктом питания, по посевным площадям и валовым сборам зерна он занимает в мировом земледелии второе (после пшеницы) место.

В статье обобщена и проанализирована научная информация по географическому распространению, вредоносности рисовой листовой нематоды *A. besseyi*, ее биоэкологическим особенностям, методу морфологической диагностики. Изучены методы молекулярно-генетической идентификации рисовой листовой нематоды *A. besseyi*, применяемые в зарубежных исследованиях. При проведении наших исследований использовали нематод, собранных во время экспедиций на Дальний Восток (Приморский край, Ханкайский район) и в Краснодарский край Российской Федерации. Проведена видовая идентификация нематод по морфологическим признакам в соответствии с методическими рекомендациями по выявлению и идентификации рисовой нематоды *Aphelenchoides besseyi* Christie (MP ВНИИКР № 89-2016). Для лабораторного исследования используют как морфологические, так и молекулярные методы. Разработка и применение современных методов диагностики в области карантина растений являются актуальными для выявления и идентификации рисовой листовой нематоды *A. besseyi*.

Проведено исследование с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием смесей для амплификации коммерческого

Approbation of the PCR method for species identification of *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942

A.V. IVANOV¹, M.V. USHKOVA²

FGBU "All-Russian Plant Quarantine Center" (FGBU "VNIIEKR"), Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia

¹ e-mail: tonijons8@mail.ru

² e-mail: ushkovamariavladislavovna@gmail.com

ABSTRACT

The article is dedicated to *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942 – rice leaf nematode. It is widespread in many rice-growing countries. Currently, it is excluded from the Common List of Quarantine Objects of the Eurasian Economic Union, however, it is regulated by a number of countries importing Russian products.

The pest is polyphagous and infects a wide range of plants. In the European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) countries, rice and strawberries are the main hosts most at risk from *A. besseyi* infestation (PM 7/39 (1), 2004). Since rice is an important food product, it occupies the second place (after wheat) in world agriculture in terms of sown area and gross grain harvest.

The article summarizes and analyzes scientific information on the geographical distribution, harmfulness of the rice leaf nematode *A. besseyi*, its bioecological features, and the method of morphological diagnosis. The methods of molecular genetic identification of the rice leaf nematode *A. besseyi* used in foreign research papers have been studied. When conducting our research, we used nematodes collected during expeditions to the Far East (Primorsky Krai, Khankaisky District) and Krasnodar Krai of the Russian Federation. The species identification of nematodes by morphological characteristics was carried out in accordance with the guidelines for the detection and identification of the rice nematode *Aphelenchoides besseyi* Christie (MR VNIIEKR No. 89-2016). For laboratory research, both morphological and molecular methods are used. The development and application of modern diagnosis methods in the field of plant protection are relevant for the detection and identification of the rice leaf nematode *A. besseyi*.

The study was conducted with polymerase chain reaction (PCR) using commercial amplification mixtures 5x Mas^{DD}Taq MIX-2025 and 5x Mas^{OR}Taq MIX-2025 Dialat Ltd. (Russia), as well as 5x ScreenMix,

производства 5x Mas^{DD}Taq MIX-2025 и 5x Mas^{OR}Taq MIX-2025 ЗАО «Диалат Лтд.» (Россия), а также 5x ScreenMix, 5x ScreenMix-HS и 5x ScreenMix-HS (UDG) ЗАО «Евроген» (Россия).

Ключевые слова. Карантин растений, молекулярно-генетический метод, полимеразная цепная реакция, рисовая листовая нематода, морфологические признаки, морфометрия.

ВВЕДЕНИЕ



Поскольку рис является ценным продуктом питания, по посевным площадям и валовым сборам зерна он занимает в мировом земледелии второе (после пшеницы) место. Основные площади этой культуры сосредоточены в странах Юго-Восточной Азии: Индии,

Пакистане, Вьетнаме и Китае (Харченко, Рубан, 2015). В России рис возделывают в девяти регионах. Ключевым регионом возделывания является Краснодарский край. По итогам 2021 года 73,6% риса было собрано в Краснодарском крае, 9,8% – в Республике Дагестан, 6,6% – в Ростовской области, 4,4% – в Республике Адыгее, 1,9% – в Астраханской области, 1,8% – в Приморском крае. Также рис возделывают в Чеченской Республике (1,0%), Республике Калмыкии (0,8%), Еврейской автономной области (0,03%). Основными импортерами российского риса на 2021 год являлись следующие страны: Турция, Монголия, Казахстан, Азербайджан, Украина, Албания, Беларусь, Бельгия, Иордания, Израиль, Армения, Таджикистан, Грузия, США, Республика Молдова, ОАЭ, Киргизия, Китай и другие (<http://stat.customs.gov.ru/analysis>).

Среди факторов, лимитирующих рост урожайности риса и других культур, большое значение имеют болезни и вредители (Деккер, 1972). Нематоды снижают семенные и товарные качества растительной продукции. В процессе питания нарушается целостность клеток растительной ткани риса (Попова, 2001, 2004). Вред, причиняемый нематодами, усугубляется тем, что они способствуют распространению грибных, вирусных и бактериальных заболеваний растений (Костылев, 2011).

Одним из вредителей риса является листовая нематода *Aphelenchoides besseyi* Christie (1942), вызывающая значительную потерю урожая в большинстве рисосеющих регионов тропиков и субтропиков. Рисовая нематода *A. besseyi* считается субтропическим и тропическим видом, но встречается также в умеренных широтах. Беловершинность, вызываемая рисовой листовой нематодой *A. besseyi*, также называется афеленхоидозом и известна более 100 лет, обнаружена впервые в Японии в 1915 г. (Харченко, Рубан, 2015). Рисовая листовая нематода распространена во многих странах мира, возделывающих рис (рис. 1) (Шестиперов, Савотиков, 1995; Brown et al., 1993).

В отдельные годы поражение нематодами принимает характер эпифитотий, вызывая значительное ухудшение качества зерна. В Краснодарском

5x ScreenMix-HS and 5x ScreenMix-HS (UDG) Evrogen (Russia).

Key words. Plant protection, molecular genetic method, polymerase chain reaction, rice leaf nematode, morphological characteristics, morphometry.

INTRODUCTION

Since rice is a valuable food product, it occupies the second (after wheat) place in world agriculture in terms of sown area and gross grain harvest. The main areas of this culture are concentrated in the countries of Southeast Asia: India, Pakistan, Vietnam and China (Kharchenko, Ruban, 2015). In Russia, rice is cultivated in nine regions. The key region of cultivation is Krasnodar Krai. At the end of 2021, 73.6% of rice was harvested in Krasnodar Krai, 9.8% – in the Republic of Dagestan, 6.6% – in Rostov Oblast, 4.4% – in the Republic of Adygea, 1.9% – in Astrakhan Oblast, 1.8% – in Primorsky Krai. Rice is also cultivated in the Chechen Republic (1.0%), the Republic of Kalmykia (0.8%), the Jewish Autonomous Region (0.03%). The main importers of Russian rice for 2021 were the following countries: Turkey, Mongolia, Kazakhstan, Azerbaijan, Ukraine, Albania, Belarus, Belgium, Jordan, Israel, Armenia, Tajikistan, Georgia, USA, Republic of Moldova, UAE, Kyrgyzstan, China, etc. (<http://stat.customs.gov.ru/analysis>).

Among the factors limiting the growth of yields of rice and other crops, diseases and pests are of great importance (Dekker, 1972). Nematodes reduce the seed and commercial qualities of plant products. In the process of nutrition, the integrity of rice plant tissue cells is disturbed (Popova, 2001, 2004). The harm caused by nematodes is exacerbated by the fact that they contribute to the spread of fungal, viral and bacterial plant diseases (Kostylev, 2011).

One of the rice pests is the leaf nematode *Aphelenchoides besseyi* Christie (1942), causing significant yield loss in most rice-growing regions of the tropics and subtropics. The rice leaf nematode *A. besseyi* is considered a subtropical and tropical species, but also occurs in temperate latitudes. “Whitehead” caused by the rice leaf nematode *A. besseyi*, also called aphelenchoidosis, has been known for over 100 years, and was first detected in Japan in 1915 (Kharchenko and Ruban, 2015). The rice leaf nematode is spread in many countries cultivating rice (Fig. 1) (Shestiperov, Savotikov, 1995; Brown et al., 1993).

In some years, nematode damage takes on the character of epiphytotic, causing a significant deterioration in grain quality. In Krasnodar Krai, the rice leaf nematode was first reported in 1939. Later, the manifestation of the disease was noted in Rostov Oblast and

крае рисовая листовая нематода впервые была обнаружена в 1939 г. Позже проявление болезни отмечалось в Ростовской и Астраханской областях, Ставропольском крае, Дагестане, на Дальнем Востоке, а также в Узбекистане, Республике Молдове, на Украине и в ряде других стран. Несмотря на принимаемые меры борьбы с фитонематодами, проблема остается серьезной (Буторина и др., 2006).

Нематода поражает большой круг растений, является полифагом. Основными растениями-хозяевами, которые подвергаются наибольшему риску заражения нематодой *A. besseyi*, являются рис и клубника (Sánchez-Monge et al., 2007). Нематода вызывает характерное побеление кончиков верхних листьев риса, которые впоследствии становятся некротическими, а также поражает метелку, что приводит к потере урожая. На землянике (клубнике) можно наблюдать карликовость и сморщивание листьев (Desaeger, Noling, 2017). По данным ЕОКЗР, *A. besseyi* не встречается севернее 43° с. ш. на рисе и 40° с. ш. на клубнике. Однако, согласно отечественной литературе, в нашей стране вредитель на рисе достигал 48° с. ш. (Шестиперов, Савитиков, 1995).

О серьезных потерях, связанных с *A. besseyi* в Японии и части США, сообщали с начала XX века (особенно с 1935 по 1945 г.). Но с появлением устойчивых сортов риса и других мер борьбы вредоносность нематоды уменьшилась.

Рисовая нематода представляет опасность для семенного и посадочного материала: семян риса для посева, растений земляники (клубники), клубней, луковиц, корневищ. Рисовая нематода регулируется в ряде стран, которые экспортируют российскую зерновую продукцию (Вредные организмы, имеющие карантинное значение для Европы, 1996). В случае если рисовая нематода выявляется в поставляемой продукции, в соответствии с международным и национальными фитосанитарными законодательствами могут быть приняты соответствующие фитосанитарные меры (например, осуществлен возврат, уничтожение, обработки или введение временных ограничений на ввоз зерновой продукции из России), которые приведут к существенным экономическим издержкам.

Вредоносность нематоды проявляется в начале роста и развития растений. У сильно зараженных семян риса снижается энергия прорастания и всхожести. Поражение точек роста губительно для растений, так как часто приводит к их усыханию и гибели. Выпад растений в очагах афеленхоидоза достигает 20–35%. У пораженных растений уменьшается число колосков, увеличивается процент неоплодотворенных цветков, щуплых зерен (Кириянова, Кралль, 1971).

Верхние концы пораженных листьев (3–5 см), лишенные хлорофильных зерен, в фазу выметывания белеют, поэтому заболевание первоначально получило название «белое пламя», «белая вершинка», или беловершинность риса (рис. 2) (Кириянова, Кралль, 1971).

Astrakhan Oblast, Stavropol Krai, Dagestan, the Far East, as well as in Uzbekistan, the Republic of Moldova, Ukraine and a number of other countries. Despite the measures taken to control plant nematodes, the problem of reducing the harm they cause is still serious (Butorina et al., 2006).

The nematode infects a wide range of plants, so it is a polyphage. The main hosts most at risk for *A. besseyi* infestation are rice and strawberries (Sánchez-Monge et al., 2007). The nematode causes a characteristic whitening of the tips of the rice upper leaves, which subsequently become necrotic, and also infects the panicle, resulting in yield loss. On wild strawberries (strawberries), stunt and wrinkling of leaves can be observed (Desaeger, Noling, 2017). According to EPPO, *A. besseyi* does not occur north of 43° N on rice and 40° N on strawberries. However, according to literature, in Russia, the pest on rice reached 48° N (Shestiperv, Savotikov, 1995).

Serious losses associated with *A. besseyi* in Japan and parts of the United States have been reported since the beginning of the 20th century (especially from 1935 to 1945). But with the advent of resistant varieties of rice and other control measures, the harmfulness of the nematode has decreased.

The rice leaf nematode is dangerous for seed and planting material: rice seeds for sowing, wild strawberry (strawberry) plants, tubers, bulbs, rhizomes. The rice leaf nematode is regulated in a number of countries that export Russian grain products (Pests of Quarantine Importance for Europe, 1996). If the rice nematode is detected in the supplied products, in accordance with international and national phytosanitary laws, appropriate phytosanitary measures can be taken (for example, return, destruction, processing or the introduction of temporary restrictions on the import of grain products from Russia) that will lead to significant economic costs.

The harmfulness of the nematode manifests itself at the beginning of the growth and development of plants. In severely infected rice seeds, the vigor germination is reduced. Damage to growth points is detrimental to plants, as it often leads to their drying out

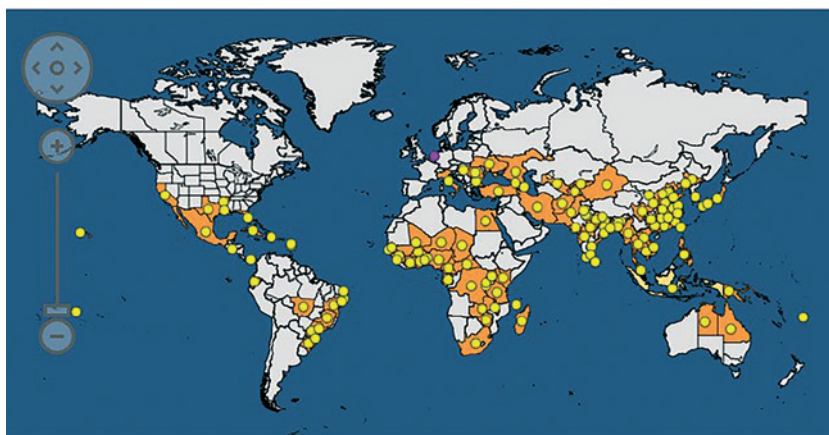


Рис. 1. Распространение рисовой нематоды *Aphelenchoides besseyi* в мире (<https://gd.eppo.int/taxon/APLOBE>)

Fig. 1. *Aphelenchoides besseyi* around the world (<https://gd.eppo.int/taxon/APLOBE>)



Рис. 2. Внешние симптомы поражения растений риса нематодой *Aphelenchoides besseyi* (фото А.В. Иванова)

Fig. 2. External symptoms of damage to rice plants by nematode *Aphelenchoides besseyi* (photo by A.V. Ivanov)

Зараженные растения риса не всегда могут проявлять какие-либо симптомы. Даже если обесцвечивание появляется на всходах восприимчивых сортов в стадии первых 2–3 листьев, как правило, первые хорошо заметные симптомы появляются в конце стадии кущения. На этой стадии поврежденные листья укороченные, заметно скрученные в верхушечной части, гофрированные, с белесыми верхушками. Метелка часто развивается лишь частично или не развивается вообще, ее размер уменьшается, как и число зерен. На более поздней стадии колошения наблюдается пустоколосица (Зиновьева, Чижов, 2012). Кроющиеся чешуйки становятся белыми, зерновка сморщенная, щуплая или совсем отсутствует. Сильно пораженные метелки не понижаются, так как содержат до 90% пустых и щуплых зерен. Характерной особенностью заражения является появление от основания стебля (из нижних узлов) дополнительных мелких метелок. На сильно пораженных растениях наблюдается срастание флага в виде трубки с перемычкой над отрастающей метелкой – «закукливание метелки». Такие растения хорошо заметны в посевах (Харченко, Рубан, 2015).

Симптомы поражения нематодой проявляются также в виде мозаичности, скручивания в спираль и деформации. Афеленхоидоз развивается в течение всего периода вегетации риса и поражает все надземные органы (Sivakumar, 1987). Проявление болезни зависит от сорта риса, погодных условий, агротехники, численности патогена (Giudici, Callegarin, 2005).

Для лабораторного исследования с целью выявления рисовой листовой нематоды применяются как морфологические, так и молекулярные методы. Постоянное совершенствование молекулярных методов требует новых подходов к разработке диагностических протоколов по выявлению и идентификации. Представляется актуальной разработка и применение современных методов в области карантина растений для выявления и идентификации вредителя риса – рисовой листовой нематоды *Aphelenchoides besseyi*.

Для диагностики нематод рода *Aphelenchoides* используются те же молекулярные методы, что и для большинства других видов нематод, включая ПЦР-ПДРФ, ПЦР с видоспецифичными

and death. The loss of plants in the outbreaks of aphelelenchoidosis reaches 20–35%. In affected plants, the number of spikelets decreases, the percentage of unfertilized flowers, feeble grains increases (Kiryanova, Krall, 1971).

The upper ends of the affected leaves (3–5 cm), devoid of chlorophyll grains, turn white during the heading phase, so the disease was originally called “white flame”, “white tip”, or rice white tip (Fig. 2) (Kiryanova, Krall, 1971).

Infected rice plants may not always show any symptoms. Even if discolouration appears on the seedlings of susceptible varieties in the first 2–3 leaf stage, as a rule, the first clearly visible symptoms appear at the end of the tillering stage. At this stage, damaged leaves are shortened, noticeably twisted at the apex, corrugated, with whitish tips. The panicle often develops only partially or does not develop at all, its size decreases, as does the number of grains. At a later stage of heading, an empty ear is observed (Zinovieva and Chizhov, 2012). The covering scales become white, the caryopsis is shriveled, puny or completely absent. Severely affected panicles do not droop, as they contain up to 90% of empty and feeble grains. A characteristic feature of the infection is the appearance of additional small panicles from the base of the stem (from the lower nodes). On severely affected plants, the fusion of the flag in the form of a tube with a bridge over the growing panicle is observed – “panicle pupation”. Such plants are clearly visible in crops (Kharchenko, Ruban, 2015).

Symptoms of nematode damage also appear in the form of mosaic, twisting into a spiral and deformation. Aphelenchoidosis develops during the entire vegetation period of rice and affects all aboveground organs (Sivakumar, 1987). The manifestation of the disease depends on the rice variety, weather conditions, agricultural technology, and the pathogen number (Giudici, Callegarin, 2005).

For laboratory research in order to identify the rice leaf nematode, both morphological and molecular methods are used. Continuous improvement of

праймерами, ПЦР в реальном времени, а также методы частичного секвенирования ДНК (Clemen et al., 2019; Buonicontro et al., 2017; Zhang et al., 2022).

Исследователи из Бразилии используют ПЦР в реальном времени (Buonicontro et al., 2017). В Бразилии *Aphelenchoides besseyi* и *A. fujianensis* часто встречаются в смешанных популяциях, связанных с семенами кормовых трав. Морфологическое сходство между двумя видами ранее приводило к тому, что *A. fujianensis* ошибочно определяли как *A. besseyi*. Для обнаружения каждого вида были разработаны 2 метода ПЦР в режиме реального времени. Американские исследователи используют для диагностики 3 различных локуса: 18S (SSU); фрагменты экспансии D2-D3 гена 28S рРНК и COI; для последующего секвенирования (Clemen et al., 2019).

Целью нашего исследования являлось испытание и оптимизация классической ПЦР с доступными отечественными коммерческими наборами для эффективной идентификации рисовой листовой нематоды *A. besseyi*, в том числе с использованием специфичных праймеров. В настоящее время у российских компаний имеется широкий спектр реагентов для выделения ДНК и амплификации. В частности, ООО «Синтол» (Россия) предлагает набор для выделения нуклеиновых кислот из тканей животных «ДНК-Экстран-2». Базовые комплекты для проведения амплификации, содержащие все необходимые компоненты, за исключением видоспецифичных олигонуклеотидов, производят российские ООО «Синтол», ЗАО «Евроген», ООО «Агро-Диагностика», ЗАО «Диалат Лтд.» и другие компании (<https://www.syntol.ru>, <http://evrogen.ru>, <https://agrodiagnostica.ru/>, <http://dialat.ru/>).

Задачи исследования – оптимизировать тесты на основе классической ПЦР со специфичными праймерами и сравнить эффективность готовых реакционных смесей, предлагаемых российскими компаниями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При проведении исследований использовали рисовых листовых нематод *A. besseyi*, собранных во время экспедиций на Дальний Восток (Приморский край, Ханкайский район) и в Краснодарский край Российской Федерации. Нематоды идентифицированы согласно методическим рекомендациям по выявлению и идентификации рисовой нематоды *Aphelenchoides besseyi* Christie (МР ВНИИКР № 89-2016).

Морфологическое исследование перед выделением ДНК

Перед выделением ДНК провели идентификацию используемых для исследования нематод морфологическим методом. Фотографии исследуемых особей нематод представлены на рисунке 3.

Выделенных нематод переносили в каплю воды на предметное стекло и накрывали покровным стеклом. Микропрепарат нагревали на нагревательном столике до прекращения движения нематод. Затем особей рисовой листовой нематоды просматривали под микроскопом, измеряли диагностические таксономические признаки и проводили идентификацию по морфологическим признакам.

Морфометрические параметры исследуемых нематод соответствовали виду *Aphelenchoides besseyi*.

molecular methods requires new approaches to the development of diagnostic protocols for detection and identification. It seems relevant to develop and apply modern methods in the field of plant protection for the detection and identification of rice pest – rice leaf nematode *Aphelenchoides besseyi*.

Diagnosis of *Aphelenchoides* nematodes uses the same molecular methods as for most other nematode species, including PCR-RFLP, PCR with species-specific primers, real-time PCR, and partial DNA sequencing methods (Clemen et al., 2019; Buonicontro et al., 2017; Zhang et al., 2022).

Brazilian researchers use real-time PCR (Buonicontro et al., 2017). *Aphelenchoides besseyi* and *A. fujianensis* are often detected in mixed forage seed-associated populations in Brazil. Morphological similarities between the two species have previously led *A. fujianensis* to be erroneously identified as *A. besseyi*. To detect each species, 2 real-time PCR methods were developed. American researchers use 3 different loci for diagnosis: 18S (SSU); fragments of the D2-D3 expansion segments of 28S rRNA gene and COI; for subsequent sequencing (Clemen et al., 2019).

The aim of our study was to test and optimize classical PCR with available Russian commercial kits for the effective identification of the rice leaf nematode *A. besseyi*, including the use of specific primers. Currently, Russian companies have a wide range of reagents for DNA extraction and amplification. In particular, Syntol (Russia) offers a DNA-Extran-2 kit for the isolation of nucleic acids from animal tissues. Basic kits for amplification, containing all the necessary components, with the exception of species-specific oligonucleotides, are produced by Russian Syntol, Evrogen, AgroDiagnostica, Dialat Ltd. and other companies (<https://www.syntol.ru>, <http://evrogen.ru>, <https://agrodiagnostica.ru/>, <http://dialat.ru/>).

The objectives of the study are to optimize tests based on classical PCR with specific primers and compare the effectiveness of ready-made reaction mixtures offered by Russian companies.

MATERIALS AND METHODS

When conducting research, we used rice leaf nematodes *A. besseyi* collected during expeditions to the Far East (Primorsky Krai, Khankaisky District) and Krasnodar Krai of the Russian Federation. Nematodes were identified in accordance with the guidelines for the detection and identification of the rice leaf nematode *Aphelenchoides besseyi* Christie (MR VNIICR № 89-2016).

Morphological study before DNA extraction

Before DNA isolation, the nematodes used for the study were identified by the morphological method. Photos of the studied individuals of nematodes are shown in Figure 3.

The isolated nematodes were transferred to a drop of water on a glass slide and covered with a coverslip. The slide was heated on a hot plate until the movement of nematodes ceased. Then, individuals of the rice leaf

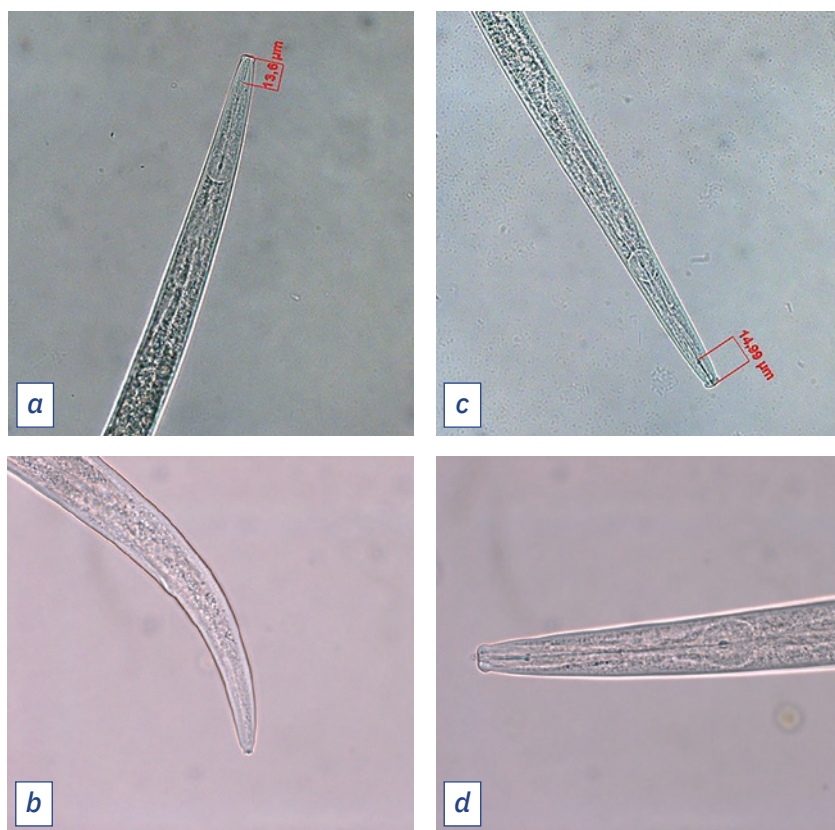


Рис. 3. Образцы, отобранные для исследований (фото А.В. Иванова)

Fig. 3. Samples selected for study (photo by A.V. Ivanov)

Для подтверждения результатов морфологического анализа были применены методы молекулярной диагностики.

Молекулярно-генетическое исследование и применяемые коммерческие наборы для выделения ДНК

Для корректной работы диагностического набора необходимо проводить оптимизацию ПЦР-теста. В лаборатории гельминтологии ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР» было проведено исследование на основе ПЦР с использованием коммерческих смесей.

Основные комплекты для проведения амплификации, содержащие все необходимые компоненты, предлагают компании «Диалат Лтд.» и «Евроген»:

- 5x Mas^{DD}Taq MIX-2025 ЗАО «Диалат Лтд.» (содержит 2 инертных красителя (стабильных при хранении и не ингибирующих амплификацию), основой смеси является термостабильная hot-start полимеразы SmarTaq, позволяющая амплифицировать низкокопийные ДНК-матрицы, сложные последовательности ДНК, может применяться в мультиплексной ПЦР);

- 5x Mas^{OR}Taq MIX-2025 ЗАО «Диалат Лтд.» (содержит инертный краситель (стабильный при хранении и не ингибирующий амплификацию), стабилизатор/энхансер, усиливающий термостабильность фермента при повышенных температурах, улучшая специфичность и чувствительность ПЦР);

- 5x ScreenMix ЗАО «Евроген» (окрашенная реакционная смесь предназначена для проведения ПЦР-анализа большого количества образцов с последующим анализом на гель-электрофорезе);

nematode were examined under a microscope, diagnostic taxonomic characters were measured and identified by morphological characteristics.

The morphometric parameters of the studied nematodes corresponded to the species *Aphelenchoides besseyi*. To confirm the results of morphological analysis, methods of molecular diagnosis were applied.

Molecular genetic testing and applicable commercial kits for DNA extraction

For the correct operation of the diagnostic kit, it is necessary to optimize the PCR test. In Helminthology Laboratory of Testing Laboratory Center at FGBU «VNIICR», a study was conducted based on PCR using commercial mixtures.

Basic kits for amplification, containing all the necessary components, are offered by Dialat Ltd. and Evrogen:

- 5x Mas^{DD}Taq MIX-2025 Dialat Ltd. (contains 2 inert dyes (stable during storage and not inhibiting amplification), the basis of the mixture is the thermostable hot-start polymerase SmarTaq, which allows amplification of low-copy DNA templates, complex

DNA sequences, can be used in multiplex PCR);

- 5x Mas^{OR}Taq MIX-2025 Dialat Ltd. (contains an inert dye (stable during storage and does not inhibit amplification), a stabilizer/enhancer that enhances the thermal stabilization of the enzyme at elevated temperatures, improving the specificity and sensitivity of PCR);

- 5x ScreenMix Evrogen (colored reaction mixture is designed for PCR analysis of a large number of samples with subsequent analysis on gel electrophoresis);

- 5x ScreenMix-HS Evrogen (colored reaction mixture is designed for highly specific PCR amplification of a large number of DNA samples);

- 5x ScreenMix-HS (UDG) Evrogen (colored reaction mixture is intended for routine PCR and amplification of a large number of DNA samples, the presence of UDG (uracil-DNA glycosylase) and dUTP in the optimal concentration in the mixture provides protection against contamination by PCR products containing uracil).

Classical PCR conditions and primer sequences were taken from published articles (Valcheva et al., 2017; Rybarczyk-Mydlowska et al., 2012).

Sample preparation and nematode DNA isolation

DNA isolation using the DNA-Extran-2 commercial kit (Syntol) was carried out according to the manufacturer's instructions. The samples were homogenized with a pestle in a 1.5 ml microtube in a 300 μl lyse solution.

- 5x ScreenMix-HS ЗАО «Евроген» (окрашенная реакционная смесь предназначена для проведения высокоспецифичной ПЦР-амплификации большого количества образцов ДНК);

- 5x ScreenMix-HS (UDG) ЗАО «Евроген» (окрашенная реакционная смесь предназначена для проведения рутинной ПЦР и амплификации большого количества образцов ДНК, наличие в составе смеси UDG (урацил-ДНК-гликозилазы) и dUTP в оптимальной концентрации обеспечивает защиту от контаминации ПЦР-продуктами, содержащими урацил).

Условия проведения классической ПЦР и последовательности праймеров были взяты из опубликованных статей (Valcheva et al., 2017; Rybarczyk-Mydlowska et al., 2012).

Подготовка проб и выделение ДНК нематод

Выделение ДНК коммерческим набором «ДНК-Экстран-2» (ООО «Синтол») проводили согласно инструкции производителя. Образцы гомогенизировали пестиком в микропробирке объемом 1,5 мл в лизирующем растворе объемом 300 мкл.

Метод классической ПЦР

Идентификацию методом ПЦР проводили с использованием пары специфичных праймеров, амплифицирующих фрагменты 325 пар нуклеотидов (Rybarczyk-Mydlowska et al., 2012):

1770 (forward) 5'-GCGGGATTTCGTGGTTC-3';

1772 (reverse) 5'-CGACATGCCGAAACATGAG-3'.

При проведении полимеразной цепной реакции использовали рабочую концентрацию праймеров, равную 10 пикомоль/мкл. Амплификацию проводили в амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США). Режим амплификации приведен в таблице.

Для проведения тестов использовали готовые реакционные смеси компаний ЗАО «Евроген» и ЗАО «Диалат Лтд.» (окрашенные смеси для постановки амплификации с последующим внесением продуктов в гель).

Состав рабочей смеси в ходе исследования был оптимизирован: испытываемая реакционная смесь – 5 мкл, 1770 (forward) – 1 мкл, 1772 (reverse) – 1 мкл, H₂O – 16 мкл, образец ДНК (исследуемый образец) – 2 мкл. Всего 25 мкл.

Испытания проводили на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США). Для тестирования было использовано 5 образцов ДНК рисовой нематоды *Aphelenchoides besseyi*, выделенных набором «ДНК-Экстран-2» в трех повторностях.

Анализ фрагментов ДНК проводили с помощью электрофореза в 1,5 %-м агарозном геле.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение готовых реакционных смесей

Результаты тестирования реакционных смесей для классической ПЦР представлены на электрофореграммах (рис. 4–8).

Оценка результатов апробации реакционных смесей для ПЦР показала, что для выявления и идентификации рисовой листовой нематоды *A. besseyi* подходят все коммерческие смеси, использованные в работе. Смесь 5x ScreenMix ЗАО «Евроген» с экономической точки зрения более выгодна для использования в диагностике большого количества образцов. Для дальнейшей работы выбрана эта смесь.

Таблица

Режим амплификации для праймеров 1770/1772

Table Amplification mode for primers 1770/1772

Условия* Conditions*	T, °C	t, мин t, min	Количество циклов The number of cycles
Первичная денатурация Primary denaturation	94	3:00	1
Денатурация Denaturation	94	0:30	40
Отжиг Annealing	63	0:30	
Элонгация Elongation	72	1:00	
Финальная элонгация Final elongation	72	5:00	1

* T, °C – температура в градусах Цельсия;
t, мин – время в минутах.

* T, °C – temperature in Celsius degrees;
t, min – time in minutes.

Classical PCR method

Identification by PCR was carried out using a pair of specific primers that amplify fragments of 325 bp (Rybarczyk-Mydlowska et al., 2012):

1770 (forward) 5'-GCGGGATTTCGTGGTTC-3';

1772 (reverse) 5'-CGACATGCCGAAACATGAG-3'.

When carrying out the polymerase chain reaction, a working primer concentration of 10 pmol/μl was used. Amplification was carried out in a CFX96 amplifier (Bio-Rad, USA). The amplification mode is shown in the table.

Ready-made reaction mixtures of Evrogen and Dialat Ltd. were used for the tests (colored mixtures for amplification with subsequent introduction of products into the gel).

The composition of the working mixture during the study was optimized: test reaction mixture – 5 μl, 1770 (forward) – 1 μl, 1772 (reverse) – 1 μl, H₂O – 16 μl, DNA sample (test sample) – 2 μl. Total 25 μl.

The tests were carried out on a CFX96 amplifier (Bio-Rad, USA). For testing, 5 DNA samples of the rice leaf nematode *Aphelenchoides besseyi* were used, isolated with the DNA-Extran-2 kit in triplicate.

DNA fragments were analyzed by electrophoresis in 1.5% agarose gel.

RESULTS AND DISCUSSION

Comparison of finished reaction mixtures

The results of testing reaction mixtures for classical PCR are presented on electrophoregrams (Fig. 4–8).

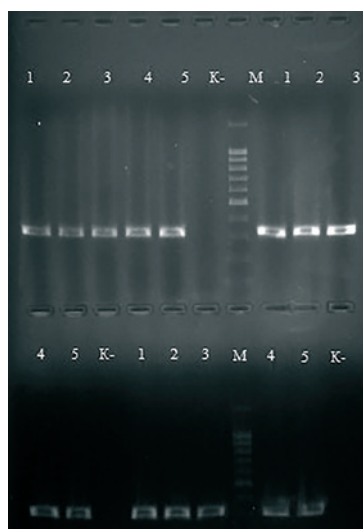


Рис. 4. Электрофореграмма с праймерами 1770/1772 и реакционной смесью 5x Mas^{OD}Taq MIX-2025 ЗАО «Диалат Лтд.» (Россия) Где: с 1-го по 5-й образец – *Aphelenchoides besseyi* (в трех повторностях, образцы 1–3 из Приморского края, 4–5 – из Краснодарского края), K- – отрицательный контрольный образец, M – маркер молекулярного веса 100–1500 п. о.

Fig. 4. Electropherogram with primers 1770/1772 and reaction mixture 5x Mas^{OD}Taq MIX-2025 Dialat Ltd. (Russia) Where: from the 1st to the 5th sample – *Aphelenchoides besseyi* (in triplicate, samples 1–3 from Primorsky Krai, 4–5 from Krasnodar Krai), K- – negative control sample, M – molecular weight marker 100–1500 bp.

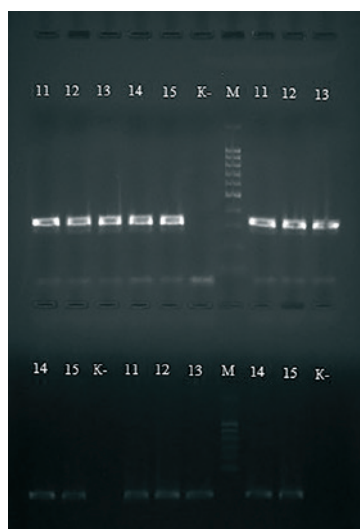


Рис. 5. Электрофореграмма с праймерами 1770/1772 и реакционной смесью 5x Mas^{OR}Taq MIX-2025 ЗАО «Диалат Лтд.» (Россия) Где: с 11-го по 15-й образец – *Aphelenchoides besseyi* (в трех повторностях, образцы 11–13 из Приморского края, 14–15 – из Краснодарского края), K- – отрицательный контрольный образец, M – маркер молекулярного веса 100–1500 п. о.

Fig. 5. Electropherogram with primers 1770/1772 and reaction mixture 5x Mas^{OR}Taq MIX-2025 Dialat Ltd. (Russia) Where: from the 11th to the 15th sample – *Aphelenchoides besseyi* (in triplicate, samples 11–13 from Primorsky Krai, 14–15 from Krasnodar Krai), K- – negative control sample, M – molecular weight marker 100–1500 bp.

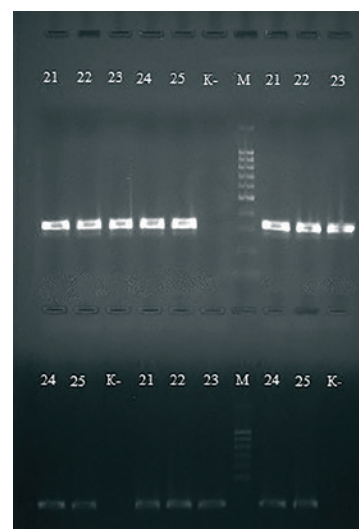


Рис. 6. Электрофореграмма с праймерами 1770/1772 и реакционной смесью 5x ScreenMix ЗАО «Евроген» (Россия) Где: с 21-го по 25-й образец – *Aphelenchoides besseyi* (в трех повторностях, образцы 21–23 из Приморского края, 24–25 – из Краснодарского края), K- – отрицательный контрольный образец, M – маркер молекулярного веса 100–1500 п. о.

Fig. 6. Electropherogram with primers 1770/1772 and reaction mixture 5x ScreenMix Evrogen (Russia) Where: from the 21st to the 25th sample – *Aphelenchoides besseyi* (in triplicate, samples 21–23 from Primorsky Krai, 24–25 from Krasnodar Krai), K- – negative control sample, M – molecular weight marker 100–1500 bp.

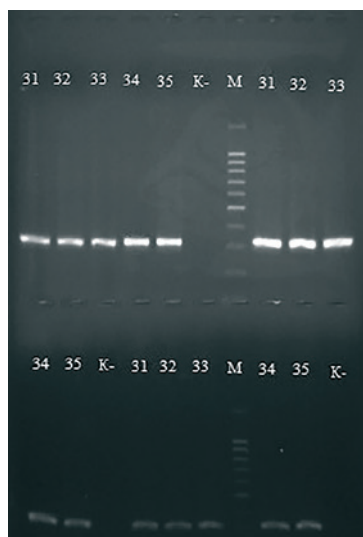


Рис. 7. Электрофореграмма с праймерами 1770/1772 и реакционной смесью 5x ScreenMix-HS ЗАО «Евроген» (Россия) Где: с 31-го по 35-й образец – *Aphelenchoides besseyi* (в трех повторностях, образцы 31–33 из Приморского края, 34–35 – из Краснодарского края), K- – отрицательный контрольный образец, M – маркер молекулярного веса 100–1500 п. о.

Fig. 7. Electropherogram with primers 1770/1772 and reaction mixture 5x ScreenMix-HS Evrogen (Russia) Where: from the 31st to the 35th sample – *Aphelenchoides besseyi* (in triplicate, samples 31–33 from Primorsky Krai, 34–35 from Krasnodar Krai), K- – negative control sample, M – molecular weight marker 100–1500 bp.

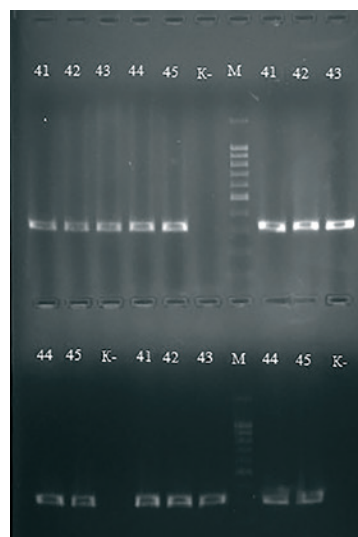


Рис. 8. Электрофореграмма с праймерами 1770/1772 и реакционной смесью 5x ScreenMix-HS (UDG) ЗАО «Евроген» (Россия) Где: с 41-го по 45-й образец – *Aphelenchoides besseyi* (в трех повторностях, образцы 41–43 из Приморского края, 44–45 – из Краснодарского края), K- – отрицательный контрольный образец, M – маркер молекулярного веса 100–1500 п. о.

Fig. 8. Electropherogram with primers 1770/1772 and reaction mixture 5x ScreenMix-HS (UDG) Evrogen (Russia) Where: from the 41st to the 45th sample – *Aphelenchoides besseyi* (in triplicate, samples 41–43 from Primorsky Krai, 44–45 from Krasnodar Krai), K- – negative control sample, M – molecular weight marker 100–1500 bp.

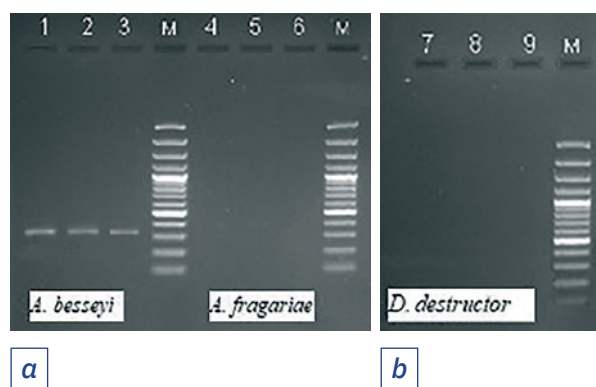


Рис. 9. Электрофореграмма классической ПЦР с праймерами 1770/1772
Где: с 1-го по 3-й образец – *Aphelenchoides besseyi*, с 4-го по 6-й образец – *Aphelenchoides fragariae*, с 7-го по 9-й образец – *Ditylenchus destructor*, М – маркер молекулярного веса 100–1500 п. о.

Fig. 9. Electropherogram of classical PCR with primers 1770/1772
Where: from the 1st to the 3rd sample – *Aphelenchoides besseyi*, from the 4th to the 6th sample – *Aphelenchoides fragariae*, from the 7th to the 9th sample – *Ditylenchus destructor*, М – molecular weight marker 100–1500 bp.

Для подтверждения специфичности праймеров 1770/1772 были использованы нецелевые организмы: близкий вид земляничная нематода *Aphelenchoides fragariae* и стеблевая нематода картофеля *Ditylenchus destructor* (рис. 9). Апробированный метод ПЦР со специфичными праймерами подходит для диагностики и дифференциации видов. При анализе электрофореграммы установлено, что специфичные праймеры 1770/1772 пригодны для использования при идентификации рисовой нематоды *A. besseyi*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучен и апробирован метод молекулярно-генетической идентификации рисовой листовой нематоды *Aphelenchoides besseyi*, используемый в зарубежных исследованиях. Апробирован метод ПЦР со специфичными праймерами 1770/1772 для идентификации *A. besseyi*. Данная тест-система подходит для идентификации нематод, полученных из разных регионов Российской Федерации. Тестирование пары праймеров 1770/1772 с нецелевыми видами нематод показало их специфичность к целевому объекту *A. besseyi*. Праймеры могут использоваться для диагностики рисовой листовой нематоды *A. besseyi*. Проведено исследование ПЦР с использованием коммерческих смесей для амплификации 5x Mas^{DD}Taq MIX-2025 и 5x Mas^{ORTaq} MIX-2025 ЗАО «Диалат Лтд.», а также 5x ScreenMix, 5x ScreenMix-HS и 5x ScreenMix-HS (UDG) ЗАО «Евроген». Все готовые реакционные смеси могут использоваться для проведения ПЦР, но 5x ScreenMix ЗАО «Евроген» с экономической точки зрения более выгодна для использования в диагностике большого количества образцов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Буторина Н., Зиновьева С., Кулинич О. и др. Прикладная нематология. – М.: Наука, 2006, 350 с.
2. Вредные организмы, имеющие карантинное значение для Европы. – М.: Колос, 1996, с. 316–319.
3. Деккер Х. Нематоды растений и борьба с ними. – М.: Колос, 1972, 444 с.

Evaluation of the approbation results of reaction mixtures for PCR showed that all commercial mixtures used in the work are suitable for detection and identification of the rice leaf nematode *A. besseyi*. From an economic point of view, the mixture 5x ScreenMix of Evrogen is more profitable for use in the diagnosis of a large number of samples. This mixture was chosen for further work.

To confirm the specificity of primers 1770/1772, non-target organisms were used: a closely related species, strawberry nematode *Aphelenchoides fragariae* and potato stem nematode *Ditylenchus destructor* (Fig. 9). The proven PCR method with specific primers is suitable for diagnosis and species differentiation. When analyzing the electropherogram, it was found that specific primers 1770/1772 are suitable for use in the identification of the rice leaf nematode *A. besseyi*.

CONCLUSION

The method of molecular genetic identification of the rice leaf nematode *Aphelenchoides besseyi*, used in international research papers, has been studied and tested. The PCR method with specific primers 1770/1772 was tested for the identification of *A. besseyi*. This test system is suitable for identifying nematodes obtained from different regions of the Russian Federation. Testing of primer pair 1770/1772 with non-target nematode species showed their specificity for the target *A. besseyi*. The primers can be used to diagnose the rice leaf nematode *A. besseyi*. PCR study performed using commercial amplification mixtures 5x Mas^{DD}Taq MIX-2025 and 5x Mas^{ORTaq} MIX-2025 Dialat Ltd., as well as 5x ScreenMix, 5x ScreenMix-HS and 5x ScreenMix-HS (UDG) Evrogen. All ready-made reaction mixtures can be used for PCR, but 5x ScreenMix by Evrogen is more economical from an economic point of view for use in the diagnosis of a large number of samples.

REFERENCES

1. Butorina N., Zinovieva S., Kulinich O. et al. Applied nematology [Prikladnaya nematologiya]. M.: Nauka, 2006, 350 p.
2. Pests of quarantine importance for Europe [Vrednyye organizmy, imeyushchiye karantinnoye znachenie dlya Yevropy]. M.: Kolos, 1996, p. 316–319 (in Russian).
3. Dekker H. Plant nematodes and their control [Nematody rasteniy i borba s nimi]. M.: Kolos, 1972, 444 p. (in Russian).
4. Kiryanova E., Krall E. Plant parasitic nematodes and their control measures [Paraziticheskiye nematody rasteniy i mery borby s nimi]. L.: Nauka, 1971; Vol. 2, 522 p. (in Russian).
5. Kostylev P. Weeds, diseases and pests of rice agroecosystems in the south of Russia [Sornyye rasteniya, bolezni i vrediteli risovykh agrotsenozov yuga Rossii]. M.: Pechatnyy gorod, 2011, 368 p. (in Russian).
6. Popova M. Effect of chitosan and thiabendazole on rice productivity and infection with rice leaf nematode [Vliyaniye khitozana i tiabendazola na produktivnost' risa i zarazhennost' risovoy

4. Кирьянова Е., Кралль Э. Паразитические нематоды растений и меры борьбы с ними. – Л.: Наука, 1971, Т. 2, 522 с.
5. Костылев П. Сорные растения, болезни и вредители рисовых агроценозов юга России. – М.: Печатный город, 2011, 368 с.
6. Попова М., 2001. Влияние хитозана и тиабендазола на продуктивность риса и зараженность рисовой листовой нематодой. – Труды Всероссийского ин-та гельминтологии им. К. И. Скрыбина, Т. 37: 116–123.
7. Попова М., 2004. Методические рекомендации: Афеленхоидоз риса и эпифитотиологические основы борьбы с ним. – Труды Всероссийского ин-та гельминтологии им. К.И. Скрыбина, Т. 40: 461–497.
8. Фитопаразитические нематоды России. Под ред. С. Зиновьевой, В. Чинова. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2012, с. 159–161.
9. Харченко Е., Рубан М., 2015. Афеленхоидоз риса и меры борьбы с ним. – Рисоводство, № 1–2 (26–27): 28–32.
10. Шестиперов А., Савотиков Ю. Карантинные фитогельминтозы. Кн. 1. – М.: Колос, 1995, 463 с.
11. PM 7/39 (1) *Aphelenchoides besseyi*, 2004. – Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 34: 155–157.
12. Brown D., Dalmasso A., Trudgill D., 1993. Nematode pests of soft fruits and vines. – Plant parasitic nematodes in temperate agriculture, 427–462; 138 ref.
13. Oliveira C.J., Subbotin S., Álvarez-Ortega S., Desaegeer J., Brito J.A., K.V. Xavier, L.G. Freitas, S. Vau, Inserra R.N., 2019. Morphological and Molecular Identification of Two Florida Populations of Foliar Nematodes (*Aphelenchoides* spp.) Isolated From Strawberry With the Description of *Aphelenchoides pseudogoodeyi* sp. n. (Nematoda: Aphelenchoididae) and Notes on Their Bionomics. – Plant Disease, 103 (11): 2825–2842. URL: <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-19-0752-RE>.
14. Buonicontro D., Roberts D., Oliveira C., Blok V., Neilson R., D'arc De Lima Oliveira R., 2017. A Rapid Diagnostic for Detection of *Aphelenchoides besseyi* and *A. fujianensis* Based on Real-Time PCR. – Plant Disease. URL: <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-17-1160-RE>.
15. Desaegeer J., Noling J., 2017. Foliar or Bud Nematodes in Florida Strawberries. – University of Florida, IFAS Extension Publication ENY-068.
16. Giudici M., Callegarin A. Pest risk analysis. Ente Nazionale Risi – Rice Research Centre – Italy. January 2005. Ente Nazionale Risi – Rice Research Centre – Italy. 04/10795 P PM Point 6.2.3.
17. Rybarczyk-Mydlowska K., Mooyman P., van Megen H., van den Elsen S., Vervoort M., Veenhuizen P., van Doorn J., Dees R., Karssen G., Bakker J., Helder J., 2012. Small subunit ribosomal DNA-based phylogenetic analysis of foliar nematodes (*Aphelenchoides* spp.) and their quantitative detection in complex DNA backgrounds. – Phytopathology, 102 (12): 1153–1160. URL: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-12-0114-R>.
18. Sánchez-Monge A., Flores L., Salazar L., Hockland S., Bert W., 2015. An updated list of the plants associated with plant-parasitic *Aphelenchoides* (Nematoda: Aphelenchoididae) and its implications for plant-parasitism within this genus. – Zootaxa, 4013 (2): 207–224.
19. Sivakumar C., 1987. Post-embryonic development of *Aphelenchoides besseyi* in vitro and its longevity in stored rice seeds. – Indian Journal of Nematology, 17 (1): 147–148; 1 ref.
- listovoy nematodoy]. Proceedings of the K. I. Scriabin All-Russian Institute of Helminthology, 2001; 37: 116–123 (in Russian).
7. Popova M. Guidelines: Aphelenchoidosis of rice and epiphytological bases of its control [Metodicheskiye rekomendatsii: Afelenkhoidoz risa i epifitotologicheskiye osnovy borby s nim]. Proceedings of the K.I. Scriabin All-Russian Institute of Helminthology, 2004; 40: 461–497 (in Russian).
8. Phytoparasitic nematodes of Russia [Fitoparaziticheskiye nematody Rossii]. Ed. S. Zinovieva, V. Chizhov. M.: Association of Scientific Publications KMK, 2012; 159–161 (in Russian).
9. Kharchenko E., Ruban M. Rice aphelenchoidosis and ways of its control [Afelenkhoidoz risa i mery borby s nim]. *Rice growing*, 2015; 1–2 (26–27): 28–32 (in Russian).
10. Shestiperov A., Savotikov Yu. Quarantine phytohelminthiasis [Karantinnyye fitogelmintozy]. Book 1. M.: Kolos, 1995; 463 p. (in Russian).
11. PM 7/39 (1) *Aphelenchoides besseyi*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 2004; 34: 155–157.
12. Brown D., Dalmasso A., Trudgill D. Nematode pests of soft fruits and vines. *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*, 1993: 427–462; 138 ref.
13. Oliveira C.J., Subbotin S., Álvarez-Ortega S., Desaegeer J., Brito J.A., K.V. Xavier, L.G. Freitas, S. Vau, Inserra R.N. Morphological and Molecular Identification of Two Florida Populations of Foliar Nematodes (*Aphelenchoides* spp.) Isolated From Strawberry With the Description of *Aphelenchoides pseudogoodeyi* sp. n. (Nematoda: Aphelenchoididae) and Notes on Their Bionomics. *Plant Disease*, 2019; 103 (11): 2825–2842. URL: <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-19-0752-RE>.
14. Buonicontro D., Roberts D., Oliveira C., Blok V., Neilson R., D'arc De Lima Oliveira R. A Rapid Diagnostic for Detection of *Aphelenchoides besseyi* and *A. fujianensis* Based on Real-Time PCR. *Plant Disease*, 2017. URL: <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-17-1160-RE>.
15. Desaegeer J., Noling J., 2017. Foliar or Bud Nematodes in Florida Strawberries. University of Florida, IFAS Extension Publication ENY-068.
16. Giudici M., Callegarin A. Pest risk analysis. Ente Nazionale Risi – Rice Research Centre – Italy. January 2005. Ente Nazionale Risi – Rice Research Centre – Italy. 04/10795 P PM Point 6.2.3.
17. Rybarczyk-Mydlowska K., Mooyman P., van Megen H., van den Elsen S., Vervoort M., Veenhuizen P., van Doorn J., Dees R., Karssen G., Bakker J., Helder J. Small subunit ribosomal DNA-based phylogenetic analysis of foliar nematodes (*Aphelenchoides* spp.) and their quantitative detection in complex DNA backgrounds. *Phytopathology*, 2012; 102 (12): 1153–1160. URL: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-12-0114-R>.
18. Sánchez-Monge A., Flores L., Salazar L., Hockland S., Bert W. An updated list of the plants associated with plant-parasitic *Aphelenchoides* (Nematoda: Aphelenchoididae) and its implications for plant-parasitism within this genus. *Zootaxa*, 2015; 4013 (2): 207–224.
19. Sivakumar C. Post-embryonic development of *Aphelenchoides besseyi* in vitro and its longevity in stored

20. Valcheva S., Samaliev H., Kostova M. Distribution and Molecular Identification of Rice White Tip Nematode *Aphelenchoides besseyi* in Rice Growing Areas in Bulgaria. ISSN 1314-6246, 2017.

21. Zhang A., Bin S., Zhang J., Cheng C., Zhou J., Fuan N., Luo Z., Yu L., Yu C., Dai Y., Xie K., Hu Qi., Qiu Y., Cao L., Chu H. 2022. CRISPR/Cas12a Coupled With Recombinase Polymerase Amplification For Sensitive And Specific Detection Of *Aphelenchoides besseyi*. – *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10: 912959. URL: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.912959>.

22. Глобальная база данных ЕОКЗР [Электронный ресурс]. URL: <https://gd.eppo.int/taxon/APLOBE> (дата обращения: 11.08.2022).

23. Федеральная таможенная служба [Электронный ресурс]. – URL: <http://stat.customs.gov.ru/analysis> (дата обращения: 13.08.2022).

24. Научно-производственная компания «Синтол» [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.syntol.ru> (дата обращения: 11.05.2022).

25. Российская биотехнологическая компания «Евроген» [Электронный ресурс]. – URL: <http://evrogen.ru> (дата обращения: 11.05.2022).

26. ООО «АгроДиагностика». Разработка систем диагностики и детекции инфекционных заболеваний сельскохозяйственной продукции [Электронный ресурс]. – URL: <https://agrodiagnostica.ru/> (дата обращения: 11.05.2022).

27. Компания «Диалат Лтд.» [Электронный ресурс]. – URL: <http://dialat.ru/> (дата обращения: 11.05.2022).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Иванов Антон Владиславович, младший научный сотрудник лаборатории гельминтологии ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; *e-mail: tonijons8@mail.ru*.

Ушкова Мария Владиславовна, младший научный сотрудник лаборатории энтомологии ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; *e-mail: ushkovamariavladislavovna@gmail.com*.

rice seeds. *Indian Journal of Nematology*, 1987; 17 (1): 147–148; 1 ref.

20. Valcheva S., Samaliev H., Kostova M. Distribution and Molecular Identification of Rice White Tip Nematode *Aphelenchoides besseyi* in Rice Growing Areas in Bulgaria. ISSN 1314-6246, 2017.

21. Zhang A., Bin S., Zhang J., Cheng C., Zhou J., Fuan N., Luo Z., Yu L., Yu C., Dai Y., Xie K., Hu Qi., Qiu Y., Cao L., Chu H. CRISPR/Cas12a Coupled With Recombinase Polymerase Amplification For Sensitive And Specific Detection Of *Aphelenchoides besseyi*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022; 10: 912959. URL: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.912959>.

22. EPPO Global Database [Electronic resource]. URL: <https://gd.eppo.int/taxon/APLOBE> (last accessed: 11.08.2022).

23. Federal Customs Service [Electronic resource]. URL: <http://stat.customs.gov.ru/analysis> (last accessed: 13.08.2022).

24. Scientific and production company Syntol [Electronic resource]. URL: <https://www.syntol.ru> (last accessed: 11.05.2022).

25. Russian biotechnology company Evrogen [Electronic resource]. URL: <http://evrogen.ru> (last accessed: 11.05.2022).

26. AgroDiagnostica. Development of diagnostic and detection systems for infectious diseases of agricultural products [Electronic resource]. URL: <https://agrodiagnostica.ru/> (last accessed: 11.05.2022).

27. Dialat Ltd. [Electronic resource]. URL: <http://dialat.ru/> (last accessed: 11.05.2022).

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Anton Ivanov, Junior Researcher, Helminthology Laboratory of Testing Laboratory Center, FGBU “VNI IKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; *e-mail: tonijons8@mail.ru*.

Maria Ushkova, Junior Researcher, Entomology Laboratory of Testing Laboratory Center, FGBU “VNI IKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; *e-mail: ushkovamariavladislavovna@gmail.com*.