

Оптимизированный подход к выявлению нематод рода *Heterodera* и карантинного вида *Heterodera glycines*

А.В. ИВАНОВ¹, С.В. СУДАРИКОВА²,
Е.А. ХУДЯКОВА³

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

¹ e-mail: tonijons8@mail.ru

² e-mail: sudarikovah@mail.ru

³ e-mail: fer59@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Проведены апробирование и оптимизация тестов на основе полимеразной цепной реакции с использованием коммерческих наборов реагентов российского производства для выделения и амплификации ДНК соевой цистообразующей нематоды *Heterodera glycines* Ichinohe в формате классической ПЦР. Подтверждена пригодность отечественных коммерческих наборов для данного исследования.

Ключевые слова. Карантин растений, соевая цистообразующая нематода *Heterodera glycines* Ichinohe, морфологические признаки, морфометрия, молекулярно-генетические методы, полимеразная цепная реакция (ПЦР), секвенирование.

Для корреспонденции. Иванов Антон Владиславович, младший научный сотрудник лаборатории гельминтологии Испытательного лабораторного центра ФГБУ «ВНИИКР», 140150, Россия, Московская обл., г. Раменское, р. п. Быково, ул. Пограничная, 32, e-mail: tonijons8@mail.ru.



ВВЕДЕНИЕ

Соя является ценным ингредиентом пищевых продуктов и кормов, важнейшим компонентом многих фармацевтических препаратов и косметических средств. Популярность этой культуры связана в первую очередь с высокой концентрацией белка, который содержится в бобах (в среднем около 40% от массы семени), и достаточно высокой урожайностью.

Общая площадь под соей в мире в 2019 г. составила 122 млн га, мировое производство достигло 336 млн тонн. Более 80% мирового производства сои приходится на 3 страны: США, Бразилию и Аргентину.

Optimized Approach for the Detection of *Heterodera* spp. and the Quarantine Species *Heterodera glycines*

A.V. IVANOV¹, S.V. SUDARIKOVA²,
E.A. KHUDYAKOVA³

All-Russian Plant Quarantine Center (FGBU "VNIICR"),
Bykovo, Ramenskoye,
Moscow region, Russia

¹ e-mail: tonijons8@mail.ru

² e-mail: sudarikovah@mail.ru

³ e-mail: fer59@mail.ru

ABSTRACT

The approbation and optimization of PCR tests using Russian commercial reagents kits for the DNA extraction and amplification of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* Ichinohe in classic PCR format has been carried out. The suitability of Russian commercial kits for this study has been confirmed.

Key words. Plant quarantine, soybean cyst nematode *Heterodera glycines* Ichinohe, morphological characteristics, morphometry, molecular genetic methods, polymerase chain reaction (PCR), sequencing.

For correspondence. Anton Ivanov, Junior Researcher of Helminthology Laboratory of FGBU "VNIICR" Test Laboratory Center, 140150, Russia, Moscow region, Ramenskoye, Bykovo, Pogranichnaya str. 32, e-mail: tonijons8@mail.ru.

INTRODUCTION

Soy is a valuable ingredient of food and forage, a major component of many pharmaceuticals and cosmetics. This culture's popularity is mainly accounted for by high protein concentration in beans (about 40% of the seed mass on average), and a fairly high yield.

The total area of soybeans cultivation in the world in 2019 amounted to 122 million hectares, the world production reached 336 million tons. Over 80% of the

На долю России в мировом производстве сои в 2019 г. приходилось около 1,3%. Россия обладает существенными возможностями для развития соевой отрасли: располагает агроклиматическими, земельными, водными ресурсами, уникальным сортовым потенциалом и многолетним опытом возделывания сои.

Ведущая роль в производстве сои в Российской Федерации принадлежит Дальневосточному федеральному округу (Приморский, Хабаровский края, Амурская область), где размещается более 88% посевов сои и производится более 86% ее валового сбора в стране.

Heterodera glycines Ichinohe – соевая цистообразующая нематода, которая наносит огромный ущерб урожаю сои и других бобовых культур. Впервые была обнаружена в Японии и Корее в 1915 г. В 1952 г. нематода была описана исследователем Ichinohe на острове Хоккайдо [1, 2]. *H. glycines* широко распространена в большинстве стран, где производство сои является основой сельскохозяйственной деятельности, особенно в странах Азии.

В мире 10% сельскохозяйственной продукции сои теряется из-за повреждений соевой нематодой, что составляет 1/3 потерь от вредителей и болезней [3, 4]. В 2014 г. *H. glycines* была включена в Перечень карантинных объектов Российской Федерации и затем, в 2016 г., внесена в Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза [5, 6]. В настоящее время соевая нематода ограничено присутствует на территории России в Дальневосточном федеральном округе. С целью пополнения научной коллекции нематод, изучения объекта и разработки методов его идентификации в 2016–2019 гг. состоялись научно-исследовательские экспедиции Всероссийского центра карантина растений (ФГБУ «ВНИИКР») на Дальний Восток России.

Симптомы поражения растений соевой цистообразующей нематодой на надземной части неспецифичны, их можно спутать с дефицитом питательных веществ (особенно с дефицитом железа), стрессом от засухи или другими заболеваниями. Они проявляются в замедлении и отставании в росте растений, пожелтении листьев, снижении урожайности семян. Подобные симптомы наблюдали во время экспедиции на посевах сои (рис. 1). На корнях таких растений было отмечено образование самок с яйцевыми мешками, а также снижение количества клубеньков и появление дополнительных корешков (рис. 2, 3).

Внешние признаки угнетения на отдельных растениях сои и появление очагов пожелтевших растений могут быть основанием для проведения обследований на наличие нематоды. Иногда такие участки пораженных растений были расположены по краю поля, часто в местах, где заезжала техника. Наиболее сильно страдали растения в центре пораженного участка.

Исходя из биологии объекта, оптимальным представляется обследование на присутствие соевой нематоды в период вегетации с отбором растений сои с корневой системой для дальнейшего анализа.

Цикл развития *H. glycines* типичен для всех видов цистообразующих нематод. Для соевой нематоды характерен половой диморфизм: самки лимоновидные, белого цвета, самцы прозрачные

world soybeans production is concentrated in 3 countries: the USA, Brazil and Argentina.

In 2019, Russia's proportion of the soybean production in the world accounted for about 1.3%. Russia has significant opportunities for the soybean industry development: agroclimatic, land, water resources, unique variety potential and many years of experience in soybean cultivation.

The leader of the soybeans production in the Russian Federation is the Far Eastern Federal District (Primorsky Krai, Khabarovsk Krai, Amur Region), where more than 88% of soybean crops are located and more than 86% of its gross harvest in the country is produced.

Heterodera glycines Ichinohe, 1952, is the soybean cyst nematode, which causes great damage to the soybean and other Fabaceae crops. It was first detected in Japan and Korea in 1915. In 1952 the nematode was described on the island of Hokkaido by the researcher Ichinohe [1, 2]. *H. glycines* is widespread in most countries where soybean production is the basis of agricultural activity, especially in Asia.

10% of the world's agricultural soybean production is lost because of the soybean cyst nematode, which amounts to 1/3 of the losses caused by pests and diseases [3, 4]. In 2014, *H. glycines* was included in the Quarantine Pest List of the Russian Federation and then in 2016 it was included in the Common List of Plant Quarantine Objects of the Eurasian Economic Union [5, 6]. At present, soybean cyst nematode is limitedly present in Russia's Far Eastern Federal District. To develop the scientific nematode collection, study the object and develop methods for its identification, in 2016–2019 All-Russian Plant Quarantine Center (FGBU "VNIICR") sent scientific expeditions to Russia's Far East.

The symptoms of plants' damage by soybean cyst nematode on the aerial parts are non-specific, they can be confused with nutritional deficiencies (especially iron deficiency), drought stress, or other diseases. They manifest themselves in slow and irregular plant growth, yellowing of leaves, and a decrease in seed yield. Such symptoms were observed during an expedition to soybean crops (Fig. 1). On the roots of such plants, the formation of females with egg sacs was noted, as well as a decrease in the number of tubercles and the appearance of additional roots (Fig. 2, 3).

External signs of inhibition on individual soybean plants and the appearance of yellowed plants foci may be the basis for surveys for the nematode presence. Sometimes such areas of infected plants were located at the edge of the field, often in places where vehicles entered. Plants in the center of the affected area were infected the most.

According to the biology of the object, the best option is to conduct the examination for the soybean nematodes presence during the growing season selecting soybean plants with root systems for the further studies.

The development cycle of *H. glycines* is common for all cyst nematode species. Soybean nematode is characterized by sexual dimorphism: females are lemon-shaped, white, males are transparent and vermiform. The nematode remains in the stage of eggs and larvae



Рис. 1. Очаги поражения сои нематодой *Heterodera glycines* на Дальнем Востоке России (Приморский край) (фото А.В. Иванова)

Fig. 1. The foci of soybean syst nematode *Heterodera glycines* infection in the Far East of Russia (Primorsky Krai) (photo by A.V. Ivanov)

и червеобразные. Нематода сохраняется в стадии яиц и личинок, находящихся в цистах. Весной личинки инвазируют молодые корни, питаются и превращаются в самок и самцов. Самки остаются в корне, а самцы выходят в почву, оплодотворяют самок и погибают. Самки откладывают яйца в яйцевой мешок или внутри тела (рис. 2, 3). Внутренние органы самок после вызревания внутри них яиц отмирают, кутикула самки утолщается, затвердевает и приобретает коричневый цвет (рис. 4). Такие отмершие самки с яйцами внутри называются цистами. Цисты являются источником инфекции. За вегетационный период может развиваться от 3 до 5 поколений соевой нематоды. Признаки поражения соевой нематодой появляются примерно через 2 месяца после посева [7].

Диагностика *H. glycines* основывается на морфологическом и молекулярном методах. Постоянное совершенствование молекулярных методов требует новых подходов к разработке диагностических протоколов по выявлению и идентификации. Для диагностики цистообразующих нематод рода *Heterodera* используются те же молекулярные методы, что и для большинства других видов нематод, включая полиморфизм длин рестрикционных фрагментов ПЦР-ПДРФ (PCR-RFLP), ПЦР с видоспецифическими праймерами, ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR), а также методы частичного секвенирования (определение нуклеотидной последовательности) ДНК.

В настоящее время молекулярные методы приобретают особое значение, так как в подкарантинной продукции достаточно часто выявляются цисты нематод рода *Heterodera*, которые морфологически очень схожи между собой, например нематоды одной группы. Проведение исследований морфологическим методом в этом случае бывает затруднительно.

Целью исследования являлось испытание и оптимизация способов подготовки проб и тестов

in cysts. In spring, larvae invade young roots, feed and develop to females and males. Females remain in the root, while the males go out into the soil, fertilize the females and die. Females lay eggs in an egg sac or inside the body (Fig. 2, 3). The internal organs of females die off after the eggs inside them mature, the female's cuticle thickens, hardens and turns brown (Fig. 4). Such dead females with eggs inside are called cysts. Cysts are the source of infection. During the growing season, 3 to 5 generations of soybean cyst nematodes can develop. The signs of soybean cyst nematode infection appear approximately 2 months after planting [7].

The diagnosis of *H. glycines* is based on morphological and molecular methods. The constant improvement of molecular methods requires new approaches



Рис. 2. Самки соевой нематоды *Heterodera glycines* на корнях сои (фото А.В. Иванова)

Fig. 2. Female of soybean cyst nematode *Heterodera glycines* on soybean roots (photo by A.V. Ivanov)



Рис. 3. Циста соевой нематоды *Heterodera glycines* с яйцевым мешком на корнях сои (фото А.В. Иванова)

Fig. 3. Cyst of soybean cyst nematode *Heterodera glycines* with an egg sac on soybean roots (photo by A.V. Ivanov)

классической ПЦР с доступными отечественными коммерческими наборами для эффективной идентификации соевой цистообразующей нематоды, в том числе с использованием специфических праймеров. В настоящее время российские компании предлагают широкий набор 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 видоспецифических олигонуклеотидов, предлагают ООО «Синтол», ЗАО «Евроген» (Россия), ООО «АгроДиагностика» (Россия), ЗАО «Диалат Лтд.» (Россия) [8, 9, 10, 11]. Видоспецифические олигонуклеотиды изготавливает ООО «Биотехиндустрия» (Lumiprobe), ЗАО «Евроген», ООО «Синтол».

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оптимизировать тесты на основе классической ПЦР с праймерами, разработанными Hu et al. (2002) и Subbotin et al. (2001) [12, 13]. В рамках этой задачи провести тестирование нематод группы *Schachtii*, сходных между собой морфологически.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась в лаборатории гельминтологии Испытательного лабораторного центра ФГБУ «ВНИИКР». При проведении исследований использовали цисты *H. glycines* в количестве 10 штук, собранные во время экспедиции на Дальний Восток России с растений сои (рис. 5), а также цисты свекловичной *Heterodera schachtii* и люцерновой *Heterodera medicaginis* цистообразующих нематод, полученные из лабораторной коллекции. Перед выделением ДНК провели идентификацию используемых для исследования нематод морфологическим методом согласно МР ВНИИКР № 32-2015 «Методические

to the development of diagnostic protocols for detection and identification. *Heterodera* spp. cyst nematodes diagnosis involves the same molecular methods as those used for many other nematode species, including restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), PCR with species-specific primers, real-time PCR (R-T PCR), as well as methods of DNA partial sequencing (determination of the nucleotide sequence).

Molecular methods are becoming more important as *Heterodera* spp. nematode cysts are quite often detected on regulated products. Morphologically they are quite similar, e. g. nematodes belonging to one group. In this case, conducting research by the morphological method can be difficult.

The aim of the research was testing and optimizing sample preparation methods and classic PCR methods with available Russian commercial kits for the effective identification of soybean cyst nematode, including the use of specific primers. Currently, Russian companies offer a wide range of reagents for DNA extraction and amplification. For example, Syntol (Russia) offers a kit for the isolation of nucleic acids from animal tissues "DNA-Extran-2". Basic kits for carrying out amplification, containing all the necessary components, with the exception of species-specific oligonucleotides, are offered by Syntol, Evrogen (Russia), Agro-Diagnostica (Russia), Dialat Ltd. (Russia) [8, 9, 10, 11]. Species-specific oligonucleotides are produced by Biotechindustria (Lumiprobe), Evrogen and Syntol.

OBJECTIVES OF THE RESEARCH

Optimize tests based on classical PCR with primers designed by Hu et al. (2002) and Subbotin et al. (2001) [12, 13]. As part of this task, test morphologically similar *Schachtii* spp. nematodes.

MATERIALS AND METHODS

The work was carried out in Helminthology Laboratory of FGBU "VNIICR" Testing Laboratory Center. The research involved 10 cysts of *H. glycines* collected during an expedition to the Russian Far East from soybean plants (Fig. 5), as well as the cysts of beet cyst nematode



Рис. 4. Циста соевой нематоды *Heterodera glycines* с яйцевым мешком и самка (фото С.В. Судариковой)

Fig. 4. Cyst of soybean cyst nematode *Heterodera glycines* with an egg sac and a female (photo by S.V. Sudarikova)

рекомендации по выявлению и идентификации соевой нематоды *Heterodera glycines* (Ichinohe)» [14].

МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРЕД ВЫДЕЛЕНИЕМ ДНК

Каждую цисту разрезали, вычищали содержимое в каплю воды и определяли под микроскопом жизнеспособность. Для проведения морфологического анализа изготавливали препараты анально-вульварных пластинок, а оставшуюся половинку цисты помещали в пробирку для последующего молекулярного анализа.

Для анализа молекулярными методами отбирали цисты *H. glycines*, содержащие жизнеспособные яйца и личинки, так как это гарантирует достоверный результат. Жизнеспособные личинки имели типичную червеобразную форму тела и ненарушенную структуру внутренних органов.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Для проведения тестов классической ПЦР использовали коммерческий набор 5x ScreenMix производства ЗАО «Евроген» (окрашенная смесь для постановки амплификации с последующим внесением продуктов в гель) и олигонуклеотиды, изготовленные по заказу в ЗАО «Евроген».

Тестирование молекулярными методами проводили по Hu et al. (2002) и Subbotin et al. (2001) [12, 13].

В качестве положительного контроля использовали ДНК *H. glycines* из лабораторной коллекции.

ПОДГОТОВКА ПРОБ И ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК НЕМАТОДЫ

Выделение ДНК из образцов цист гомогенизацией и нагреванием до температуры денатурации белка в ТЕ-буфере проводили согласно СТО ВНИИКР 6.001-2010 для FLASH-PCR [15]. Гомогенизацию цист с помощью встряхивателя MagNa Lyser (ROCHE, Швейцария) в ТЕ-буфере проводили способом, отработанным в лаборатории гельминтологии и опубликованным ранее: объем боросиликатных шариков – 0,5 мкл, объем раствора – 110 мкл, режим встряхивания – 60 сек при скорости 3000 об/мин [16].

Выделение ДНК коммерческим набором «ДНК-Экстран-2» (ООО «Синтол») проводили согласно инструкции производителя. Цисты гомогенизировали пестиком в микропробирке объемом 1,5 мл в лизирующем растворе объемом 300 мкл [8].

ИССЛЕДОВАНИЕ ДНК НЕМАТОДЫ МЕТОДОМ КЛАССИЧЕСКОЙ ПЦР ПО HU ET AL., 2002 [12]

При проведении исследований использовали следующие праймеры: прямой универсальный праймер JB3 (5' – TTTTGGGATCCTGAGTTTAT – 3') и обратный универсальный праймер JB5 (5' – AGCACCTAAACTTAAACATAATGAAAATG – 3'), которые амплифицируют фрагмент 400 bp, характерный для всех видов нематод рода *Heterodera*. Данный метод использовали для сравнения способов выделения ДНК.

Состав рабочей смеси в ходе исследования был оптимизирован: увеличен объем праймеров и тотальной ДНК по сравнению с рекомендуемым



Рис. 5. Цисты и самки *Heterodera glycines*, отобранные для анализа (фото А.В. Иванова, С.В. Судариковой)

Fig. 5. Cysts and females of *Heterodera glycines* selected for the analysis (photo by A.V. Ivanov, S.V. Sudarikova)

Heterodera schachtii and alfalfa cyst nematode *Heterodera medicaginis* obtained from the laboratory collection. Before DNA extraction, the nematodes used for the study were identified by the morphological method according to MR VNIKР № 32-2015 “Methodological recommendations for the detection and identification of soybean cyst nematode *Heterodera glycines* Ichinohe” [14].

MORPHOLOGICAL EXAMINATION PRIOR TO DNA EXTRACTION

Each cyst was cut open, the contents were cleaned out in a drop of water and the viability was determined under the microscope. For morphological analysis, slides with vulval-anal plates were made, and the remaining half of the cyst was placed in a test tube for further molecular analysis.

H. glycines cysts containing viable eggs and larvae were selected for the analysis by molecular methods as this guarantees a reliable result. Viable larvae had a typical vermiform body shape and an intact structure of internal organs.

MOLECULAR GENETIC STUDY

For classic PCR tests, a commercial kit 5x ScreenMix by Evrogen (colored mixture for setting amplification followed by adding products to the gel) and oligonucleotides custom made by Evrogen were used.

Molecular testing was carried out according to Hu et al. (2002) and Subbotin et al. (2001) [12, 13].

H. glycines DNA from the laboratory collection was used as a positive control.

SAMPLE PREPARATION AND EXTRACTION OF NEMATODE DNA

DNA extraction from cyst samples by homogenization and heating to the protein denaturation temperature in TE buffer was done according to STO VNIKР 6.001-2010 for FLASH-PCR [15]. Homogenization of cysts with MagNa Lyser (ROCHE, Switzerland) in TE buffer was carried out by the method previously tested in the helminthology laboratory: borosilicate beads volume – 0.5 µl, solution volume – 110 µl, shaking mode – 60 sec at a speed of 3000 rpm [16].

Таблица Морфометрические характеристики исследуемых цист (мкм)

Шифр образца	Цисты		
	Длина fenestры	Ширина fenestры	Длина вульварной щели
1	56,0	24,0	46,0
2	49,1	32,8	48,8
3	42,0	30,2	48,5
4	47,3	29,0	46,1
5	49,0	28,0	47,5
6	52,0	27,3	47,3
7	49,8	29,7	48,4
8	51,1	26,2	46,2
9	49,6	30,4	47,2
10	47,9	31,6	46,9
Среднее значение	49,4 ± 3,6 (42,0–56,0)	28,9 ± 2,6 (24,0–32,8)	47,3 ± 1,0 (46,0–48,8)

авторами: 5x ScreenMix – 5 мкл, JB3 – 1 мкл, JB5 – 1 мкл, H₂O – 14 мкл, образец ДНК (исследуемый образец) – 4 мкл. Всего 25 мкл.

Режим амплификации: 15 мин при 95 °С, 40 циклов (по 1 мин при 95 °С, по 1,5 мин при 41 °С, по 2 мин при 72 °С), окончательная элонгация – 10 мин при 72 °С. Амплификацию проводили в амплификаторе CFX96 Bio-Rad.

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

ИССЛЕДОВАНИЕ ДНК НЕМАТОДЫ МЕТОДОМ КЛАССИЧЕСКОЙ ПЦР ПО SUBBOTIN ET AL., 2001 [13]

При проведении исследований использовали следующие праймеры: прямой видоспецифичный праймер GlyF1 (5' – TTACGGACCGTAACTCAA – 3') и обратный универсальный праймер rDNA2 (5' – TTTCACTCGCCGTTACTAAGG – 3'), амплифицирующие фрагмент 181 bp, что соответствует виду *H. glycines*. С целью проверки специфичности праймеров тестировали следующие виды, близкие между собой морфологически и относящиеся к одной группе *Schachtii*: *H. glycines*, *H. schachtii*, *H. medicaginis*.

Состав рабочей смеси в ходе исследования был оптимизирован: увеличен объем праймеров и тотальной ДНК по сравнению с рекомендуемой авторами: 5x ScreenMix – 5 мкл, GlyF1 – 1 мкл, rDNA2 – 1 мкл, H₂O – 14 мкл, образец ДНК (исследуемый образец) – 4 мкл. Всего 25 мкл.

Режим амплификации: 4 мин при 94 °С, 35 циклов (по 30 сек при 94 °С, по 30 сек при 55 °С, по 1,5 мин при 72 °С), окончательная элонгация – 10 мин при 72 °С. Амплификацию проводили в амплификаторе CFX96 Bio-Rad.

DNA extraction with the commercial kit “DNA-Extran-2” (Syntol) was carried out according to the producer’s instructions. Cysts were homogenized with a pestle in a 1.5 ml microtube in a lysis solution with a volume of 300 µl [8].

STUDY OF NEMATODE DNA BY CLASSICAL PCR ACCORDING TO HU ET AL., 2002 [12]

The following primers were used in the studies: forward universal primer JB3 (5' – TTTTGGGATCCTGAGTTTAT – 3') and reverse universal primer JB5 (5' – AGCACCTAAACTTAAACATAATGAAAATG – 3') which amplify the fragment 400 bp typical of all *Heterodera* spp. nematodes. This method was used to compare methods of DNA extraction.

The composition of the PCR mix during the study was optimized: the volume of primers and total DNA increased in comparison with that recommended by the authors: 5x ScreenMix – 5 µl, JB3 – 1 µl, JB5 – 1 µl, H₂O – 14 µl, DNA sample (studied sample) – 4 µl. In total – 25 µl.

Amplification mode: 15 min at 95 °C, 40 cycles (1 min at 95 °C, 1.5 min at 41 °C, 2 min at 72 °C), final elongation – 10 min at 72 °C. Amplification was carried out in the amplifier CFX96 Bio-Rad.

The analysis of DNA fragments was carried out using the method of horizontal electrophoresis in 1.5% agarose gel.

STUDY OF NEMATODE DNA BY CLASSICAL PCR ACCORDING TO SUBBOTIN ET AL., 2001 [13]

The following primers were used in the studies: forward species-specific primer GlyF1 (5' – TTACGGACCGTAACTCAA – 3') and reverse universal primer rDNA2 (5' – TTTCACTCGCCGTTACTAAGG – 3')

Table Morphometric characteristics of the studied cysts (µm)

Sample code	Cysts		
	Fenestra length	Fenestra width	Length of vulval slit
1	56.0	24.0	46.0
2	49.1	32.8	48.8
3	42.0	30.2	48.5
4	47.3	29.0	46.1
5	49.0	28.0	47.5
6	52.0	27.3	47.3
7	49.8	29.7	48.4
8	51.1	26.2	46.2
9	49.6	30.4	47.2
10	47.9	31.6	46.9
Average number	49.4 ± 3.6 (42.0–56.0)	28.9 ± 2.6 (24.0–32.8)	47.3 ± 1.0 (46.0–48.8)

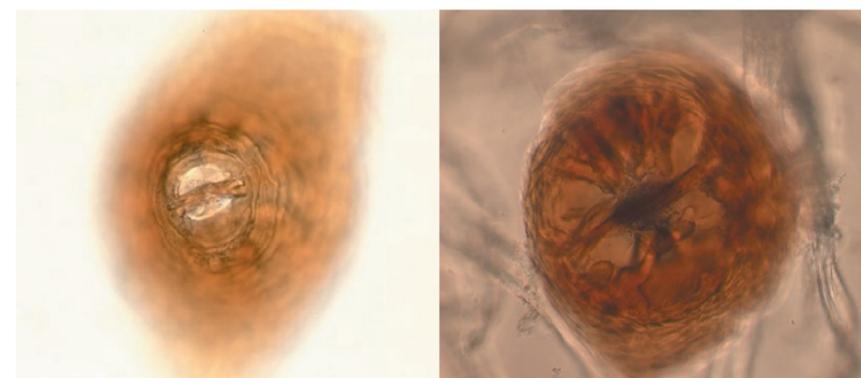


Рис. 6. Анально-вulварная пластинка цисты *Heterodera glycines* (фото А.В. Иванова) Fig. 6. *Heterodera glycines* cyst vulval-anal plate (photo by A.V. Ivanov)

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

После проведения электрофорезов проводили секвенирование и биоинформационный анализ фрагментов ДНК. Проверку, выравнивание и редактирование последовательностей выполняли с помощью программного обеспечения BioEdit v.7.0.5.3. Сравнительный анализ полученных последовательностей проводили с последовательностями базы данных BLAST NCBI [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. На основании проведенных исследований был сделан вывод, что морфологические и морфометрические характеристики исследуемых цист полностью соответствовали виду *Heterodera glycines* (рис. 6, 7; таблица).

Тело личинки червеобразное, с кольчатой кутикулой. Длина личинки около 400 мкм; длина стилета – 21,0–22,8 мкм. Vulvarная пластинка амбифенестрального типа. Длина фенестры – 49,4 ± 3,6 мкм; длина vulvarной щели – 47,3 ± 1,0 мкм. Булле хорошо наблюдаются, они расположены вокруг заднего моста. Форма буллы – от круглых до пальцеобразных, различной длины и ширины. Задний мост развит хорошо (рис. 6).

Heterodera glycines входит в группу *Schachtii* и отличается от близких видов по комбинации морфологических и морфометрических признаков. Так, от *H. schachtii* она отличается формой головок стилета инвазионной личинки (слегка выпуклые, против умеренно или сильно вогнутых), более коротким стилетом личинки (21–23 мкм, против 22–26 мкм) и более длинной фенестрой у цист (34–58 мкм, против 32–38 мкм). От *H. medicaginis* отличается более коротким стилетом (21–23 мкм, против 25 мкм) и хвостом (39–51 мкм, против 52 мкм) у личинок второго возраста.

2. Исследование с универсальными праймерами JB3/JB5 показало, что способ выделения ДНК с помощью набора «ДНК-Экстран-2» (ООО «Синтол») (образцы 1–5) лучше по сравнению со способом выделения в ТЕ-буфере (образцы 6–10). Интенсивность свечения образцов 1–5 на фореграмме выше.

Результаты электрофореза показали, что исследуемые объекты являются нематодами рода *Heterodera*, размер ампликона – 400 bp (рис. 8).

sample (studied sample) – 4 µl. In total – 25 µl.

Amplification mode: 4 min at 94 °C, 35 cycles (30 sec at 94 °C, 30 sec at 55 °C, 1.5 min at 72 °C), final elongation – 10 min at 72 °C. Amplification was carried out in the amplifier CFX96 Bio-Rad.

The analysis of DNA fragments was carried out using the method of horizontal electrophoresis in 1.5% agarose gel.

After electrophoresis, sequencing and bioinformatic analysis of DNA fragments were performed. Validation, alignment and editing of sequences was performed using the software BioEdit v.7.0.5.3. The comparative analysis of the obtained sequences was carried out with the sequences of the database BLAST NCBI [17].

RESULTS AND DISCUSSION

1. The conducted research has led to the conclusion that the morphological and morphometric characteristics of the studied cysts totally corresponded to the species *Heterodera glycines* (Fig. 6, 7; Table).

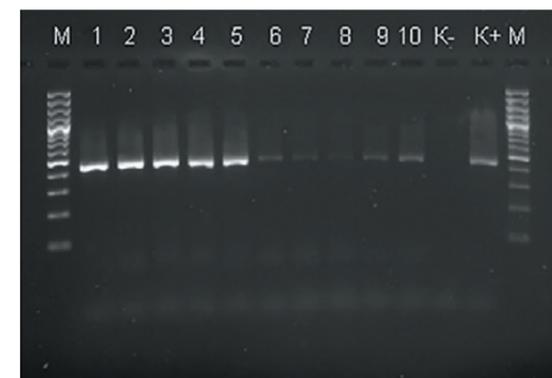
The larva body is vermiform, with ringed cuticle. Larva length about 400 µm; stylet length – 21.0–22.8 µm. Vulvar region ambiphenestral. Fenestra length – 49.4 ± 3.6 µm; vulvar slit length – 47.3 ± 1.0 µm.



Рис. 7. Головная (передняя) часть личинки *Heterodera glycines* (фото С.В. Судариковой) Fig. 7. The head (anterior) part of the *Heterodera glycines* larva (photo by S.V. Sudarikova)

which amplify the fragment 181 bp, which corresponds to the species *H. glycines*. In order to check the specificity of primers, the following species, morphologically close to each other and belonging to the same group *Schachtii*: *H. glycines*, *H. schachtii*, *H. medicaginis*, were tested.

The composition of the PCR mix during the study was optimized: the volume of primers and total DNA increased in comparison with that recommended by the authors: 5x ScreenMix – 5 µl, GlyF1 – 1 µl, rDNA2 – 1 µl, H₂O – 14 µl, DNA



Способы выделения ДНК: 1–5 – при помощи набора «ДНК-Экстран-2»; 6–10 – в ТЕ-буфере. М – маркер; К- – отрицательный контроль (дистиллированная вода); К+ – контроль *H. glycines*

Рис. 8. Результаты ПЦР с универсальными праймерами JB3/JB5 и разными способами пробоподготовки

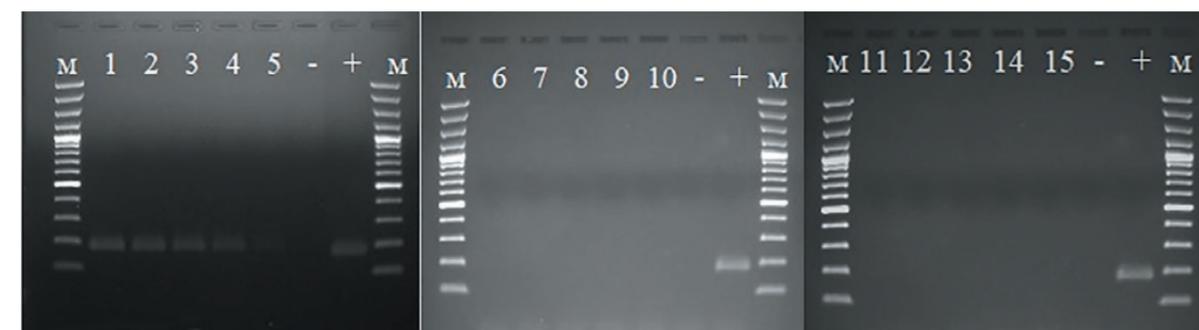
DNA extraction methods: 1–5 – using the kit “DNA-Extran-2”; 6–10 – in TE buffer. M – marker; K- – negative control (distilled water);

K+ – control of *H. glycines*

Fig. 8. PCR results with universal primers JB3/JB5 and different methods of sample preparation

Результаты классической ПЦР были дополнительно подтверждены методом секвенирования. Во всех исследуемых образцах – соевая цистообразующая нематода *H. glycines*, процент покрытия и идентичности составляет 99–100%.

3. Исследование пары праймеров – универсального rDNA2 и видоспецифичного для *H. glycines* GlyF1 – на 3 видах нематод рода *Heterodera* дало положительный результат. Амплификация прошла только в образцах *H. glycines* (181 bp), что подтверждает специфичность праймеров. Однако, интенсивность свечения на фореграмме образцов *H. glycines* невысокая. В образцах близких видов *H. schachtii* и *H. medicaginis* амплификации не наблюдалось (рис. 9).



Образцы 1–5 – *Heterodera glycines*; 6–10 – *Heterodera schachtii*; 11–15 – *Heterodera medicaginis*. «-» – отрицательный контроль (дистиллированная вода); «+» – положительный контроль *H. glycines*

Рис. 9. Результаты ПЦР с праймерами GlyF1/rDNA2

Bullae are clearly seen; they are placed around the vulval bridge. Bullae shape – from round to finger-shaped, of various lengths and widths. Vulval bridge is well-developed (Fig. 6).

Heterodera glycines belongs to *Schachtii* and differs from close species by a combination of morphological and morphometric characters. Thus, it differs from *H. schachtii* by the shape of the stylet heads of the invasive larva (weakly convex against moderately or strongly concave), a larva's shorter stylet (21–23 µm, against 22–26 µm) and a longer fenestra in cysts (34–58 µm, against 32–38 µm). It differs from *H. medicaginis* by a shorter stylet (21–23 µm, against 25 µm) and a tail (39–51 µm, against 52 µm) in second instar larvae.

2. The study with universal primers JB3/JB5 showed that the DNA extraction method using the “DNA-Extran-2” kit (Syntol) (samples 1–5) is better compared to the extraction method in TE buffer (samples 6–10). The luminescence intensity of samples 1–5 on the foregram is higher.

The electrophoresis results showed that the studied objects are *Heterodera* spp. nematodes, amplicon size – 400 bp (Fig. 8).

The results of classical PCR were additionally confirmed by sequencing. All the studied samples were the soybean cyst nematode *H. glycines*, the percentage of coverage and identity is 99–100%.

3. Study of a pair of primers – universal rDNA2 and species-specific for *H. glycines* GlyF1 – on 3 *Heterodera* species nematodes gave a positive result. Amplification took place only in samples *H. glycines* (181 bp), which confirms the specificity of the primers. However, the luminescence intensity on the foregram of the *H. glycines* samples is not high. In close species *H. schachtii* and *H. medicaginis* samples there was no amplification (Fig. 9).

The research results show that the method Subbotin et al. (2001) [13] after adjusting it to increase the glow intensity and validate it, can be used to identify the quarantine species *Heterodera glycines* and can be included in the new Methodological recommendations for the detection and identification of *Heterodera glycines*.

Результаты исследования показывают, что метод Subbotin et al. (2001) [13], после его корректировки с целью увеличения интенсивности свечения и его валидации, возможно применять при идентификации карантинного вида *Heterodera glycines* и включить в новые Методические рекомендации по выявлению и идентификации *Heterodera glycines*.

ВЫВОДЫ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных исследований был сделан вывод, что морфологические и морфометрические характеристики исследуемых цист полностью соответствовали виду *Heterodera glycines*. Все способы выделения ДНК, описанные в работе, подходят для классического метода ПЦР. Наиболее эффективным для выделения ДНК соевой цистообразующей нематоды (*Heterodera glycines* признан набор «ДНК-Экстран-2» (ООО «Синтол»). Метод классической ПЦР Subbotin et al. (2001) с применением готовых отечественных коммерческих наборов 5x ScreenMix ЗАО «Евроген» и праймеров GlyF1 и rDNA2 можно использовать при проведении лабораторных исследований. Предложенный состав рабочей смеси пригоден для использования описанным методом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. EPPO Global Database, 2020. – URL: <https://gd.eppo.int> (дата обращения: 01.09.2020).
2. Ichinohe M. 1952. On the soy bean nematode, *Heterodera glycines* n. sp., from Japan // *Oyo-Dobutsugaku-Zasshi*. – Vol. 17, No. 1–2. – P. 1–4.
3. Волкова Т.В. Соевая нематода (Tylenchida: Heteroderidae: *Heterodera glycines*) в Приморском крае. – Владивосток: Дальнаука, 2003. – 91 с.
4. Qing Yu. Soybean Cyst Nematode (*Heterodera glycines* Ichinohe) // In: Soybean Physiology and Biochemistry / Prof. Hany El-Shemy (Ed.). – InTech, 2011. – 488 p.
5. Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза, утвержденный Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 30.11.2016 № 158. С изменениями и дополнениями от 30.03.2018 (изменения от 02.05.2018 – Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 30.03.2018 № 25). – 2018.
6. Перечень карантинных объектов, утвержденный приказом Министерства сельского хозяйства Российской Федерации от 15.12.2014 № 501.
7. Буторина Н.Н., Зиновьева С.В., Кулинич О.А. и др. Прикладная нематология / Ин-т паразитологии РАН. – Москва: Наука, 2006. – 350 с.
8. Официальный сайт компании «Синтол». – URL: <https://www.syntol.ru> (дата обращения: 03.09.2020).
9. Официальный сайт компании «Евроген». – URL: <http://evrogen.ru> (дата обращения: 03.09.2020).
10. Официальный сайт компании «АгроДиагностика». – URL: <https://www.agrodiagnostica.ru> (дата обращения: 03.09.2020).
11. Официальный сайт компании «Диалат Лтд.». – URL: <http://dialat.ru> (дата обращения: 03.09.2020).
12. Hu M., Høglund J. Mutation scanning analysis of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 reveals limited gene flow among bovine lungworm subpopulations in Sweden // *Electrophoresis*. – 2002. – Vol. 23, No. 19. – P. 3357–3363.

CONCLUSION

The conducted research has led to the conclusion that the morphological and morphometric characteristics of the studied cysts totally corresponded to the species *Heterodera glycines*. All the methods of DNA extraction described in the work are suitable for the classical PCR method. The kit “DNA-Extran-2” (Syntol) was the most effective for the DNA extraction of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. The classic PCR method by Subbotin et al. (2001) using the ready-made Russian commercial kits 5x ScreenMix (Evrogen) and primers GlyF1 and rDNA2 can be applied for laboratory research. The proposed composition of the PCR mix is suitable for use by the described method.

REFERENCES

1. EPPO Global Database, 2020. URL: <https://gd.eppo.int> (last accessed: 01.09.2020).
2. Ichinohe M. On the soy bean nematode, *Heterodera glycines* n. sp., from Japan. *Oyo-Dobutsugaku-Zasshi*. 1952; 17 (1–2): 1–4.
3. Volkova T.V. Soybean nematode (Tylenchida: Heteroderidae: *Heterodera glycines*) in the Primorsky Krai [Soyevaya nematoda (Tylenchida: Heteroderidae: *Heterodera glycines*) v Primorskom Krae]. Vladivostok: Dalnauka, 2003. 91 pp. (In Russian.)
4. Qing Yu. Soybean Cyst Nematode (*Heterodera glycines* Ichinohe). In: Soybean Physiology and Biochemistry. Prof. Hany El-Shemy (Ed.). InTech, 2011. 488 p.
5. Common List of Plant Quarantine Objects of the Eurasian Economic Union approved by the Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission as of 30.11.2016 № 158. As amended and supplemented from 03/30/2018 (changes from 05/02/2018 – Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission from 03/30/2018, No. 25). 2018. (In Russian.)
6. The List of Quarantine Objects approved by order of the Ministry of Agriculture of the Russian Federation dated December 15, 2014, № 501. (In Russian.)
7. Butorina N.N., Zinovieva S.V., Kulinich O.A. et al. Applied Nematology [Prikladnaya nematologiya]. RAS Institute of Parasitology. Moscow: Nauka, 2006. 350 p. (In Russian.)
8. Syntol company official website. URL: <https://www.syntol.ru> (last accessed: 03.09.2020). (In Russian.)
9. Evrogen company official website. URL: <http://evrogen.ru> (last accessed: 03.09.2020). (In Russian.)
10. AgroDiagnostica company official website. URL: <https://www.agrodiagnostica.ru> (last accessed: 03.09.2020). (In Russian.)
11. Dialat Ltd. company official website. URL: <http://dialat.ru> (last accessed: 03.09.2020). (In Russian.)
12. Hu M., Høglund J. Mutation scanning analysis of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 reveals limited gene flow among bovine lungworm subpopulations in Sweden. *Electrophoresis*. 2002; 23 (19): 3357–3363.
13. Subbotin S., Peng D., Moens M. A rapid method for the identification of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* using duplex PCR // *Nematology*. – 2001. – Vol. 3, No. 4. – P. 365–371.
14. МР ВНИИКР № 32-2015 «Методические рекомендации по выявлению и идентификации соевой цистообразующей нематоды *Heterodera glycines* (Ichinohe)». – URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (дата обращения: 03.09.2020).
15. СТО ВНИИКР 6.001-2010 «Картофельные цистообразующие нематоды *Globodera rostochiensis* (Woll.) Behrens и *Globodera pallida* (Stone) Behrens. Методы выявления и идентификации».
16. Сударикова С.В., Иванов А.В., Худякова Е.А. Совершенствование ПЦР-диагностики золотистой картофельной цистообразующей нематоды *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Skarbilovich // Карантин растений. Наука и практика. – 2019. № 4 (30). – С. 9–22.
17. Basic Local Alignment Search Tool / NCBI. – URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (дата обращения: 03.09.2020).

13. Subbotin S., Peng D., Moens M. A rapid method for the identification of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* using duplex PCR // *Nematology*. – 2001. – Vol. 3, No. 4. – P. 365–371.

14. МР ВНИИКР № 32-2015 «Методические рекомендации по выявлению и идентификации соевой цистообразующей нематоды *Heterodera glycines* (Ichinohe)».

15. СТО ВНИИКР 6.001-2010 «Картофельные цистообразующие нематоды *Globodera rostochiensis* (Woll.) Behrens и *Globodera pallida* (Stone) Behrens. Методы выявления и идентификации».

16. Сударикова С.В., Иванов А.В., Худякова Е.А. Совершенствование ПЦР-диагностики золотистой картофельной цистообразующей нематоды *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Skarbilovich // Карантин растений. Наука и практика. – 2019. № 4 (30). – С. 9–22.

17. Basic Local Alignment Search Tool / NCBI. – URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (дата обращения: 03.09.2020).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Иванов Антон Владиславович, младший научный сотрудник лаборатории гельминтологии Испытательного лабораторного центра ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия.

Сударикова Стелла Валериевна, старший научный сотрудник лаборатории гельминтологии Испытательного лабораторного центра ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия.

Худякова Елена Анатольевна, заведующая лабораторией гельминтологии Испытательного лабораторного центра ФГБУ «ВНИИКР», старший научный сотрудник, р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия.

Heterodera glycines using duplex PCR. *Nematology*. 2001; 3 (4): 365–371.

14. MR VNIKR № 32-2015 “Methodological recommendations on the detection and identification of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* (Ichinohe)”. (In Russian.)

15. STO VNIKR 6.001-2010 “Potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* (Woll.) Behrens and *Globodera pallida* (Stone) Behrens. Detection and identification methods”. (In Russian.)

16. Sudarikova S.V., Ivanov A.V., Khudiakova E.A. PCR Diagnostics to Enhance Detection of *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Skarbilovich [Soвершенствование PCR-diagnostics zolotistoy kartofelnoy tsistoobrazuyushey nematody *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Skarbilovich]. *Plant Health. Research and Practice*. 2019; 4 (30): 9–22. (In Russian.)

17. Basic Local Alignment Search Tool. NCBI. URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (last accessed: 03.09.2020).

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Anton Ivanov, Junior Researcher of Helminthology Laboratory of FGBU “VNIKR” Testing Laboratory Center, Bykovo, Ramenskoye, Moscow region, Russia.

Stella Sudarikova, Senior Researcher of Helminthology Laboratory of FGBU “VNIKR” Testing Laboratory Center, Bykovo, Ramenskoye, Moscow region, Russia.

Elena Khudyakova, Head of Helminthology Laboratory of FGBU “VNIKR” Testing Laboratory Center, Bykovo, Ramenskoye, Moscow region, Russia.