

Diagnostyka Diagnostic

Ditylenchus destructor* i *Ditylenchus dipsaci

Zakres

Niniejszy standard opisuje protokół diagnostyczny dotyczący *Ditylenchus destructor* i *Ditylenchus dipsaci*.¹

Zatwierdzenie i nowelizacja

Zatwierdzony jako standard EPPO we wrześniu 2008 r.

Wprowadzenie

Jedynie kilka spośród ponad 80 dotychczas poznanych gatunków nicieni z rodzaju *Ditylenchus* Filipjev, 1936 to pasożyty roślin wyższych, natomiast większość gatunków to mikofagi. Jednym z niewielu gatunków z rodzaju *Ditylenchus* Filipjev, 1936, które pasożytują na roślinach wyższych jest *Ditylenchus destructor*. Występowanie tego gatunku stwierdzono na wszystkich kontynentach, głównie w strefie klimatu umiarkowanego. Jak dotąd znanych jest ponad 100 gatunków roślin żywicielskich tego nicienia. Żywicielami mającymi znaczenie gospodarcze są: ziemniaki *Solanum tuberosum*, *Iris* spp., *Tulipa* spp., *Dahlia* spp., *Gladiolus* spp., *Rheum rhabarbarum*, *Trifolium* spp. i *Daucus carota*. Pewne chwasty (takie jak: *Cirsium arvense*, *Mentha arvensis*, *Potentilla anserine*, *Rumex acetosella* i *Stachys palustris* (Andersson, 1971)) oraz burak cukrowy (*Beta vulgaris*) mogą także być żywicielami i mogą być źródłem infekcji roślin uprawnych. *D. destructor* może także rozwijać się na grzybni wielu grzybów. Nicień poraża podziemne części roślin (bulwy, stolony, cebule, kłącza i korzenie), lecz może okazjonalnie przenikać do nadziemnych części roślin, zwłaszcza nasady łodygi. *D. destructor* w przeciwieństwie do *D. dipsaci* nie jest w stanie przeżyć w warunkach nadmiernego wysychania.

D. dipsaci ma największe znaczenie gospodarcze na świecie spośród nicieni - pasożytów roślin wyższych i jest szeroko rozprzestrzeniony, głównie na obszarach o klimacie umiarkowanym. Znanych jest prawie 500 różnych roślin żywicielskich *D. dipsaci*, lecz istnieją różne rasy biologiczne tego nicienia, które charakteryzują się ograniczoną liczbą żywicieli. *D. dipsaci* jest głównie endopasożytem nadziemnych części roślin (łodygi, liście, kwiaty), lecz poraża także cebule, bulwy i kłącza. *D. dipsaci* z łatwością przeżywa wysychanie i może być wyizolowany nawet z

¹ Użycie w niniejszym Standardzie EPPO nazw handlowych odczynników chemicznych lub marek sprzętu nie pociąga za sobą wykluczenia zastosowania innych odczynników i sprzętu, które także mogą być właściwe.

całkowicie suchego materiału roślinnego po jego zwilżeniu (stadium przetrwalnikowe = osobniki młodociane czwartego stadium).

Tożsamość

Nazwa: *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945

Synonimy: Około 30 synonimów, lecz żaden nie był ostatnio używany (Sturhan i Brzeski, 1991).

Stanowisko taksonomiczne: Nematoda, Tylenchida², Anguinidae

Komputerowy kod EPPO: DITYDE

Kategoria fitosanitarna: Załączniki do Dyrektywy Rady 2000/29/WE z dnia 8 maja 2000 r. w sprawie środków ochronnych przed wprowadzaniem do Wspólnoty organizmów szkodliwych dla roślin lub produktów roślinnych i przed ich rozprzestrzenianiem się we Wspólnocie: II/A2

Nazwa: *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 1936

Synonimy: Około 30 synonimów, lecz żaden nie był ostatnio używany (Sturhan i Brzeski, 1991).

Stanowisko taksonomiczne: Nematoda, Tylenchida, Anguinidae

Komputerowy kod EPPO: DITYDI

Kategoria fitosanitarna: lista A2 EPPO nr 174, Załączniki do Dyrektywy Rady 2000/29/WE z dnia 8 maja 2000 r. w sprawie środków ochronnych przed wprowadzaniem do Wspólnoty organizmów szkodliwych dla roślin lub produktów roślinnych i przed ich rozprzestrzenianiem się we Wspólnocie:II/A2

Wykrywanie

Objawy spowodowane przez *D. destructor*

Powszechnie notowanymi objawami wywoływanymi przez *D. destructor* jest pojawianie się przebarwienia i zgnilizn tkanki roślinnej.

Ziemniaki

Pierwszymi objawami porażenia jest obecność pod skórką białych plamek. Na powierzchni silnie porażonych bulw widoczne są lekko wklęsłe obszary pokryte spękaną i papierowatą skórką (ryc. 1 i 2); tkanka pod skórką jest ciemno zabarwiona i może mieć strukturę mączystą lub gąbczastą. Objawy mogą być lepiej widoczne po okresie przechowywania. Do porażonej tkanki wtórnie przenikają grzyby, bakterie i nicienie wolno żyjące.

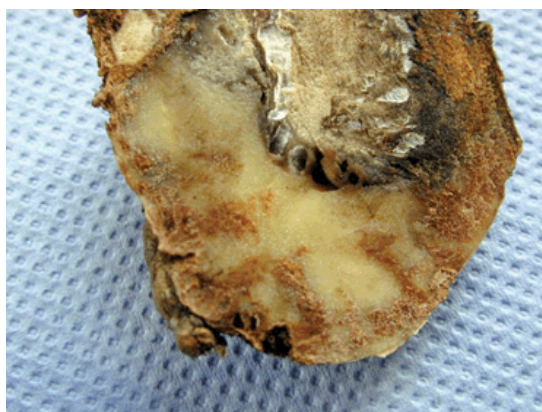
Cebule i bulwocebule roślin ozdobnych

Objawy porażenia zwykle pojawiają się najpierw u nasady cebuli, a następnie rozprzestrzeniają się na mięsiste łuski cebul, przyjmując postać nekroz barwy od żółtej do brązowej. Może występować także wtórne gnicie tkanek, mogące doprowadzić do zniszczenia cebul. Osobniki *D. destructor* gromadzą się na granicy między tkanką z wyraźnymi objawami porażenia a tkanką zdrową, lecz rzadko izoluje się je z tkanek całkowicie rozłożonych.

² Ostatnie osiągnięcia w systematyce nicieni opierające się na danych morfologicznych i wynikach testów molekularnych wskazują na istnienie jednostki taksonomicznej "Tylenchomorpha" (De Ley i Blaxter, 2004).



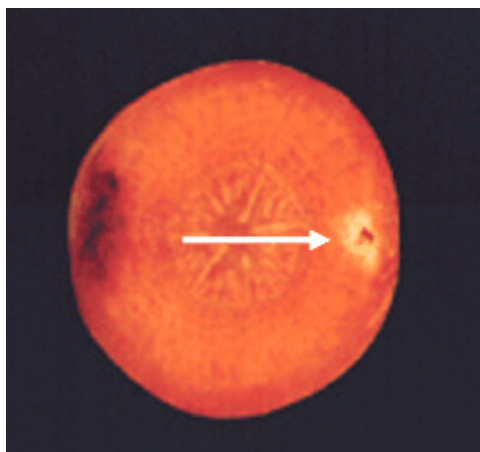
Ryc. 1. Objawy porażenia przez *Ditylenchus destructor* na ziemniaku (reprodukowano za zgodą Central Science Laboratory, York, Wielka Brytania; prawa autorskie © Crown copyright).



Ryc. 2. Objawy porażenia przez *Ditylenchus destructor* na ziemniaku (LNPV Nematology, Rennes, Francja).



Ryc. 3. Korzeń spichrzowy marchwi z poprzecznymi spękaniami powstałymi w wyniku porażenia przez *Ditylenchus destructor*.



Ryc. 4. Przekrój poprzeczny przez korzeń spichrzowy marchwi z podkorową plamą powstałą w wyniku porażenia przez *Ditylenchus destructor*.



Ryc. 5. Objawy porażenia przez *Ditylenchus dipsaci* na roślinie fasoli (reprodukowano za zgodą Central Science Laboratory, York, Wielka Brytania; prawa autorskie © Crown copyright).



Ryc. 6. Objawy porażenia przez *Ditylenchus dipsaci* na nasionach bobu (*Vicia faba*) (Służba Ochrony Roślin, Holandia).

Marchew

Objawy porażenia na korzeniach spichrzowych marchwi mają postać poprzecznych spękań skórki oraz białych podkorowych plam (ryc. 3). Plamy te można z łatwością zauważyć na poprzecznym przekroju korzeni (ryc. 4). Do porażonych tkanek ma miejsce wtórne przenikanie grzybów i bakterii, które doprowadza do ich rozkładu i gnicia.

Objawy spowodowane przez *D. dipsaci*

Powszechnie notowanymi objawami wywoływanymi przez *D. dipsaci* jest grubienie, deformacja, przebarwienie i więdnienie nadziemnych części roślin (ryc. 5) oraz pojawianie się nekroz i zgnilizn cebul i bulw.

Nasiona

Na nasionach drobnych brak widocznych objawów porażenia, lecz na większych nasionach (np. *Phaseolus vulgaris* i *Vicia faba*) skórka może być pokurczona i mogą znajdować się na niej odbarwione plamy (ryc. 6 i 7).

Cebule, bulwy (ryc. 8 i 9)

Na porażonej tkance roślinnej generalnie pojawiają się nekrozy, a u cebul obserwuje się brązowienie łusek, w postaci koncentrycznych kręgów (widoczne na przekroju cebuli, patrz ryc. 10); cebule często stają się miękkie w dotyku, a porażony czosnek niekiedy wytwarza bardzo silny, nieprzyjemny zapach.

Marchew i burak cukrowy

Wczesnymi objawami porażenia marchwi przez *D. dipsaci* jest bezładne układanie się liści, tworzenie się pędów nadziemnych wytwarzających wiele pączków szczytowych oraz niewielkich przebarwień szyjki korzeniowej. W największym stopniu *D. dipsaci* poraża części roślin znajdujące się 2-4 cm pod i nad powierzchnią gruntu. Przy silnym porażeniu przez nicienie obserwuje się zamieranie liści i zgniliznę szyjki korzeniowej (Greco i in., 2002). Powyższe objawy są podobne do tych, które zaobserwowano na korzeniach buraka cukrowego (Dunning, 1957), patrz ryc. 11.

Ekstrakcja nicieni

Ekstrakcja z tkanki roślinnej

Obecność *D. destructor* i *D. dipsaci* w materiale roślinnym może być stwierdzona poprzez umieszczenie podejrzanej o porażenie tkanki roślinnej w wodzie. Materiał roślinny przeznaczony do badań zostaje pocięty na niewielkie kawałki lub plasterki i umieszczony w lejku Baermanna wyłożonym odpowiednim, miękkim filtrem (przykładowo filtrem nematologicznym z waty). Oba gatunki nicieni są bardzo ruchliwe i opuszczają tkankę roślinną w ciągu 2-4 godzin; woda z dolnej części lejka następnie jest analizowana pod mikroskopem na obecność nicieni. Pozostawianie nicieni w wodzie przez zbyt długi okres czasu przyczyni się do zwiększenia ich śmiertelności. Użycie urządzenia nawilżającego „mistifier” pozwoli na pozyskanie nicieni aktywnych przez dłuższy okres czasu. Nicienie można wydobyć z tkanek wykazujących wczesne objawy porażenia metodą maceracji mechanicznej pod mikroskopem stereoskopowym lub poprzez oddziaływanie na tkankę enzymami, choć metoda ta jest raczej kosztowna.



Ryc. 7. Objawy porażenia przez *Ditylenchus dipsaci* na nasionach fasoli (*Phaseolus vulgaris*).



Ryc. 8. Objawy porażenia przez *Ditylenchus dipsaci* na cebuli.



Ryc. 9. Objawy porażenia przez *Ditylenchus dipsaci* na ziemniaku.

Ekstrakcja z gleby

D. dipsaci i *D. destructor* można wydobyć z gleby przy użyciu różnych metod odpowiednich dla nicieni o podobnych rozmiarach (patrz Standard EPPO PM 7/41: Protokół Dignostyczny dla *Meloidogyne chitwoodi* i *Meloidogyne fallax*, Dodatek 1). Należy jednak zauważyć, że nicienie te spotyka się w glebie rzadko, a w przypadku drugiego z wymienionych gatunków sytuacja taka ma miejsce zwłaszcza wtedy, gdy jest obecny w porażonej przez niego roślinie żywicielskiej.

Ekstrakcja D. dipsaci z nasion

W celu ekstrakcji *D. dipsaci*, próbki nasion umieszczane są w lejkach Baermanna (zwłaszcza na sitach wyłożonych miękkim filtrem) i zalane niewielką ilością wody. Woda zostaje spuszczone z nóżki lejka po upływie od 12 godzin do dwóch dni (lub dłuższego okresu czasu, gdy stopień porażenia jest bardzo niewielki) i poddana analizie na obecność nicieni pod mikroskopem. Duże nasiona mogą być rozdrobnione w mikserze, co skraca czas ekstrakcji. Większe próby nasion należy umieszczać w dużej ilości wody, która po upływie jednego dnia (lub dłuższego okresu czasu) jest przelewana do cylindra. Dolna warstwa wody jest analizowana na obecność nicieni pod mikroskopem, po odczekaniu odpowiedniego okresu czasu, który pozwala na osadzenie się nicieni na dnie naczynia. Może być także konieczne precedzenie wody przez 3 sita o średnicy oczek 50 µm lub jedno sito o średnicy oczek 20 µm.

Pozyskanie i identyfikacja osobników *D. dipsaci* z próbek nasion zwykle nie stwarza problemów. Gdy w analizowanym materiale zostaną stwierdzone liczne osobniki nicieni o podobnej budowie i wyłącznie osobniki młodociane (= osobniki młodociane czwartego stadium), wtedy prawdopodobnie należą one do gatunku *D. dipsaci*, chociaż w każdym przypadku powinny one być zidentyfikowane przy użyciu metod opisanych poniżej.

Identyfikacja

Identyfikacja *D. destructor* i *D. dipsaci* w pierwszej kolejności powinna opierać się na identyfikacji przy użyciu metod morfologicznych. Metody molekularne zostały opracowane w celu dokonania identyfikacji *D. destructor* i *D. dipsaci* i mogą być użyte, gdy stopień porażenia jest niewielki lub obecne są tylko osobniki młodociane.

Identyfikacja w oparciu o cechy morfologiczne

Aby było możliwe przeprowadzenie identyfikacji, pojedyncze osobniki nicieni lub zawieszinę nicieni w całości należy powoli podgrzewać (do temperatury około 60°C) do chwili, gdy nicienie przestaną się poruszać.

Ciała osobników *D. destructor* uśmierconych przez delikatne podgrzewanie są prawie proste (nigdy w kształcie litery C, spiralne lub z tylną częścią ciała wyraźnie zgiętą na stronę brzuszną). Generalnie wszystkie stadia rozwojowe (samice, samce, 3 stadia młodociane, jaja) mogą być wyizolowane z porażonych tkanek roślinnych. Obecność w wyekstrahowanym materiale wolno żyjących nicieni mykofagicznych i bakteriofagicznych jest powszechna, zwłaszcza, gdy analizowany jest materiał ulegający rozkładowi (taki jak bulwy ziemniaka).



Ryc. 10. Objawy porażenia przez *Ditylenchus dipsaci* na narcyzie (*Narcissus* sp.) (LNPV Nematology, Rennes, Francja).



Ryc. 11. Objawy porażenia przez *Ditylenchus dipsaci* na buraku (*Beta vulgaris*).

Ciała osobników *D. dipsaci* uśmierconych przez delikatne podgrzewanie są proste lub prawie proste (nigdy w kształcie litery C, spiralne lub z tylną częścią ciała wyraźnie zgiętą na stronę brzuszną). W materiale wyekstrahowanym z próbek nasion rzadko notuje się nicienie należące do gatunku innego niż *D. dipsaci*, lecz gdy nasiona zanieczyszczone są resztkami różnego materiału roślinnego, istnieje możliwość kontaminacji ekstraktu przez inne gatunki nicieni. Z nasion zwykle izolowane są osobniki młodociane czwartego stadium (nie izoluje się osobników dorosłych ani

osobników młodocianych wcześniejszych stadiów), a wyekstrahowane osobniki są podobne do siebie. W cebulach, bulwach, kłączach itp., mogą być obecne osobniki wielu gatunków nicieni, które przenikają do tkanek roślinnych z gleby. W gnijących tkankach roślinnych dominują zwykle osobniki nicieni mikofagicznych i bakteriofagicznych. Osobniki *D. dipsaci* zwykle są notowane w tkankach roślinnych, które są jeszcze żywe. Wszystkie stadia rozwojowe *D. dipsaci* można wyizolować z cebul (samice, samce, 3 stadia młodociane i jaja), lecz osobniki młodociane czwartego stadium zwykle dominują.

Analiza pod mikroskopem powinna być ukierunkowana na nicienie posiadający sztylet (delikatny) o ciele wysmukłym i prawie wyprostowanym, których ogon jest stożkowaty i zaokrąglony na końcu. Odróżnienia *Ditylenchus* spp. od innych nicieni z rzędu Tylenchida należy dokonać przy pomocy poniższego klucza (parz tab. 1). W celu dokonania szczegółowej identyfikacji, w większości przypadków konieczna jest szczegółowa analiza cech morfologicznych nicieni pod dużym powiększeniem mikroskopu.

Tabela 1. Klucz do odróżnienia nicieni z rodzaju *Ditylenchus* od innych rodzajów nicieni z rzędu Tylenchida (według Brzeskiego (1998); zmodyfikowany)

1	Samice ruchome	2
	Samice zgrubiałe, kuliste lub cytrynkowate	Inne rodzaje
2	Układ rozrodczy samicy nieparzysty (prodelficzny) i wyprostowany	3
	Układ rozrodczy samiczy parzysty lub nieparzysty, lecz wygięty ku tyłowi	Inne rodzaje
3	Gruczoły gardzieli są wyraźnie oddzielone od jelita, lub nieznacznie je obejmują	4
	Gruczoły gardzieli wyraźnie zachodzą na jelito	Inne rodzaje
4	Przednia część gardzieli wyraźnie oddzielona od środkowego rozszerzenia gardzieli, zastawki środkowego rozszerzenia gardzieli niewielkie lub nie występują	5
	Przednia część gardzieli stopniowo rozszerza się w środkowe rozszerzenie gardzieli, zastawki środkowego rozszerzenia gardzieli długie	Inne rodzaje
5	Sperma duża, głowa zwykle niska, spermateka nie jest wyraźnie wyodrębniona	<i>Ditylenchus</i>
	Sperma drobna, głowa zwykle wyższa, spermateka wyraźnie wyodrębniona u większości rodzajów	Inne rodzaje

U nicieni należących do innych rodzajów kształt ogona waha się od nitkowatego do szeroko zaokrąglonego na końcu; kształt ciała nicieni uśmierconych przy pomocy wysokiej temperatury – od wyprostowanego, poprzez posiadający kształt litery C, do spiralnego z tylną częścią ciała wyraźnie zgiętą na stronę brzuszną; sztylet może być nieobecny, gardziel jest wyraźnie oddzielona od jelita, wulwa znajduje się w środkowej części ciała, na ogonie samca nigdy nie występuje torebka kopulacyjna (bursa) itp. Osobniki nicieni z rodzaju *Aphelenchoides* najłatwiej można odróżnić na podstawie wyraźnie widocznego, zaokrąglonego środkowego rozszerzenia gardzieli, silnego zachodzenia gardzieli na jelito, obecności mukrona na końcu ogona i braku torebki kopulacyjnej na ogonie samca.

Cechy morfologiczne pozwalające na odróżnienie *D. destructor*, *D. dipsaci*, *D. convallariae* i *D. myceliophagus* przedstawiono w tab. 2, patrz także ryc. 12 i 13.

Tabela 2: Cechy morfologiczne pozwalające na odróżnienie *D. destructor*, *D. dipsaci*, *D. convallariae* i *D. myceliophagus* (wg Deckera, 1969).

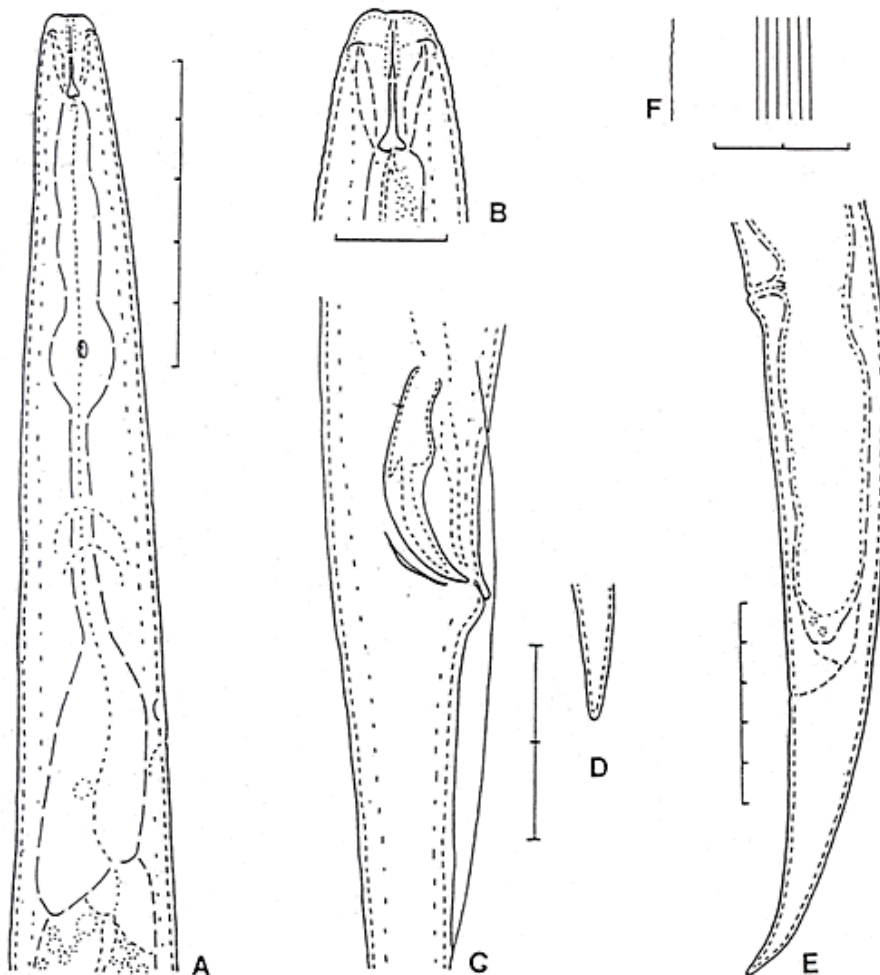
	<i>D. destructor</i>	<i>D. dipsaci</i>	<i>D. convallariae</i>	<i>D. myceliophagus</i>
Wartość wymiaru „a” ♀	32 (18-41)	37 (36-40)	42 (32-54)	30 (23-44)
Długość ciała ♀ (mm)	1,0 (0,8-1,4)	1,1 (0,9-1,3) ³	1,1 (0,9-1,3)	0,9 (0,6-1,0)
Długość sztyletu (µm)	10-12	11-13	11-13	7-10
Tylne rozszerzenie gardzieli	krótkie, po stronie grzbietowej zachodzi na jelito	nie zachodzi na jelito	nie zachodzi na jelito	krótkie, po stronie grzbietowej zachodzi na jelito
Liczba linii bocznych	6	4	6	6
Pozycja wulwy (%)	80 (78-83)	82 (79-82)	77 (74-79)	82.5 (74-90)
Długość woreczka zapochwowego	2/3-3/4 odległości wulwa-odbyt	1/2 odległości wulwa-odbyt	1/4-1/2 odległości wulwa-odbyt	1/3 – 2/3 odległości wulwa-odbyt ⁴
Odległość między wulwą a odbytem	1 3/4-2 1/3 długości ogona	1 3/4-2 1/4 długości ogona	2-2 1/4 długości ogona	2-2 1/4 długości ogona
Kształt ogona	stożkowaty, zwykle lekko zgięty w tylnej części ku stronie brzusznej	stożkowaty	stożkowaty	szeroko stożkowaty
Zakończenie ogona	delikatnie zaokrąglone	wyraźnie zaostrome	wyraźnie zaostrome	delikatnie zaokrąglone
Długość spikul (µm)	9-12	10-12	8-11	9
Długość stożkowatej części sztyletu w % całkowitej długości sztyletu	około 50%	około 50%	<<50%	<<50%

Długość stożkowatej części sztyletu *D. dipsaci* i *D. destructor* wynosi około 50% całkowitej długości sztyletu, podczas gdy u większości innych gatunków z rodzaju *Ditylenchus* długość stożkowatej części sztyletu jest mniejsza od 50% całkowitej długości sztyletu (zwykle ma ona około 1/3 jego długości).

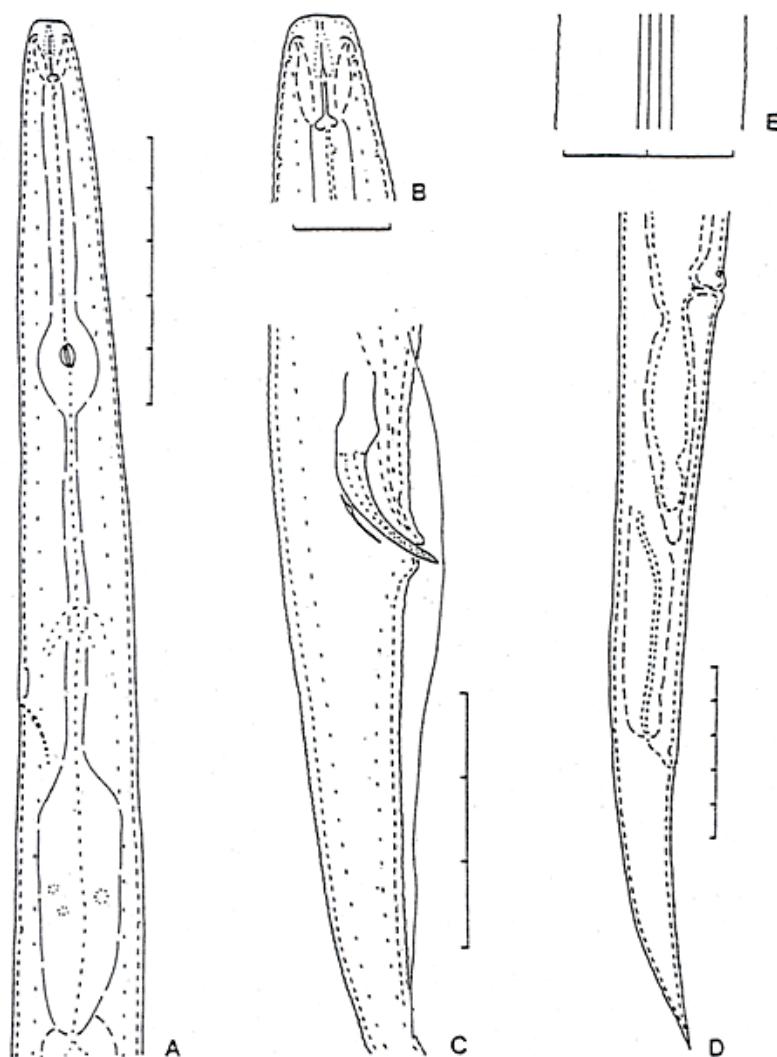
³ Nicienie z rasy „olbrzymiej” występującej na bobiku mogą osiągnąć długość do 2,0 mm.

⁴ W oryginalnym tekście znajduje się zapis „2-2 1/4 odległości wulwa-odbyt”, który jest zapisem błędnym, gdyż długość woreczka zapochwowego nie przekracza odległości między wulwą a odbytem. Dlatego w tłumaczeniu podano wartość poprawną (przyp. tłum.).

U większości gatunków podobnych do *D. dipsaci* na polach bocznych znajdują się cztery linie, gruczoły gardzieli są wyraźnie oddzielone od jelita, a ogon jest wyraźnie zaokrąglony na końcu. Listę gatunków z rodzaju *Ditylenchus* wraz z podaniem ich cech morfologicznych opublikowali Brzeski (1991) oraz Sturhan i Brzeski (1991).



Ryc.12. *Ditylenchus destructor*. (A) przednia część ciała samicy, (B) głowa samicy, (C) okolice spikul samca, (D) zakończenie ogona samicy, (E) tylna część ciała samicy, (F) linie boczne w środkowej części ciała. Długość jednego odcinka na skali wielkości = 10 μ m (Sturhan i Brzeski, 1991).



Ryc.13. *Ditylenchus dipsaci*. (A) przednia część ciała samicy, (B) głowa samicy, (C) okolice spikul samca, (D) zakończenie ogona samicy, (E) linie boczne w środkowej części ciała. Długość jednego odcinka na skali wielkości = 10 μ m (Sturhan i Brzeski, 1991).

Metody molekularne

Opracowano kilka metod molekularnych mających zastosowanie w diagnostyce nicieni z rodzaju *Ditylenchus*, które zostały opisane w Dodatkach.

Test PCR-RFLP, podczas którego amplifikowany jest region ITS w rybosomalnym DNA został opisany w Dodatku 1 (metoda ta pozwala na identyfikację tylko nicieni z gatunków *D. destructor* i *D. dipsaci*).

Test PCR wykorzystujący specyficzne dla gatunku startery został opracowany w celu zdiagnozowania rasy normalnej i olbrzymiej *Ditylenchus dipsaci*. Użycie testu PCR ze specyficznymi starterami pozwala na znaczny rozwój w zakresie diagnostyki DNA i pozwala na wykrycie niszczyków w mieszaninie innych nicieni zasiedlających glebę tylko w wyniku przeprowadzenia pojedynczego testu PCR, co skraca czas analizy i obniża koszty w porównaniu z testem PCR-RFLP. Esquibet i in. (2003) opracowali startery dla testu multiplex-PCR z

zastosowaniem techniki SCAR (technika badająca polimorfizm produktów powielania zsekwencjonowanego regionu) w celu identyfikacji rasy olbrzymiej i normalnej *D. dipsaci* (tabela 4, ryc. 14⁵) (Dodatek 2). Subbotin i in. (2005) opisali specyficzne startery i metodykę PCR w celu wykrycia *D. dipsaci* sensu stricto (Dodatek 3). Zaproponowano też użycie w diagnostyce *D. dipsaci* sensu lato kilku innych specyficznych starterów (Marek i in., 2005 (Dodatek 4); Kerkoud i in., 2007 (Dodatek 5); Zouhar i in., 2007).

Materiały odniesienia

Materiały odniesienia można otrzymać z następujących źródeł:

Julius Kühn Institute (JKI), Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Epidemiology and Pathogen Diagnostics, Toppheideweg 88, 48161 Münster (Niemcy).

Pest and Disease Identification Team, Central Science Laboratory⁶, Sand Hutton, York YO41 1LZ (Wielka Brytania).

Plant Protection Service Servizio fitosanitario regionale Via di Saliceto, n. 81, 40128 Bologna (Włochy).

Plant Protection Service, P.O. Box 9102, 6700 HC Wageningen (Holandia).

Department of Plant Protection Biology - Nematology, Swedish University of Agricultural Sciences, Alnarp (Szwecja).

Raport z badania

Wytyczne dotyczące sprawozdań i dokumentacji został przedstawiony w standardzie EPPO PM7/77(1) „*Dokumentacja i raportowanie w diagnostyce*”.

Informacje dodatkowe

Dodatkowe informacje dotyczące opisanego organizmu można uzyskać z następujących źródeł: Julius Kühn Institute (JKI), Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Epidemiology and Pathogen Diagnostics, Toppheideweg 88, 48161 Münster (Niemcy); Plant Protection Service, P.O. Box 9102, 6700 HC Wageningen (Holandia); Istituto per la Protezione delle Piante, Sezione di Bari, C.N.R., Via G. Amendola, 165/A, 70126 Bari (Włochy); Pest and Disease Identification Team, Central Science Laboratory³, Sand Hutton, York YO41 1LZ (Wielka Brytania); Department of Plant Protection Biology - Nematology, Swedish University of Agricultural Sciences, Alnarp (Szwecja).

Podziękowania

Projekt niniejszego protokołu został pierwotnie sporządzony przez Pana D. Sturhana emerytowanego pracownika Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, obecnie Julius Kühn Institute (Niemcy). Część dotyczącą testów molekularnych przygotowali: Pan S. Subbotin, Plant Pest Diagnostic Center, California Department of Food and Agriculture, 3294 Meadowview road, Sacramento, CA 95832 (USA) i Pani G. Anthoine, LNPV-Unité de Nematologie, Domaine de la Motte au Viconte, BP 35327 Le Rheu (Francja).

⁵ W oryginalnym tekście było „ryc. 10”, co jest błędnym zapisem.

⁶ Obecnie The Food and Environmental Research Agency (FERA) (przyp. tłum.)

Materialy źródłowe

- Andersson S (1971) [The potato rot nematode, *Ditylenchus destructor* Thorne, as parasite in potatoes] Po szwedzku z angielskim streszczeniem. Dissertation. Agricultural College of Sweden, Uppsala (Szwecja).
- Brzeski MW (1991) Review of the genus *Ditylenchus* Filipjev, 1936 (Nematoda: Anguinidae). *Revue de Nematologie* **14**, 9-59.
- Brzeski MW (1998) Nematodes of Tylenchina in Poland and temperate Europe. Muzeum i Instytut Zoologii Polska Akademia Nauk, Warszawa (Polska).
- Decker H (1969) Phytonematologie. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin (Niemcy).
- Dunning RA (1957). Stem eelworm invasion of seedling sugar beet and development of crown canker. *Nematologica* **2**, Suppl. 362-8.
- Esquibet M, Bekal S, Castagnone-Sereno P, Gauthier JP, Rivoal R, Caubel G (1998). Differentiation of normal and giant *Vicia faba* populations of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*: agreement between RAPD and phenotypic characteristics. *Heredity*, **81**: 291–298.
- Esquibet M, Grenier E, Plantard O, Andaloussi A, Caubel G 2003. DNA polymorphism in the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*: Development of diagnostic markers for normal and giant races. *Genome* **46**, 1077-1083.
- Greco N, Brandonisio A, Boncoraglio P. (2002). Investigations on *Ditylenchus dipsaci* damaging carrot in Italy. *Fourth International Congress of Nematology*, 2002-06-8/13, Tenerife, Canary Islands, Spain. *Nematology* **4**, 210 (streszczenie).
- Kerkoud M, Esquibet M, Plantard O, Avrillon M, Guimier C, Franck M, Léchappé J., Mathis R (2007). Identification of *Ditylenchus* species associated with Fabaceae seeds based on a specific polymerase chain reaction of ribosomal DNA-ITS regions. *European Journal of Plant Pathology* **118**, 323–332.
- Marek M, Zouhar M, Rysanek P, Havranek P (2005). Analysis of ITS sequences of nuclear rDNA and development of a PCR-based assay for the rapid identification of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* (Nematoda: Anguinidae) in plant tissues. *Helminthologia* **42**, 49–56.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (USA).
- Sturhan D, Brzeski MW (1991) Stem and bulb nematodes, *Ditylenchus* spp. W: Manual of Agricultural Nematology (red. Nickle, W.R.), pp. 423-464, Marcel Dekker, Inc., New York (USA).
- Subbotin S A, Madani M, Krall E, Sturhan D, Moens M. (2005). Molecular diagnosis, taxonomy, and phylogeny of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* species complex based on the sequences of the internal transcribed spacer-rDNA. *Phytopathology* **95**, 1308–1315.

- Vrain TS, Wakarchuk DA, Levesque AC, Hamilton RI (1992) Interspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. *Fundamental and Applied Nematology* **16**, 563-573.
- Webster JM, Anderson RV, Bailie DL, Backenbuch K, Curran J, Rutherford T. (1990) DNA probes for differentiating isolates of the pinewood nematode species complex, *Revue de Nematologie* **13**, 9-59.
- Wendt KR, Vrain TC, Webster JM (1993). Separation of three species of *Ditylenchus* and some host races of *D. dipsaci* by restriction fragment length polymorphism. *Journal of Nematology* **25**, 555-563 .
- Zouhar M, Marek M, Douda O, Mazáková J, Ryšánek P (2007). Conversion of sequence-characterized amplified region (SCAR) bands into high-throughput DNA markers based on RAPD technique for detection of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* in crucial plant hosts. *Plant Soil and Environment* **53**: 97–104.

Dodatek 1. Test ITS-RFLP, który został opracowany przez Wendta i in. (1993)

Na początku należy zauważyć, że metoda ta jest stosunkowo stara i w związku z czym mogły ulec zmianie niezbędne odczynniki i sprzęt. Dlatego zaleca się przeprowadzenie walidacji protokołu w warunkach laboratorium wykonującego analizę,

1. Informacje ogólne

- 1.1 Ten test został opisany Wendta i in. (1993).
- 1.2 Osobniki młodociane drugiego stadium i osobniki dorosłe *D. dipsaci* (rasy związane z określonymi roślinami żywicielskimi i rasa olbrzymia), *D. destructor* i *D. myceliophagous* zostają wyekstrahowane z materiału roślinnego.
- 1.3 Regionem poddawany analizie jest region ITS (wliczając w to ITS1, ITS2 i gen 5.8S rDNA). Nie są to regiony specyficzne.
- 1.4 Oligonukleotydy: Uniwersalne startery specyficzne dla regionu ITS opisał Vrain i in. (1992): 18S (5'-TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT-3') i 26S (5'-GGA ATC ATT GCC GCT CAC TTT-3'). Przyczyniają się one do otrzymania amplikonu o wielkości około 900 par zasad (bp) dla *D. dipsaci* i *D. myceliophagus*, oraz 1200 bp dla *D. destructor*.
- 1.5 Odczynniki niezbędne do przeprowadzenia amplifikacji znajdują się w zestawie (kit) zawierającym polimerazę Taq DNA, nukleotydy i bufor reakcyjny (Perkin Elmer).
- 1.6 Amplifikacja jest przeprowadzona z zastosowaniem amplifikatora, np. Twin Block System EC Cycler (Ericomp).

2. Metody

- 2.1 Ekstrakcja i oczyszczanie kwasu nukleinowego.
 - 2.1.1. Nicienie, które przedostały się na wieczko szalki były spłukiwane przy użyciu 0,05 M NaCl i wydzielane z roztworu poprzez odwirowanie przy 2000 obrotach/min przez 2 min w temperaturze pokojowej. Roztwór NaCl został usunięty, a nicienie były ponownie wprowadzone w formę zawiesiny przy użyciu siedmiokrotnie większej objętości buforu proteiny K (0,1M Tris pH=8,0, 0,05 M EDTA, 0,2M NaCl i 1% SDS) zawierającym 1,0 mg ml⁻¹ proteiny K. Roztwór zawierający nicienie zamrożono w płynnym azocie, w formie zamrożonej umieszczono w moździerzu i utarto do postaci drobnoziarnistego proszku. Po rozmrożeniu roztwór został umieszczony w stożkowej probówce wirówkowej typu „Falcone” o objętości 50 ml i trzykrotnie poddano go ekstrakcji przy użyciu fenolu nasyconego buforem TE (10mM Tris pH=8,0 i 1,0 mM EDTA) o pH 8,0 i dwukrotnie mieszaniną chloroformu i alkoholu izoamylowego w stosunku 24:1. Czysty DNA został poddany strącaniu przy użyciu dwukrotnie większej objętości alkoholu etylowego 95%, a powstały osad został wysuszony i ponownie zawieszony w TE z dodatkiem RNase A w ilości 10µg ml⁻¹ (Webster i in., 1990).
 - 2.1.2. Przechowywać przez noc w temperaturze 4°C, lub przez dłuższy okres czasu w temperaturze -20°C
- 2.2. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR).
 - 2.2.1. Mieszanina master mix (znajdująca się w zestawie), 1,5 µl każdego ze starterów Vrain i 20 µg DNA.

2.2.2. Parametry reakcji PCR.

1 cykl w 94°C przez 1,5 min, 50°C przez 30 s, 72°C przez 4 min; 40 cykli w 96°C przez 45 s, 50°C przez 30 s, 72°C przez 4 min; 1 cykl w 96°C przez 45 s, 50°C przez 30 s i końcowa elongacja w 72°C przez 10 min.

2.3. Restrykcja amplikonu PCR.

2.3.1. Warunki procesu restrykcji

Zgodnie z zaleceniami dostawcy (Gibco Co., BRL).

3. Istotne informacje nt. procedury

- 3.1. Analiza fragmentów DNA: fragmenty DNA są rozdzielane elektroforetycznie na żelu agarozowym i wizualizowane w świetle UV, zgodnie ze standardowymi procedurami (patrz Sambrook i in., 1989).
- 3.2. Identyfikacja gatunku. Rozmiary fragmentów restrykcyjnych dla różnych gatunków przedstawiono w tab. 3.
- 3.3. W każdym teście powinna być stosowana kontrola negatywna (brak DNA gatunków będących przedmiotem analizy), w celu sprawdzenia, czy nie doszło do jakiegokolwiek kontaminacji oraz kontrola pozytywna (DNA ze szczepu odniesienia danego organizmu szkodliwego).
- 3.4. Niniejsza metoda może być użyta tylko w odniesieniu do nicieni zidentyfikowanych na podstawie budowy morfologicznej jako *Ditylenchus* sp., gdyż startery nie są specyficzne dla *Ditylenchus* spp.

Tabela 3. Rozmiary fragmentów restrykcyjnych dla *D. dipsaci* (rasy rozwijające się na określonych roślinach żywicielskich i rasa olbrzymia), *D. destructor* i *D. myceliophagus* uzyskane przy użyciu poszczególnych enzymów restrykcyjnych (-: brak danych) (wielkość fragmentów restrykcyjnych określona w parach zasad (bp)).

	<i>D. dipsaci</i> (rasy normalne*)	<i>D. dipsaci</i> (rasa olbrzymia)	<i>D. destructor</i>	<i>D. myceliophagus</i>
Produkt PCR nie poddany procesowi restrykcji	900	900	1200	900
<i>AccI</i>	900	-	1200	900
<i>AluI</i>	900	-	370, 290	900
<i>BamHI</i>	340,220,180	-	1000	900
<i>DdeI</i>	310, 290, 200	310, 290, 200	670, 570	300, 250, 130
<i>DraI</i>	340, 250	-	1200	900
<i>HaeIII</i>	900	800, 200	450, 170	450, 200
<i>HincII</i>	800	800	900, 250	900
<i>HinfI</i>	440, 350, 150	350, 150	780, 180	630, 310
<i>HpaII</i>	320, 200, 180	600, 200	1000	900
<i>NsiI</i>	900	-	1200	900
<i>PstI</i>	650, 400	650, 400	850, 400	620, 400
<i>RsaI</i>	450, 250, 140	490, 450	600, 250, 170	900
<i>Sau3A</i>	340, 260, 200, 110, 100	-	540, 400, 180	440, 100
<i>TaqI</i>	340, 230, 130	-	640, 200, 150	320, 260, 160

* Wendt i in. (1993) określa je jako „rasy rozwijające się na określonych roślinach żywicielskich”.

Dodatek 2. Specyficzny test SCAR-PCR opracowany przez Esquibet i in. (2003)

1. Informacje ogólne

- 1.1. Ten test został opisany przez Esquibet i in. (2003).
- 1.2. Osobniki *D. dipsaci* (rasy związane z określonymi roślinami żywicielskimi i rasa olbrzymia) i *D. myceliophagous* zostają wyekstrahowane z materiału roślinnego.
- 1.3. Regiony poddawane analizie są nieznane, gdyż startery stanowiły amplifikowane regiony scharakteryzowane przez sekwencję (SCAR).
- 1.4. Oligonukleotydy: dla *D. dipsaci* (rasy rozwijające się na określonych roślinach żywicielskich) H05 (5'-TCA AGG TAA TCT TTT TCC CCA CT -3') i H06 (5'-CAA CTG CTA ATG CGT GCT CT-3'); dla *D. dipsaci* (rasa olbrzymia) D09 (5'-CAA AGT GTT TGA TCG ACT GGA-3') i D10 (5'-CAT CCC AAA ACA AAG AAA GG-3'). Rozmiar ampikonu wynosi około 242 par zasad dla *D. dipsaci* (rasy związane z określonymi roślinami żywicielskimi) oraz 198 par zasad for *D. dipsaci* (rasa olbrzymia).
- 1.5. Polimeraza Taq DNA 5 U μl^{-1} (Promega) jest używana do amplifikacji.
- 1.6. Końcowe stężenie każdego z używanych nukleotydów wynosi 0,25 mM
- 1.7. Końcowe stężenie MgCl_2 wynosi 1,5mM.
- 1.8. Woda do testów molekularnych (molecular grade water - MGW) jest używana do sporządzania mieszanin reakcyjnych; powinna ona zostać oczyszczona (destylowana lub dejonizowana), sterylna (autoklawowana lub przefiltrowana przez filtr o średnicy oczek 0,45 μm) i wolna od nukleaz.

2. Metody

- 2.1 Ekstrakcja i oczyszczanie kwasu nukleinowego (Esquibet i in.,1998).
 - 2.1.1. DNA został wyekstrahowany z 2500-25000 zamrożonych, wymieszanych osobników młodocianych i dorosłych przy użyciu metody fenolowo-chloroformowej: nicienie zostały przemyte w mikrowirówce i rozdrobnione przy użyciu tłuczka. Całkowity, genomowy DNA został wyekstrahowany przy użyciu metody fenolowo-chloroformowej (Sambrook i in., 1989). Po strąceniu etanolem, DNA został ponownie zawieszony w buforze TE [0,01M Tris (pH 8,0), 0,001 M EDTA].
 - 2.1.2. Przechowywać przez noc w temperaturze 4°C, lub przez dłuższy okres czasu w temperaturze -20°C.
- 2.2. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR).
 - 2.2.1. Mieszanina (master mix) zawiera:
 - 1,5 mM MgCl_2
 - 250 μM każdego dNTP
 - 690 nM każdego startera w przypadku duplex PCR (H05-H06) lub (D09-D10) lub 500nM każdego startera w przypadku multiplex PCR (H05-H06-D09-D10)
 - 0,5 U polimerazy Taq DNA (Promega)⁷
 - 2.2.2 Parametry reakcji PCR.
 - 30 cykli w 94°C przez 1 min, 59°C przez 1 min, 72°C przez 1 min.

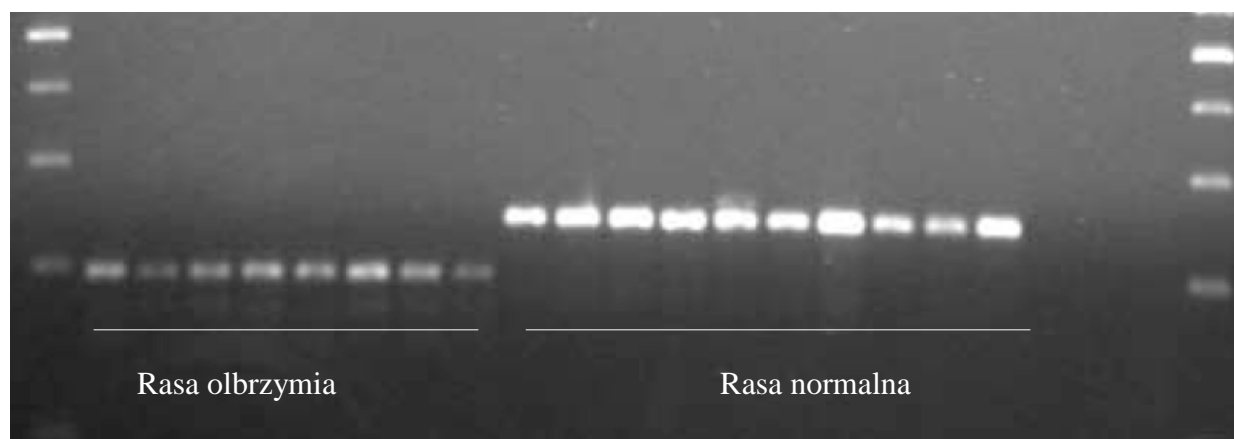
⁷ Oznaczenie „U” użyte w tekście oznacza „jednostkę” (ang. unit) (przyp. tłum).

3. Istotne informacje nt. procedury

- 3.1. Analiza fragmentów DNA: fragmenty DNA są rozdzielane elektroforetycznie na żelu agarozowym i wizualizowane w świetle UV, zgodnie ze standardowymi procedurami (patrz Sambrook i in., 1989).
- 3.2. Identyfikacja gatunków (tab. 4 i ryc. 14).
- 3.3. W każdym teście powinna być stosowana kontrola negatywna (brak DNA gatunków będących przedmiotem analizy), w celu sprawdzenia, czy nie doszło do jakiegokolwiek kontaminacji oraz kontrola pozytywna (DNA ze szczepu odniesienia danego organizmu szkodliwego).

Tabela 4. Rozmiary produktów reakcji SCAR-PCR dla *D. dipsaci*, *D. destructor* i *D. myceliophagus* (Esquibet i in., 2003)

	<i>D. dipsaci</i> (rasy rozwijające się na określonych roślinach żywicielskich)	<i>D. dipsaci</i> (rasa olbrzymia)	<i>D. myceliophagus</i>
H05-H06	242 bp	-	-
D09-D10	-	198 bp	-



Ryc. 14. Amplifikacja dwóch produktów (o wielkości 198 bp i 242 bp) podczas reakcji PCR z wykorzystaniem starterów SCAR - D09, D10, H05, i H06 dla 8 olbrzymich i 10 normalnych populacji *D. dipsaci* (wg Esquibet i in. 2003).

Dodatek 3. Specyficzny test PCR opracowany przez Subbotina i in. (2005)

1. Informacje ogólne

- 1.1 Ten test został opracowany przez Subbotina i in. (2005).
- 1.2 Osobniki młodociane i dorosłe *D. dipsaci* (*sensu stricto*), *D. destructor* i *Ditylenchus* sp. zostały wyekstrahowane z materiału roślinnego.
- 1.3 Regionem poddawanym analizie jest region 18 S i ITS1.
- 1.4 Oligonukleotydy: uniwersalne startery specyficzne dla ITS opisane przez Vrainia i in. (1992): rDNA2 (5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3') i specyficzny starter DitNF1 (5'-TTA TGA CAA ATT CAT GGC GG-3'). Rozmiar amplikonu wynosi około 263 bp dla *D. dipsaci sensu stricto* (nie uwzględniono rasy olbrzymiej).
- 1.5 Polimeraza Taq DNA 5 U μl^{-1} (zestaw „Core kit”, Qiagen) jest używana do amplifikacji.
- 1.6 Bufor znajdujący się w zestawie „Core kit” (Qiagen) jest dziesięciokrotnie stężony. Należy rozcieńczyć go w celu uzyskania jednokrotnego stężenia.
- 1.7. Woda do testów molekularnych (molecular grade water - MGW) jest używana do sporządzania mieszanin reakcyjnych; powinna ona zostać oczyszczona (destylowana lub dejonizowana), sterylna (autoklawowana lub przefiltrowana przez filtr o średnicy oczek 0,45 μm) i wolna od nukleaz.

2. Metody

- 2.1 Ekstrakcja i oczyszczanie kwasu nukleinowego.
 - 2.1.1. W przypadku każdej próbki, kilka tuzinów osobników młodocianych lub kilka sztuk osobników dorosłych przeniesiono do 8 μl podwójnie destylowanej wody i 7 μl buforu do lizy nicieni znajdujących się w probówce Eppendorfa i zgniatano za pomocą szklanego pręcika⁸ przy użyciu mikrohomogenizatora Vibro Mixer (Zürich, Szwajcaria). Dodano trzy mikrolitry proteiny K (600 $\mu\text{g ml}^{-1}$) (Promega Benelux, Leiden, Holandia). Probówki inkubowano odpowiednio w 65°C (1h) i 95°C (10 min). Po odwirowaniu (1min; 16000g), 3 μl uzyskanej zawiesiny DNA dodano do mieszaniny master mix.
- 2.2. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR).
 - 2.2.1. Mieszanina master mix zawiera:
 - 10,8 μl MGW
 - 2,5 μl 10X buforu PCR (Qiagen).
 - 5 μl roztworu Q (Qiagen)
 - 0,5 μl mieszaniny dNTP (brak wytycznych na temat stężenia początkowego i końcowego)
 - 1,5 μl każdego startera (1.0 μM).
 - 0,2 μl polimerazy Taq DNA 5 U μl^{-1} (Promega)
 - 3 μl zawiesiny DNA
 - 2.2.2 Parametry reakcji PCR.
 - 94°C przez 4 min, 35 cykli w 94°C przez 15 s, 57°C przez 30 s, 72°C przez 30 s i końcowa elongacja w 72°C przez 10 min.

⁸ Pipeta pasterowska z końcem zasklepionym przez podgrzewanie przy użyciu palnika gazowego.

3. Istotne informacje nt. procedury

- 3.1. Analiza fragmentów DNA: fragmenty DNA są rozdzielane elektroforetycznie na żelu agarozowym i wizualizowane w świetle UV, zgodnie ze standardowymi procedurami (patrz Sambrook i in., 1989).
- 3.2. Identyfikacja gatunków (tab. 5).
- 3.3. W każdym teście powinna być stosowana kontrola negatywna (brak DNA gatunków będących przedmiotem analizy), w celu sprawdzenia, czy nie doszło do jakiegokolwiek kontaminacji oraz kontrola pozytywna (DNA ze szczepu odniesienia danego organizmu szkodliwego).

Tabela 5. Rozmiary produktów reakcji PCR dla *D. dipsaci*, *D. desructor* i *D. myceliophagus* (Subbotin i in., 2005)

	<i>D. dipsaci</i> (<i>sensu stricto</i>)	<i>D. dipsaci</i> (<i>rasa olbrzymia</i>)	<i>D. myceliophagus</i>	<i>Ditylenchus sp.</i>
DitNF1 – 18S	242 bp	-	-	-

Dodatek 4. Specyficzny test PCR, który został opracowany przez Marek'a i in. (2005)

1. Informacje ogólne

- 1.4 Ten test został opracowany przez Marek'a i in. (2005).
- 1.5 DNA jest izolowany zarówno z wyizolowanych osobników nicieni, jak i z porażonego materiału roślinnego.
- 1.6 Regionem poddawanym analizie jest gen 5.8S rDNA i region boczny ITS; w czasie analiz wykorzystuje się startery specyficzne dla *D. dipsaci*.
- 1.4 Oligonukleotydy: do identyfikacji osobników *Ditylenchus dipsaci* do gatunku dostępne są dwa różne zestawy starterów. Pierwszy zestaw składa się ze startera PF1 (5'-AAC GGC TCT GTT GGC TTC TAT-3') i startera PR1 (5'-ATT TAC GAC CCT GAG CCA GAT-3'). Wielkość amplikonu dla *D. dipsaci* w przypadku użycia tego zestawu starterów wynosi około 327 bp.
- Drugi zestaw składa się ze startera PF2 (5'-TCG CGA GAA TCA ATG AGT ACC-3') i startera PR2 (5'-AAT AGC CAG TCG ATT CCG TCT-3'). Wielkość amplikonu dla *D. dipsaci* w przypadku użycia tego zestawu starterów wynosi około 327 bp.
- 1.5 Polimeraza Taq DNA 5 U μl^{-1} (Fermentas) jest używana do amplifikacji.
- 1.6 Woda do testów molekularnych (molecular grade water - MGW) jest używana do sporządzania mieszanin reakcyjnych; powinna ona zostać oczyszczona (destylowana lub dejonizowana), sterylna (autoklawowana lub przefiltrowana przez filtr o średnicy oczek 0,45 μm) i wolna od nukleaz.

2. Metody

- 2.1 Ekstrakcja i oczyszczanie kwasu nukleinowego.
- 2.1.1. Około 10 osobników nicieni lub 0,5 – 1 ng tkanki roślinnej sztucznie inokulowanej przez 10 osobników rozgniatano w płynnym azocie znajdującym się w moździerzu przy użyciu tłuczka i homogenizowano w 300 μl buforu do lizy (100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM EDTA, 200mM NaCl, 0,2% SDS i 0,4 mg ml^{-1} proteinazy K). Uzyskana mieszanina była inkubowana przez 1h w temperaturze 37°C (w czasie inkubacji mieszaninę poddawano wstrząsaniu), a następnie poddana denaturacji przez 5 min w temperaturze 85°C. Homogenat został następnie zmieszany w stosunku 1:1 z mieszaniną fenolu (pH 8,0), chloroformu i alkoholu izoamylowego (zmieszanych w stosunku 25:24:1), wymieszany przez 15 min i odwirowany przy 7000g. Każdy lizat (faza wodna) został umieszczony w nowej próbówce, do której dodano taką samą (równą) ilość chloroformu i ekstrakcja została powtórzona. Dokonano strącenia DNA przy użyciu równej ilości izopropanolu w temperaturze -20°C przez noc lub w płynnym azocie przez 20 min i odwirowano przy 10000g przez 10 min. Supernatant został usunięty, a pozostały osad został poddany suszeniu w próżni. Osad uzyskany dla każdej próbki został wprowadzony w formę zawiesiny w 50 μl buforu TE (10mM Tris, 1mM EDTA (pH 8,0) lub ddH₂O). DNA przechowywano w temperaturze -20°C.
- 2.2. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR).
- 2.2.1. Mieszanina master mix o całkowitej objętości 25 μl zawiera:
- 1,5 mM MgCl₂
 - 200 μM każdego dNTP
 - 10 pmol każdego startera
 - 1,5 U polimerazy Taq DNA 5U 50 μl^{-1} (Fermentas)
 - woda do testów molekularnych – dopełnić do 25 μl

2.2.2 Parametry reakcji PCR.

94°C przez 3 min, 30 cykli w 94°C przez 2 min, 62°C przez 30 s (PF1-PR1) lub 63°C przez 30 s (PF2-PR2), 72°C przez 2 min.

3. Istotne informacje nt. procedury

- 3.1. Analiza fragmentów DNA: fragmenty DNA są rozdzielane elektroforetycznie na żelu agarozowym (1,2% agarosa) i wizualizowane w świetle UV, zgodnie ze standardowymi procedurami (patrz Sambrook i in., 1989).
- 3.2. Identyfikacja gatunków (tab. 6).
- 3.3. W każdym teście powinna być stosowana kontrola negatywna (brak DNA gatunków będących przedmiotem analizy), w celu sprawdzenia, czy nie doszło do jakiegokolwiek kontaminacji oraz kontrola pozytywna (DNA ze szczepu odniesienia danego organizmu szkodliwego).

Tabela 6. Rozmiary produktów reakcji PCR dla *D. dipsaci*, *D. desructor* i *D. myceliophagus* (Marek i in., 2005)

	<i>D. dipsaci</i>	<i>Inne badane gatunki</i>
PF1– PR1	327 bp	Brak amplifikacji
PF2– PR2	396 bp	Brak amplifikacji

Dodatek 5. Specyficzny test PCR, który został opracowany opracował przez Kerkouda i in. (2007)

1. Informacje ogólne

- 1.1. Ten test został opracowany przez Kerkouda i in. (2005).
- 1.2. Osobniki *D. dipsaci*, *D. destructor*, *D. myceliophagous*, *D. africanus* i *Ditylenchus* sp. zostały wyekstrahowane z materiału roślinnego.
- 1.3. Regionem poddawanym analizie w identyfikacji *D. dipsaci*, do którego amplifikacji wykorzystywane są specyficzne startery, jest gen 5.8S rDNA oraz otaczający go region ITS.
- 1.4. Oligonukleotydy: dostępne są dwa różne zestawy starterów: jeden do identyfikacji *Ditylenchus dipsaci*, a drugi do identyfikacji *Ditylenchus* sp.
Pierwszy zestaw składa się ze starterów DdpS1 (5'-TGG CTG CGT TGA AGA GAA CT-3') rDNA2 (5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3') (Vrain i in., 1992). Wielkość amplikonu dla *D. dipsaci* w przypadku użycia tego zestawu starterów wynosi około 517 bp.
Drugi zestaw składa się ze starterów DdpS2 (5'- CGA TCA ACC AAA ACA CTA GGA ATT -3') i rDNA2 (5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG -3') (Vrain i in., 1992). Wielkość amplikonu dla *Ditylenchus* sp. w przypadku użycia tego zestawu starterów wynosi około 707 bp.
- 1.5. Polimeraza Taq DNA 5 U μl^{-1} (MP Biomedicals) jest używana do amplifikacji.
- 1.6. Woda do testów molekularnych (molecular grade water - MGW) jest używana do sporządzania mieszanin reakcyjnych; powinna ona zostać oczyszczona (destylowana lub dejonizowana), sterylna (autoklawowana lub przefiltrowana przez filtr o średnicy oczek 0,45 μm) i wolna od nukleaz.

2. Metody

- 2.1 Ekstrakcja i oczyszczanie kwasu nukleinowego.
 - 2.1.1. Genomowy DNA został wyekstrahowany przy użyciu metody fenolowo-chloroformowej (Sambrook i in., 1989). Po strąceniu etanolem DNA wprowadzono w formę zawiesiny w buforze TE buffer [(0,01 M Tris (pH 8,0), 0,001 M EDTA)] i przechowywano w temperaturze -20°C

Opracowano szybką metodę wyizolowania DNA z pojedynczych osobników nicieni. Pojedynczy osobnik nicienia został odłowiony ręcznie, przeniesiony na szkiełko mikroskopowe podstawowe umieszczone pod mikroskopem stereoskopowym, a po wyschnięciu rozgnieciony poprzez delikatne przyciśnięcie wierzchołkiem mikropipety. W celu pozyskania materiału z rozgniecionego nicienia, delikatnie dodano do niego 13,7 μl sterylnej wody destylowanej i przeniesiono do probówki Eppendorfa o objętości 0,2 ml. Probówka ta została niezwłocznie umieszczona w lodzie. Zawiesina zawierająca rozgniecionego nicienia była przechowywana w temperaturze -20°C i użyta do dalszych badań.
- 2.2. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR).
 - 2.2.1. Mieszanina master mix (całkowita objętość 20 μl) zawiera:
 - 1,5 mM buforu do amplifikacji, w którym końcowe stężenie $\text{MgCl}_2 = 5\text{mM}$
 - 200 μM każdego dNTP
 - 0,5 μM każdego startera
 - 1U polimerazy Taq DNA 5 U μl^{-1} (MP Biomedicals)

2.2.2 Parametry reakcji PCR.

94°C przez 1 min, 40 cykli w 94°C przez 30 s, 60°C przez 30 s, 72°C przez 45 s i końcowa elongacja w 72°C przez 2 min.

3. Istotne informacje nt. procedury

- 3.1. Analiza fragmentów DNA: fragmenty DNA są rozdzielane elektroforetycznie na żelu agarozowym i wizualizowane w świetle UV, zgodnie ze standardowymi procedurami (patrz Sambrook i in., 1989).
- 3.2. Identyfikacja gatunków (tab. 7).
- 3.3. W każdym teście powinna być stosowana kontrola negatywna (brak DNA gatunków będących przedmiotem analizy), w celu sprawdzenia, czy nie doszło do jakiegokolwiek kontaminacji oraz kontrola pozytywna (DNA ze szczepu odniesienia danego organizmu szkodliwego).

Tabela 7. Rozmiary produktów reakcji PCR dla *D. dipsaci*, *D. destructor*, *D. africanus*, *D. myceliophagus* i *Ditylenchus sp.* (Kerkoud i in., 2007)

	<i>D. dipsaci</i>	<i>D. destructor</i>	<i>D. africanus</i>	<i>D. myceliophagus</i>	<i>Ditylenchus. sp.</i>
DdpS1-Rdna2	517 bp	-	-	-	-
DdpS2-Rdna2	707 bp	707 bp	707 bp	707 bp	707 bp

Tłumaczenie z jęz. angielskiego:	Sprawdził:	Zatwierdził:
Witold Karnkowski (GIORiN CL)	Tomasz Konefał (GIORiN CL)	Janina Butrymowicz (GIORiN CL)
7.11.2011	3.11.2011	