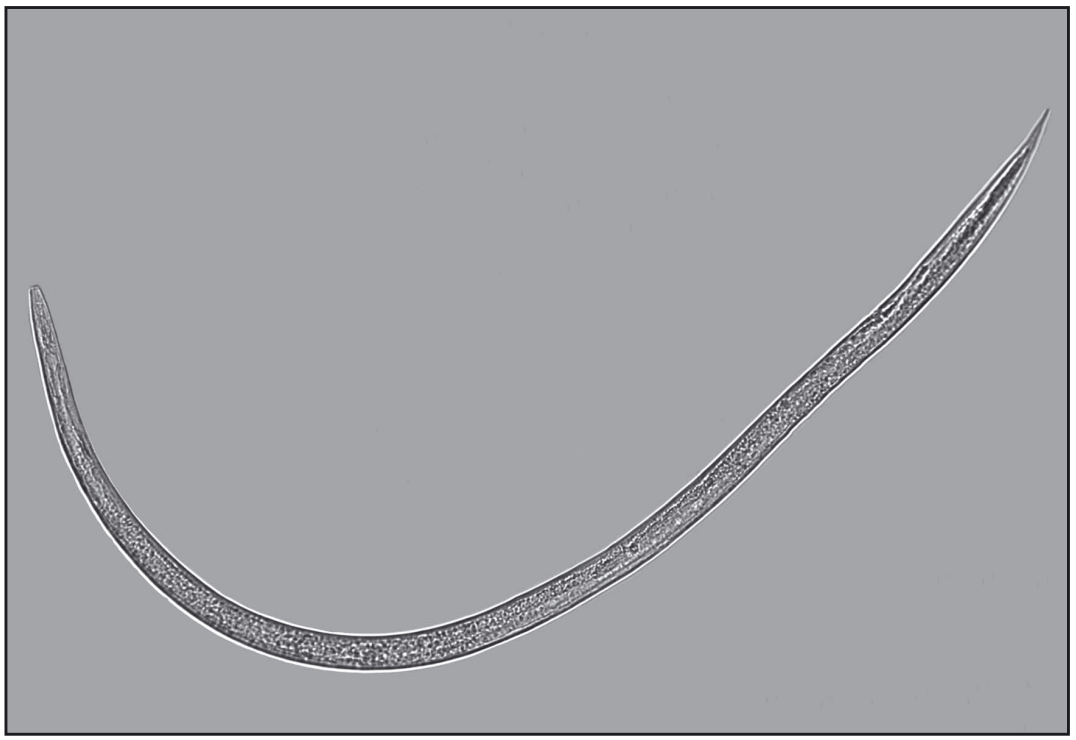
INSTYTUT OCHRONY ROŚLIN
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY

Diagnostyka Nicieni

pasożytów roślin objętych regulacjami prawnymi



Instrukcja rozpoznawania gatunków nicieni z rodzaju *Ditylenchus*

POZNAŃ 2015

INSTYTUT OCHRONY ROŚLIN
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY

Dyrektor – prof. dr hab. Danuta SOSNOWSKA

ZAKŁAD TRANSFERU WIEDZY I INNOWACJI

Kierownik – dr Paweł OLEJARSKI

ul. Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań
tel: 61 864 90 27, fax: 61 867 63 01
e-mail: upowszechnianie@iorpib.poznan.pl

Recenzent:

prof. dr hab. Gabriel Łabanowski
dr Aneta Chałańska

Autorzy opracowania:

dr Renata Dobosz
mgr inż. Arnika Przybylska
dr hab. Aleksandra Obrępalska-Stęplowska, prof. nadzw. IOR – PIB

Autorzy fotografii:

dr Renata Dobosz
mgr Magdalena Gawlak

Program Wieloletni 2011–2015
2.3. Określanie zakresu zmienności morfologicznej i molekularnej nicieni-pasożytów roślin w celu identyfikacji gatunków objętych regulacjami prawnymi

ISBN 978-83-64655-07-4

© Copyright by Instytyt Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy

Wydanie II – poprawione i rozszerzone

Nakład: 150 egz.
Opracowanie graficzne oraz projekt okładki: mgr inż. Dominik Krawczyk
Druk: TOTEM, Jacewska 89, 88-100 Inowrocław, tel. 52 354 00 40,
http://www.totem.com.pl

SPIS TREŚCI

1. IDENTYFIKACJA WYBRANYCH GATUNKÓW NICIENI Z RODZAJU *DITYLENCHUS* FILIPJEV, 1936 NA PODSTAWIE CECH MORFOLOGICZNYCH I MORFOMETRYCZNYCH 5

1.1. Klucz do identyfikacji gatunków *Ditylenchus* 6

1.2. Charakterystyka gatunków *Ditylenchus* uwzględnionych w kluczu..... 7

2. OZNACZANIE PRZYNALEŻNOŚCI GATUNKOWEJ NICIENI Z WYKORZYSTANIEM METOD BIOLOGII MOLEKULARNEJ 16

2.1. Izolacja DNA 16

2.2. Reakcje PCR umożliwiające rozróżnienie gatunków *D. dipsaci*, *D. gigas* i *D. destructor* 17

2.3. Reakcje real-time PCR umożliwiające rozróżnienie gatunków *D. dipsaci*, *D. gigas* i *D. destructor*..... 20

3. LITERATURA 24

1. IDENTYFIKACJA WYBRANYCH GATUNKÓW NICIENI Z RODZAJU *DITYLENCHUS* FILIPJEV, 1936 NA PODSTAWIE CECH MORFOLOGICZNYCH I MORFOMETRYCZNYCH

Spośród około 80 znanych dotąd gatunków z rodzaju *Ditylenchus* Filipjev, 1936, dwadzieścia siedem znaleziono w środowisku naturalnym na obszarze Polski (Brzeski, 1998).

Są to:

Ditylenchus acutatus Brzeski, 1991.
Ditylenchus acutus (Khan, 1965) Fortuner et Maggenti, 1987,
Ditylenchus adasi (Sykes, 1980) Fortuner et Maggenti, 1987,
Ditylenchus anchilisposomus (Tarjan, 1958) Fortuner, 1982,
Ditylenchus apus Brzeski, 1991,
Ditylenchus clarus Thorne et Malek, 1968,
Ditylenchus convallariae Sturhan et Friedman, 1965,
Ditylenchus destructor Thorne, 1945,
Ditylenchus dipsaci (Kühn, 1857) Filipjev, 1936,
Ditylenchus emus Khan, Chawla et Prasad, 1969,
Ditylenchus equalis Heyns, 1964,
Ditylenchus exilis Brzeski, 1984,
Ditylenchus ferepolitor (Kazachenko, 1980) Fortuner et Maggenti, 1987,
Ditylenchus filenchulus Brzeski, 1991,
Ditylenchus filimus Anderson, 1983,
Ditylenchus khani Fortuner, 1982,
Ditylenchus kheirii Fortuner et Maggenti, 1987;
Ditylenchus longicauda Choi et Geraert, 1988,
Ditylenchus longimatricalis (Kazachenko, 1975) Brzeski, 1984,
Ditylenchus medians (Thorne et Malek, 1968) Fortuner et Maggenti, 1987,
Ditylenchus medicaginis Wasilewska, 1965,
Ditylenchus myceliophagus Goodey, 1958,
Ditylenchus parvus Zell, 1988,
Ditylenchus silvaticus Brzeski, 1991,
Ditylenchus terricolus Brzeski, 1991,
Ditylenchus tenuidens Gritzenko, 1971,
Ditylenchus valveus Thorne et Malek, 1968.

Przeważająca liczba gatunków *Ditylenchus* to mikofagi oraz takie, których sposób odżywiania nie został jeszcze zbadany. Tylko nieliczne gatunki nicieni żerują w tkankach roślin wyższych, prowadząc niejednokrotnie do zniszczenia upraw.

W szczegółowym opracowaniu morfologii i morfometrii gatunków z tego rodzaju uwzględniono: *Ditylenchus destructor*, *Ditylenchus dipsaci*, *Ditylenchus gigas* (Volvas i in., 2011) oraz, po dokonaniu analizy cech budowy i wskaźników morfometrycznych wykorzystywanych do rozpoznawania gatunków z rodzaju *Ditylenchus,* uwzględniono gatunki, u których zakres zmienności długości sztyletu samicy obejmuje długość 10 μm.

1.1. Klucz do identyfikacji gatunków *Ditylenchus*

1. Pole boczne z 4 liniami **2**
–. Pole boczne z 6 liniami **5**

2. Średnia długość ciała samicy < 0,8 mm **3**
–. Średnia długość ciała samicy ≥ 1 mm **4**

3. Średnia długość ogona samicy w zakresie 82–136 [99] µm, średnia długość woreczka zapochwowego stanowi 16–34 [24] % odległości od wulwy do otworu odbytowego ..... ***D. adasi*** (Fot. 2)
–. Średnia długość ogona samicy w zakresie 56–98 [79] µm, średnia długość woreczka zapochwowego stanowi 25–51 [36] % odległości od wulwy do otworu odbytowego ..... ***D. acutus*** (Fot. 1)

4. Długość ciała samicy 1,0–1,7 mm, odległość od wulwy do odbytu 132–188 µm ..... ***D. dipsaci*** (Fot. 7)
–. Długość ciała samicy 1,5–2,2 mm, odległość od wulwy do odbytu 202–266 µm ..... ***D. gigas*** (Fot. 8)

5. Tylne rozszerzenie gardzieli obejmuje jelito **6**
–. Tylne rozszerzenie gardzieli nie obejmuje jelita **7**

6. Długość woreczka zapochwowego stanowi 40–90% odległości od wulwy do odbytu, długość sztyletu 10–14 µm ..... ***D. destructor*** (Fot. 6)
–. Długość woreczka zapochwowego < 40% odległości od wulwy do odbytu, długość sztyletu 7–10 µm ..... ***D. anchilisposomus*** (Fot. 3)

7. Średnia wartość **a** w populacji < 35 ..... ***D. clarus*** (Fot. 4)
–. Średnia wartość **a** w populacji > 47 ..... **8**

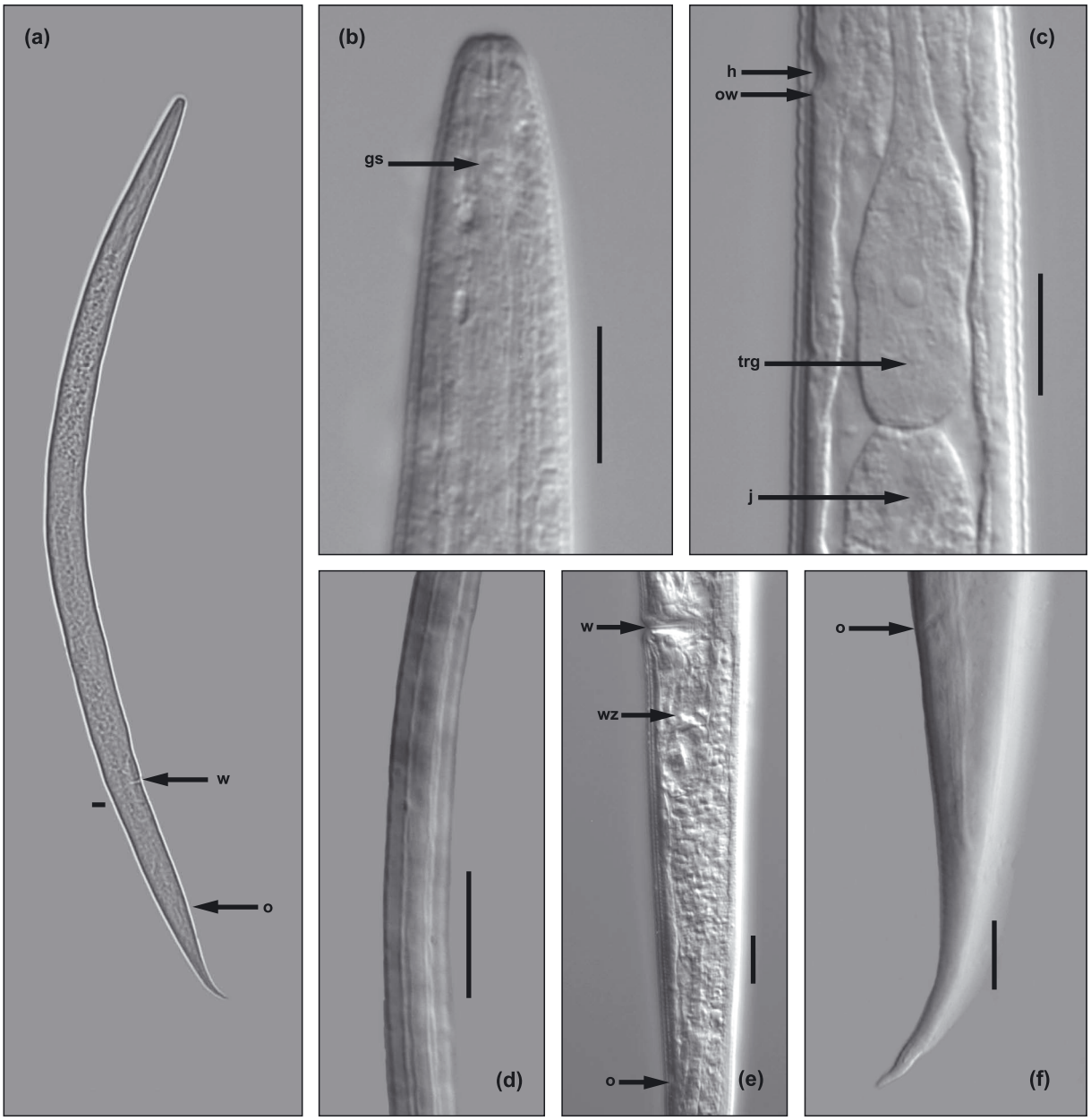
8. Średnia wartość **c'** w populacji > 8, zakończenie ogona samicy zaokrąglone ..... ***D. longicauda*** (Fot. 9)
–. Średnia wartość **c'** w populacji < 6, ogon samicy ostro zakończony ..... ***D. convallariae*** (Fot. 5)

Słownik terminów:
a – Iloraz długości ciała do jego maksymalnej szerokości.
c' – Iloraz długości ogona do szerokości ciała na wysokości odbytu.
V – Odległość od głowy do wulwy wyrażona jako procent długości ciała.

1.2. Charakterystyka gatunków *Ditylenchus* uwzględnionych w kluczu*

Ditylenchus acutus (Fot. 1a–1f)

Ciało samicy wyprostowane lub lekko wygięte w stronę brzuszną, długości 0,85–0,98 [0,91]** mm. Sztylet długości 7,5–10 µm z guzkami niejednorodnego kształtu. Gruczołowa część gardzieli wydłużona, oddzielona od jelita. Pole boczne z czterema liniami. V = 70–79 [74]%. Długość woreczka zapochwowego stanowi 25–51 [36]% odległości od wulwy do otworu odbytowego. Ogon stożkowaty, długości 56–98 [79] µm. Zakończenie ogona zaostrzone lub lekko zaokrąglone. c' = 4,1–5,7 [4,9]. Samce występują. Sposób odżywiania się nie znany.



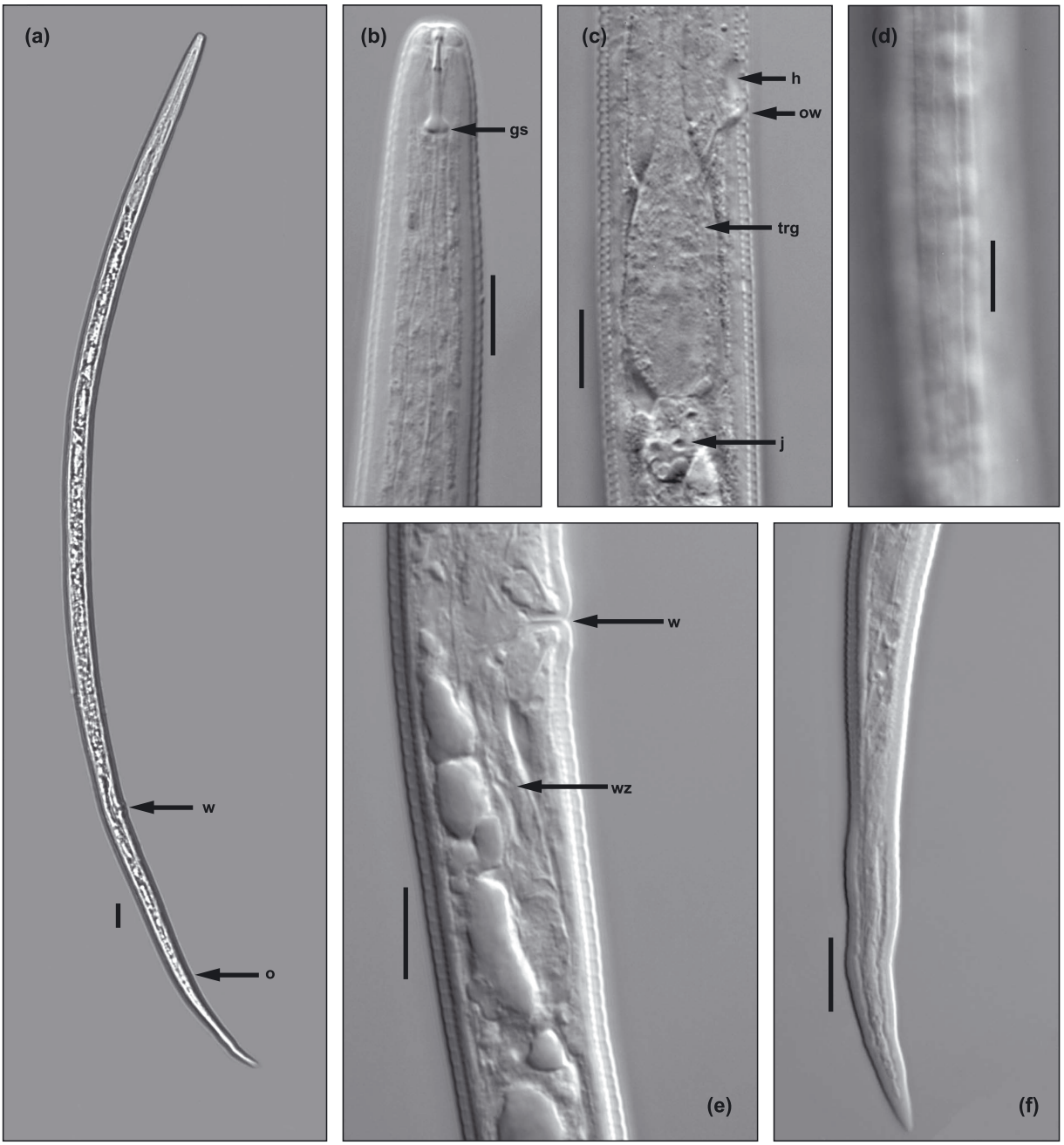
Fot. 1. *Ditylenchus acutus*. Samica: pokrój ciała (a), głowa (b), gardziel (c), pole boczne (d), tylna część ciała (e), ogon (f). Skala: Fot. 1a = 20 µm; Fot. 1b–1f =10 µm. (gs – guzki sztyletu, h – hemizonid, j – jelito, o – odbyt, ow – otwór wydalniczy, trg – tylne rozszerzenie gardzieli, w – wulwa, wz – woreczek zapochwowy).

* Opracowanie na podstawie Brzeski, 1998.

** W nawiasie kwadratowym zamieszczono wartości średnie.

Ditylenchus adasi (Fot. 2a–2f)

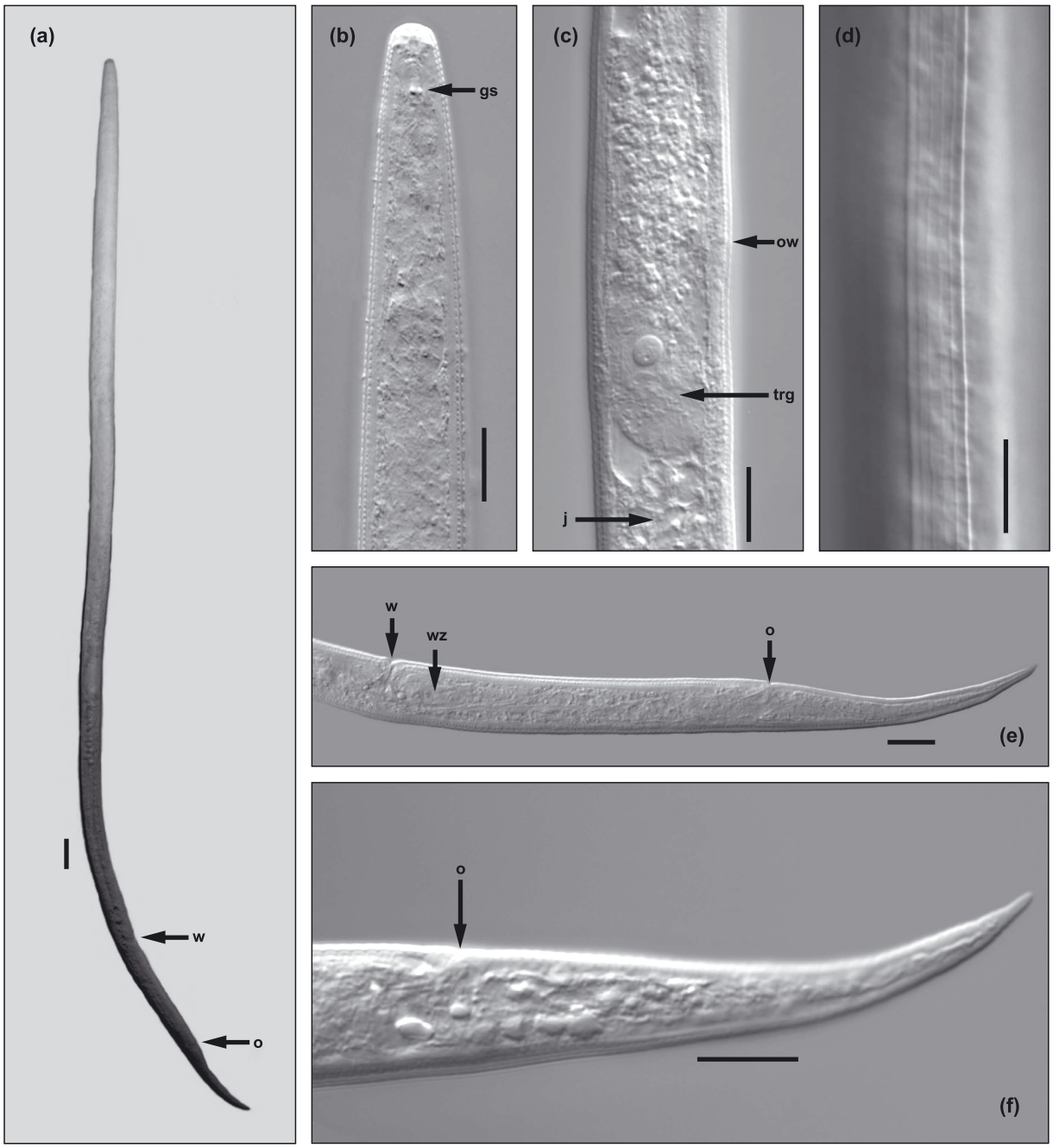
Ciało samicy długości 0,72–0,97 [0,86] mm, lekko wygięte w stronę brzuszną lub wyprostowane. Sztylet 10,5–13 [11,8] µm, dobrze wykształcony (robust), z lekko zaokrąglonymi i wyciągniętymi ku tyłowi guzkami. Tylne rozszerzenie gardzieli oddzielone od jelita. Pole boczne z czterema liniami. V = 68–76 [73]%. Długość woreczka zapochwowego 16–34 [24] % odległości od wulwy do otworu odbytowego. Ogon wydłużony, delikatnie zwężający ku końcowi, z zaokrąglonym końcem, długości 82–136 [99] µm. c' = 5,1–7,5 [6,7]. Samce występują. Sposób odżywiania się nie znany.



Fot. 2. *Ditylenchus adasi.* Samica: pokrój ciała (a), głowa (b), gardziel (c), pole boczne (d), tylna część ciała (e), ogon (f). Skala: Fot. 1a = 20 µm; Fot. 1b–1f =10 µm. (gs – guzki sztyletu, h – hemizonid, j – jelito, ow – otwór wydalniczy, trg – tylne rozszerzenie gardzieli, w – wulwa, wz – woreczek zapochwowy).

Ditylenchus anchilisposomus (Fot. 3a–3f)***

Długość ciała samicy 0,44–0,73 mm. Sztylet delikatny długości 7–10 µm. Tylne rozszerzenie gardzieli obejmuje jelito lub jest od niego oddzielone. Pole boczne z sześcioma liniami. V = 78–84%. Długość woreczka zapochwowego nie przekracza 40% odległości między wulwą i odbytem. Ogon delikatnie zwężający ku końcowi długości 32–54 µm, zakończenie zaokrąglone. c' = 2,7–5,1. Samce występują. Sposób odżywiania się nie znany.

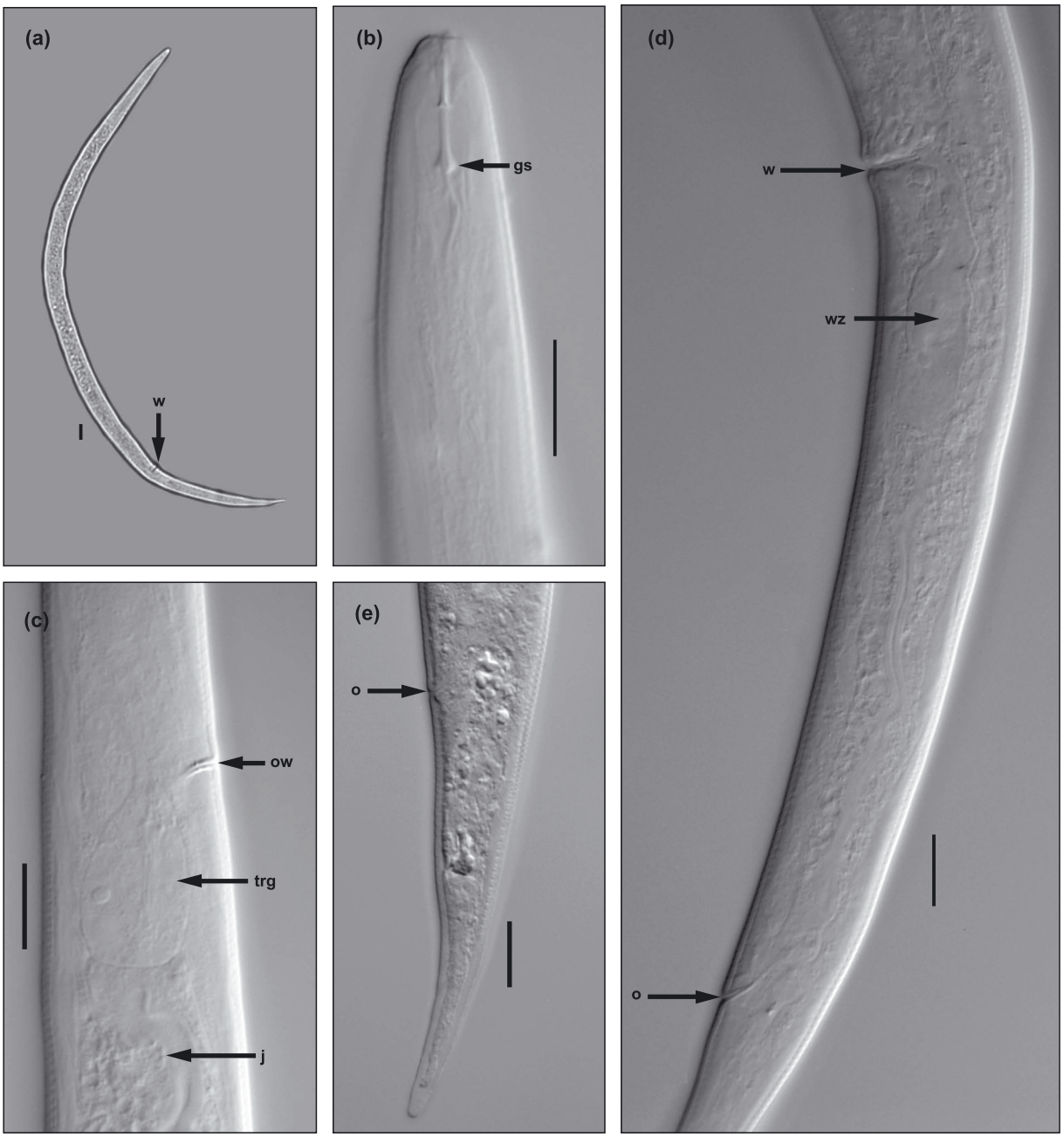


Fot. 3. *Ditylenchus anchilisposomus.* Samica: pokrój ciała (a), głowa (b), gardziel (c), pole boczne (d), tylna część ciała (e), ogon (f). Skala: Fot. 3a = 20 µm; Fot. 1b–1f =10 µm. (gs – guzki sztyletu, h – hemizonid, j – jelito, o – odbyt, ow – otwór wydalniczy, trg – tylne rozszerzenie gardzieli, w – wulwa, wz – woreczek zapochwowy).

*** Opracowanie na podstawie Brzeski, 1998; Dobies, 2004.

Ditylenchus clarus (Fot. 4a–4e)

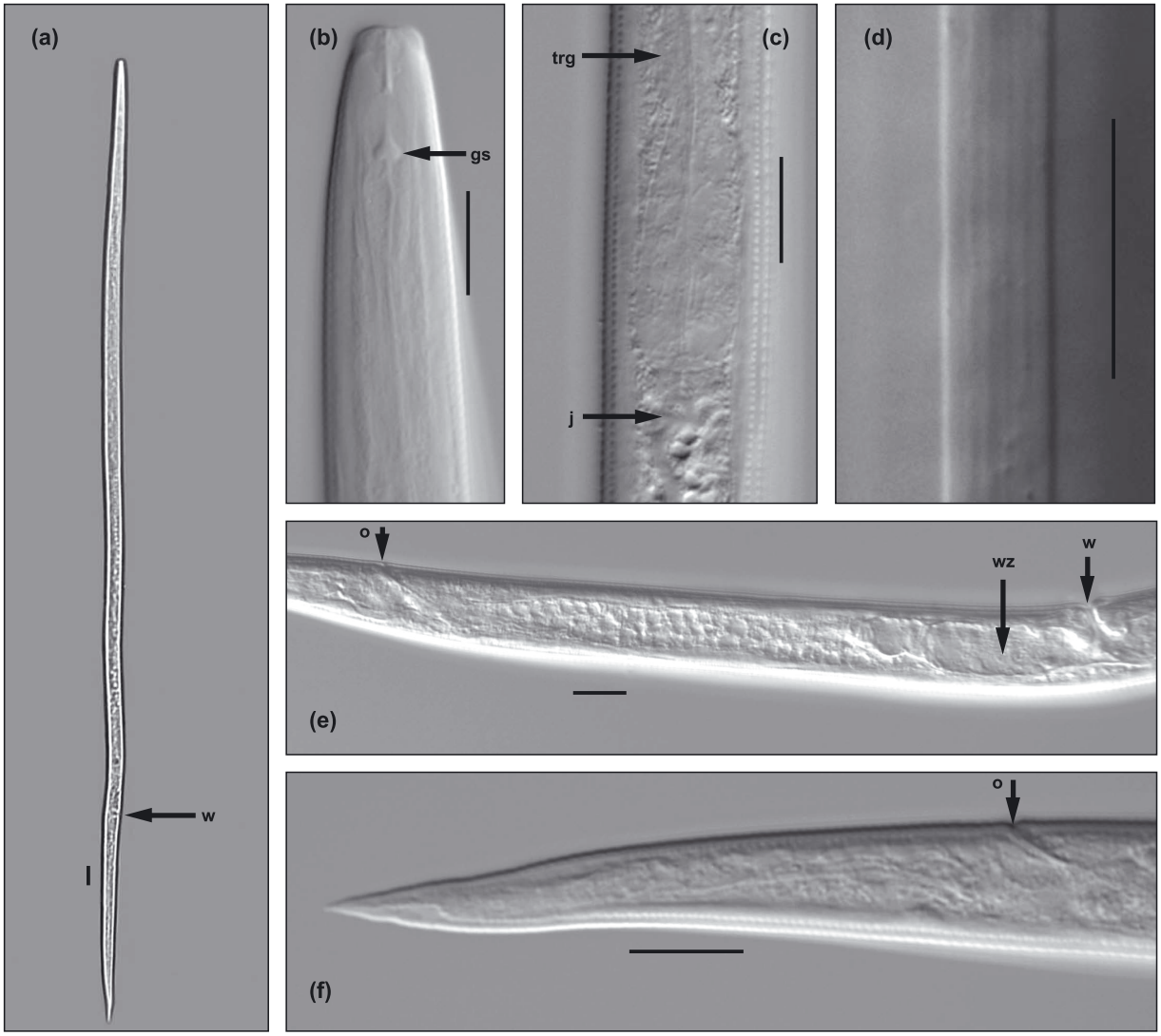
Ciało samicy długości 0,7–1,04 mm, po utrwaleniu w kształcie litery C. Sztylet dobrze wykształcony, z guzkami okrągłymi lekko wyciągniętymi ku bokom ciała, długości 9–10 µm. Tylne rozszerzenie gardzieli oddzielone od jelita. Pole boczne z sześcioma liniami. V = 78–83%. Woreczek zapochwowy stanowi 32–46% odległości pomiędzy wulwą i otworem odbytowym. Ogon z zaokrąglonym końcem, długości 58–78 µm. c' = 3,9–4,8. Samce występują. Gatunek rzadko znajdowany. Sposób odżywiania się nie znany.



Fot. 4. *Ditylenchus clarus.* Samica: pokrój ciała (a), głowa (b), gardziel (c), tylna część ciała (d), ogon (e). Skala: Fot. 1a. = 20 µm; Fot. 1b–1e =10 µm. (gs – guzki sztyletu, h – hemizonid, j- jelito, o – odbyt, ow – otwór wydalniczy, trg – tylne rozszerzenie gardzieli, w – wulwa, wz – woreczek zapochwowy).

Ditylenchus convallariae (Fot. 5a–5f)

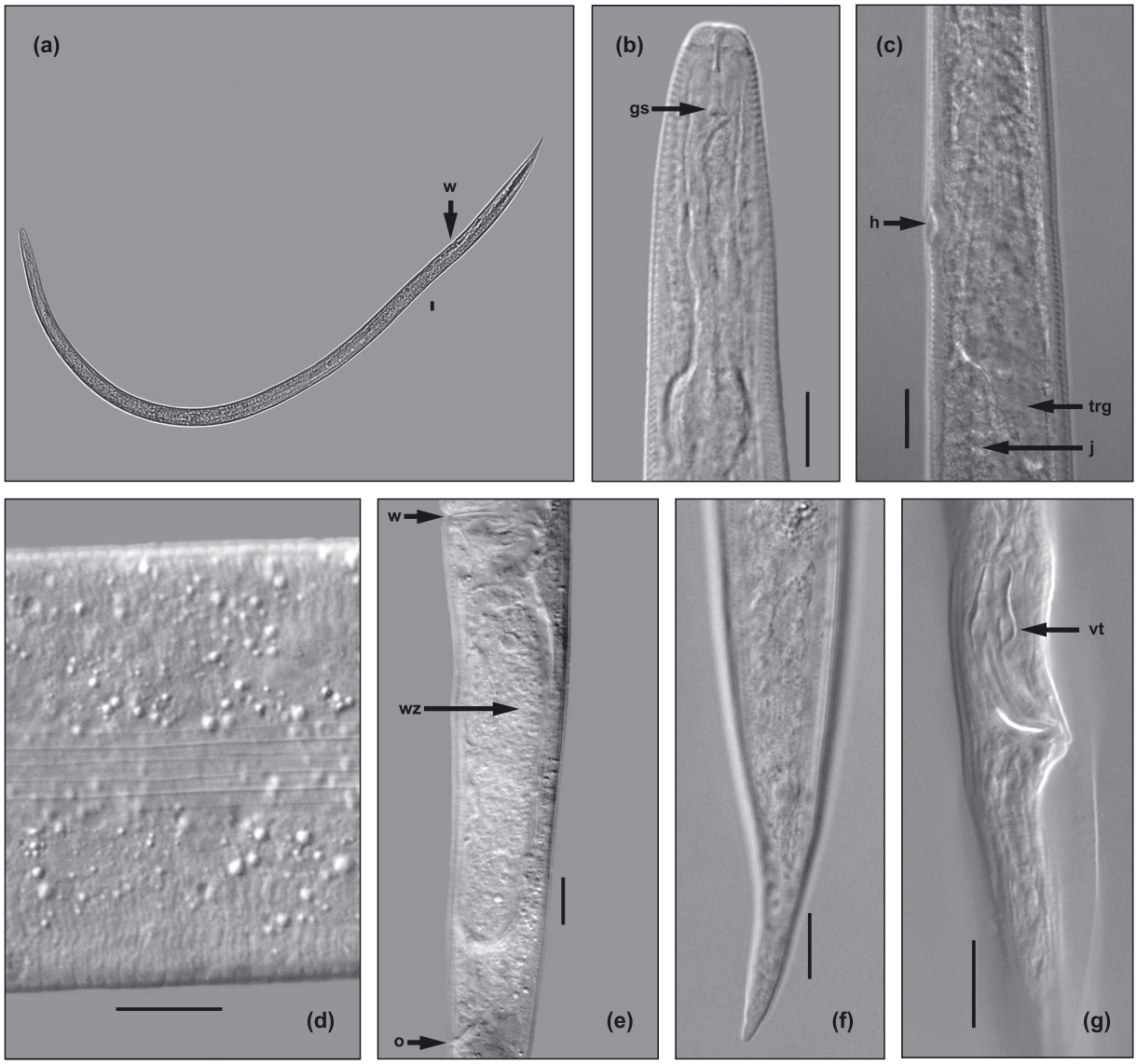
Ciało samicy smukłe i wyprostowane, długości 0,85–1,34 [1,08] mm. Sztylet dobrze wykształcony długości 10–13,5 [11,1] µm z okrągłymi guzkami. Tylne rozszerzenie gardzieli nie zachodzi na jelito. Pole boczne z sześcioma liniami. V = 74–80 [78]%. Woreczek zapochwowy długości 25–47% odległości pomiędzy wulwą i otworem odbytowym. Ogon stożkowaty, ostro zakończony, długości 59–92 [75] µm. c' = 4,3–6,4 [5,4]. Samce występują. Gatunek związany z konwalią majową *Convalaria majalis* L.



Fot. 5. *Ditylenchus convallariae.* Samica: pokrój ciała (a), głowa (b), gardziel (c), pole boczne (d), tylna część ciała (e), ogon (f). Skala: Fot. 1a. = 20 µm; Fot. 1b–1f =10 µm. (gs – guzki sztyletu, h – hemizonid, j – jelito, o – odbyt, ow – otwór wydalniczy, trg – tylne rozszerzenie gardzieli, w – wulwa, wz – woreczek zapochwowy).

Ditylenchus destructor (Fot. 6a–6g)

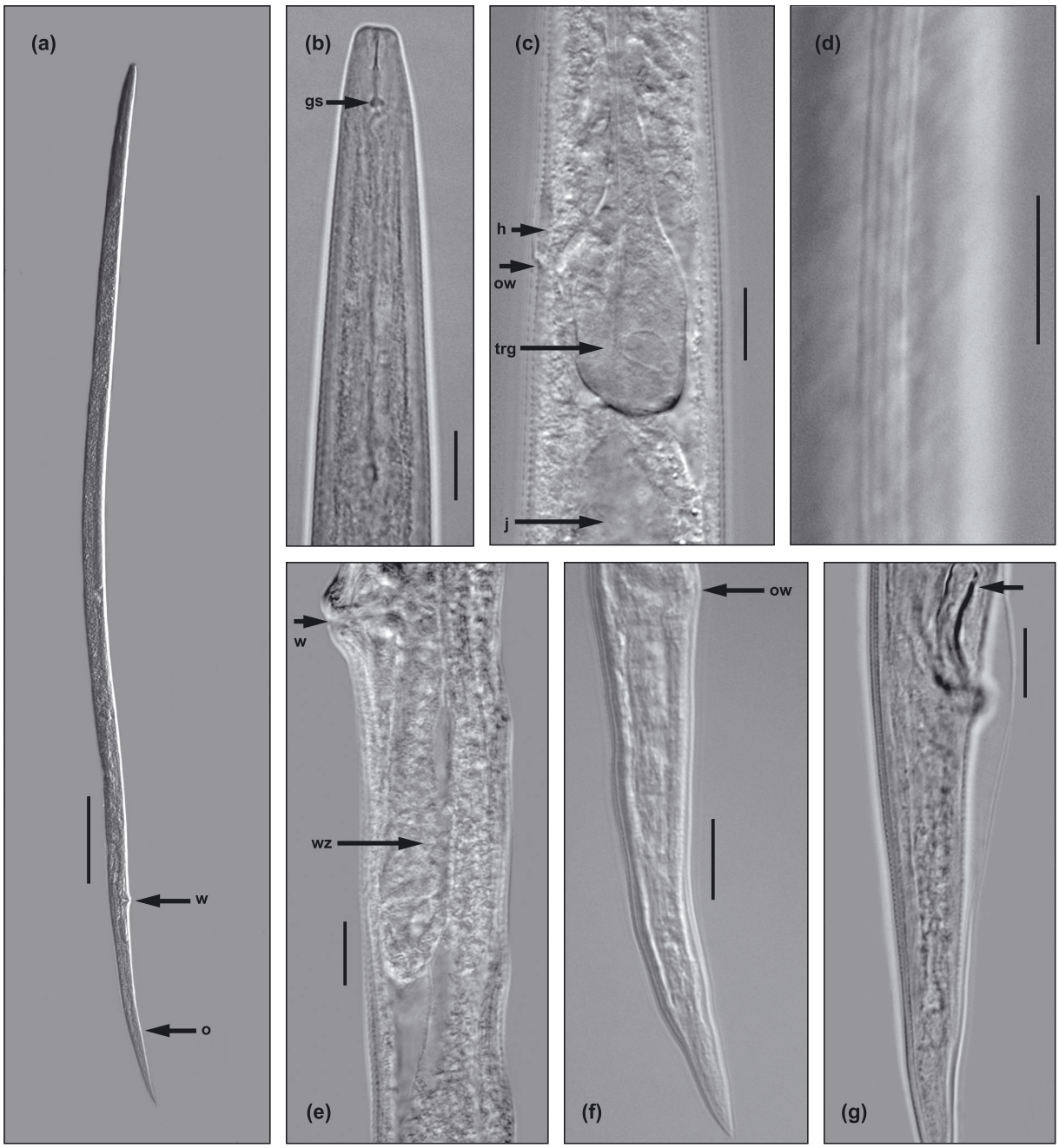
Ciało samicy lekko wygięte w stronę brzuszną, długości 0,7–1,9 [1,08] mm. Sztylet długości 10–14 µm z zaokrąglonymi guzkami. Gruczołowa część gardzieli obejmuje jelito zwykle po stronie grzbietowej, średnio na odległość równą połowie szerokości ciała nicienia mierzonej na tej wysokości ciała. Pole boczne z sześcioma liniami. V = 73–84 [80]%. Woreczek zapochwowy długości 53–90% odległości pomiędzy wulwą i otworem odbytowym. Ogon długości 62–89 µm, zakończenie ogona zaokrąglone. c' = 3–5. Samce występują. Spikule samca cechuje charakterystyczne zgrubienie od strony brzusznej *ventral tumulus*. *D. destructor* posiada około 100 gatunków roślin żywicielskich należących do wielu rodzin botanicznych. Najważniejsze gatunki roślin żywicielskich to: ziemniak (*Solanum tuberosum* L.), irys (*Iris* L.), tulipan (*Tulipa* L.), dalia (*Dahlia* L.), gladiola (*Gladiolus* L.), koniczyna (*Trifolium* L.), marchew (*Daucus carota* L.), a także liczne chwasty. *D. destructor* ma zdolność rozwoju na grzybni.



Fot. 6. *Ditylenchus destructor*. Samica: pokrój ciała (a), głowa (b), gardziel (c), pole boczne (d), tylna część ciała (e), ogon (f). Samiec: spikule (g). Skala: 10 µm. (gs – guzki sztyletu, h – hemizonid, j – jelito, o – odbyt, trg – tylne rozszerzenie gardzieli, w – wulwa, wz – woreczek zapochwowy, *vt – ventral tumulus*).

Ditylenchus dipsaci (Fot. 7a–7g)

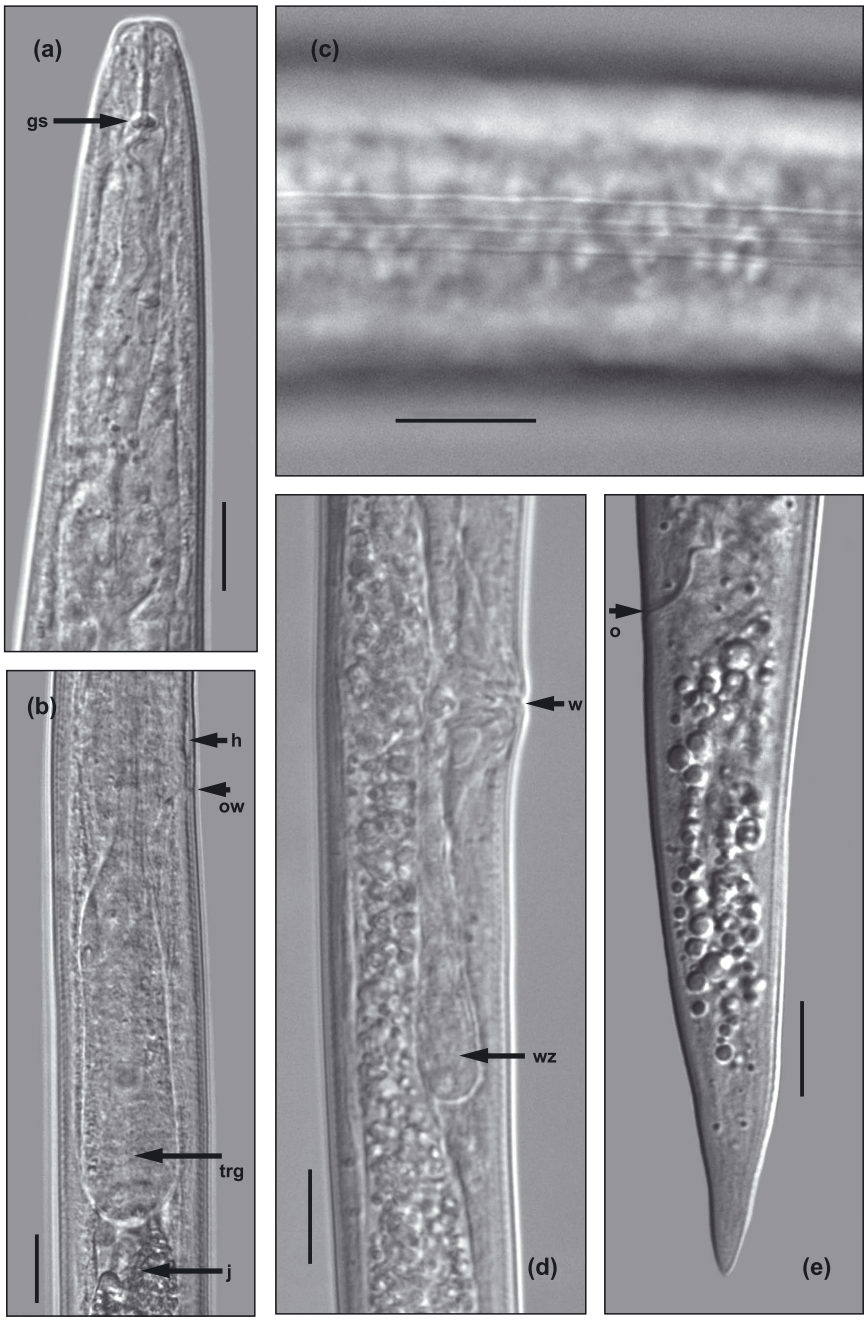
Ciało samicy wyprostowane, długość ciała w przedziale 1,0–1,7 mm. Sztylet długości 11–13 µm z guzkami od zaokrąglonych po lekko wyciągnięte. Tylne rozszerzenie gardzieli nie zachodzi na jelito. Pole boczne z czterema liniami. V = 73–82%. Woreczek zapochwowy osiąga długość 53–90 [50]% odległości wulwa – otwór odbytowy. Długość ogona 70–110 µm. Ogon stożkowaty, ostro zakończony. c' = 3–6. Samce występują. Spikule nie posiadają *ventral tumulus*. W obrębie gatunku wyodrębniono rasy żywicielskie powiązane z ograniczoną liczbą gatunków roślin.



Fot. 7. *Ditylenchus dipsaci.* Samica: pokrój ciała (a), głowa (b), gardziel (c), pole boczne (d), tylna część ciała (e), ogon (f). Samiec: spikule (g). Skala: Fot. 1a.= 100 µm; Fot. 1b–1e = 10 µm. (gs – guzki sztyletu, h – hemizonid, j – jelito, o – odbyt, ow – otwór wydalniczy, trg – tylne rozszerzenie gardzieli. w – wulwa, wz – woreczek zapochwowy).

Ditylenchus gigas (Fot. 8a–8e)

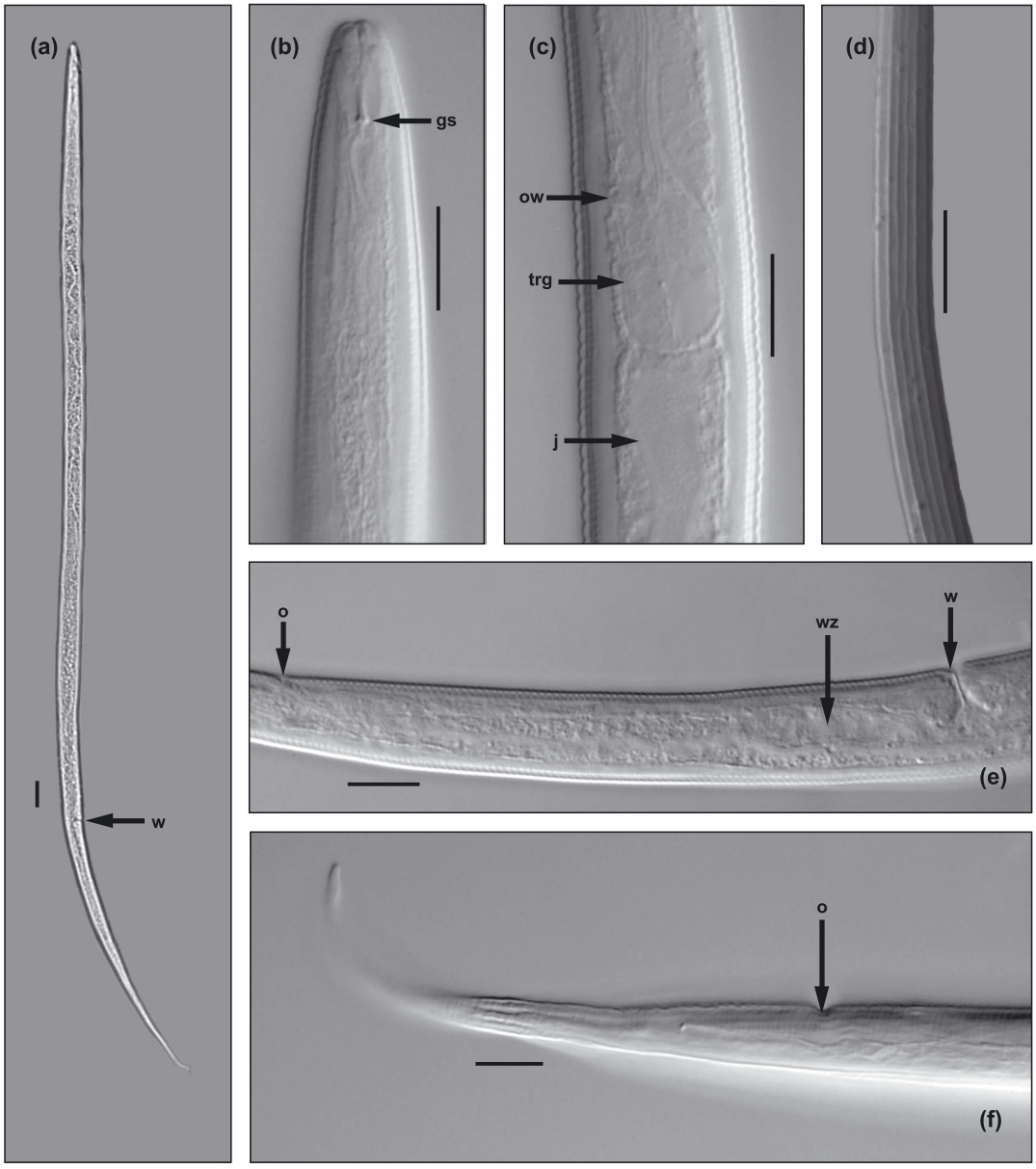
Ciało samicy wyprostowane długości 1,5–2,2 mm. Sztylet delikatny długości 11,5–13 µm z guzkami wyciągniętymi ku tyłowi. Gruczołowa część gardzieli wydłużona, nieznacznie zachodząca na jelito. Pole boczne z czterema liniami. V = 80–83%. Długość woreczka zapochwowego obejmuje 50,5–54,5% odległości wulwa – otwór odbytowy. Ogon stożkowaty, na końcu delikatnie zaokrąglony, o długości 69–103 µm. c' = 4,1–6,2 [4,6]. Samce występują. Spikule nie posiadają *ventral tumulus*. Rośliną żywicielską nicienia jest bób (*Vicia faba* L.).



Fot. 8. *Ditylenchus gigas*. Samica: głowa (a), gardziel (b), pole boczne (c), tylna część ciała (d), ogon (e). Skala: 10 µm. (gs – guzki sztyletu, h – hemizonid, j – jelito, o – odbyt, ow – otwór wydalniczy, trg – tylne rozszerzenie gardzieli, w – wulwa, wz – woreczek zapochwowy).

Ditylenchus longicauda (Fot. 9a–9f)

Samice długości 0,74–1,42 [0,96] mm, smukłe, wyprostowane lub lekko wygięte. Sztylet długości 8–10 µm, guzki sztyletu od zaokrąglonych po lekko wyciągnięte ku tyłowi ciała. Tylne rozszerzenie gardzieli oddzielone od jelita. Pole boczne z sześcioma liniami. V = 75–80,5 [77]%. Woreczek zapochwowy zajmuje 24–34% odległości między wulwą i otworem odbytowym. Ogon długości 88–115 µm, zwężający się w przedniej części, a cylindryczny z zaokrąglonym zakończeniem w tylnej. c' = 3,4–6,7 [5,3]. Samce występują. Gatunek rzadko znajdowany. Sposób odżywiania nie znany.



Fot. 9. *Ditylenchus longicauda*. Samica: pokrój ciała (a), głowa (b), gardziel (c), pole boczne (d), tylna część ciała (e), ogon (f). Skala: Fot. 1a. = 20 µm; Fot. 1b–1f =10 µm. (gs – guzki sztyletu, h – hemizonid, j – jelito, o – odbyt, ow – otwór wydalniczy, trg – tylne rozszerzenie gardzieli, w – wulwa, wz – woreczek zapochwowy).

2. OZNACZANIE PRZYNALEŻNOŚCI GATUNKOWEJ NICIENI Z WYKORZYSTANIEM METOD BIOLOGII MOLEKULARNEJ

W literaturze znajduje się szereg metod diagnostycznych służących do identyfikacji ważnych ekonomicznie gatunków należących do rodzaju *Ditylenchus.* Większość z nich dotyczy wykrywania *D. dipsaci* oraz *D. destructor.* Nicienie zakwalifikowane do kompleksu gatunków *D. dipsaci* stanowią bardzo niejednorodną grupę, z której w 2011 wyróżniono kolejny ważny ekonomicznie gatunek *D. gigas*. Z kolei w przypadku *D. destructor* wyszczególniono szereg haplotypów, w oparciu o ich znacznie zróżnicowane sekwencje rDNA. Poniższe protokoły diagnostyczne zostały opracowane w Międzyzakładowej Pracowni Biologii Molekularnej i umożliwiają wykrywanie *D. dipsaci,* wszystkich dotychczas scharakteryzowanych haplotypów *D. destructor,* a także *D. gigas* w oparciu o standardową reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) oraz PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR). Reakcje te można prowadzić także jednocześnie – tzw. multiplex PCR (Jeszke i in., 2015).

W opracowanych reakcjach PCR wykorzystuje się jeden starter uniwersalny (dla wszystkich trzech gatunków) i trzy startery gatunkowo-specyficzne (Tabela 1).

Tabela 1. Zestawienie stosowanych par starterów i spodziewanej długości produktów reakcji PCR oraz temperatury topnienia produktu reakcji real-time PCR dla poszczególnych gatunków nicieni z rodzaju *Ditylenchus*

Gatunek	Nazwa startera	Sekwencja	Region przyłączenia	Wielkość produktu PCR	Temp. topnienia
D. dipsaci	DITuniF	CTGTAGGTGAACCTGC	18S rDNA	148	86°C
	DITdipR	GACATCACCAGTGAGCATCG	ITS1 rDNA		
D. gigas	DITuniF	CTGTAGGTGAACCTGC	18S rDNA	270	88°C
	DITgigR	GACCACCTGTCGATTC	ITS1 rDNA		
D. destructor	DITuniF	CTGTAGGTGAACCTGC	18S rDNA	Hap. A – 152 Hap. B – 315 Hap. C – 339 Hap. D – 339 Hap. E – 209 Hap. F – 292 Hap. G – 315	90°C
	DITdesR	GTTTTTCGCCCACAAATTAGC	ITS1 rDNA		

2.1. Izolacja DNA

Aby możliwe było przeprowadzenie reakcji PCR, konieczne jest wyizolowanie z nicieni całkowitego genomowego DNA. Etap ten można przeprowadzić z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych zestawów odczynników (np. NucleoSpin® Tissue, Macherey-Nagel). Młodocianego lub dorosłego osobnika należy dokładnie rozgnieść w buforze lizującym, dodać proteinazę K i inkubować przez 16-20 godzin w temperaturze 56°C. Następnie dodaje się kolejne bufory, stwarzając odpowiednie warunki do związania DNA ze złożem znajdującym się na kolumnach załączonych przez producenta. Całość

mieszaniny nakłada się na kolumnę i wiruje. Kolejnym etapem jest przepłukanie oraz dokładne wysuszenie filtra kolumny, po czym przeprowadza się z niego elucję DNA za pomocą wody lub buforu dołączonego do zestawu.

UWAGA:

- Jakość wyizolowanego DNA należy sprawdzić spektrofotometrycznie (np. spektrofotometr NanoDrop, Thermo Scientific). Jego stężenie można ocenić mierząc absorbancję przy długości fali λ = 260 nm, natomiast czystość preparatu ocenia się na podstawie stosunku współczynników A_{260}/A_{280} (wartość pomiędzy 1,7–1,9 świadczy o jego czystości).
- Wyizolowany DNA należy przechowywać w temperaturze –20°C.

2.2. Reakcje PCR umożliwiające rozróżnienie gatunków *D. dipsaci*, *D. gigas* i *D. destructor*

Reakcje PCR dla wszystkich trzech gatunków przeprowadza się w taki sam sposób i w tych samych warunkach termicznych, różnią się jedynie parą zastosowanych starterów. W tabeli powyżej zestawiono startery, które należy zastosować do identyfikacji danego gatunku wraz ze spodziewaną długością produktu PCR (Tabela 1).

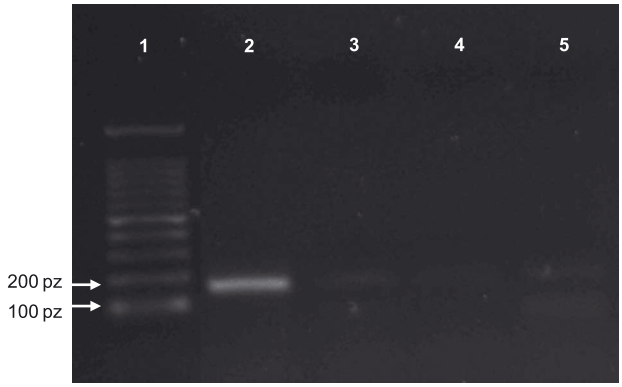
Reakcje PCR przeprowadza się przy użyciu komercyjnie dostępnej polimerazy Taq, sprzedawanej często w gotowej już mieszaninie zawierającej także odpowiedni bufor i mieszaninę dNTP (np. DreamTaq Master Mix, Thermo Scientific Fermentas) lub w zestawie z buforem (np. Allegro, Novazym).

A. Identyfikacja gatunku *Ditylenchus dipsaci*

Reakcję prowadzi się w 10 µl mieszaniny zawierającej:

- 0,2 U polimerazy Taq,
- 1x stężony bufor dołączony zwykle do polimerazy o składzie: 10 mM Tris-HCl pH 8,8, 1,5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100,
- 200 µM dNTP,
- 1 µM każdego ze starterów: DITuniF (5'-CTGTAGGTGAACCTGC-3') i DITdipR (5' – GACATCACCAGTGAGCATCG – 3'),
- 5 ng analizowanego genomowego DNA,
- wodę.

Spodziewana wielkość produktu tej reakcji wynosi ok. 148 pz. Poniżej przestawiono przykładowy wynik reakcji pozytywnej dla tego gatunku (Rys. 1).

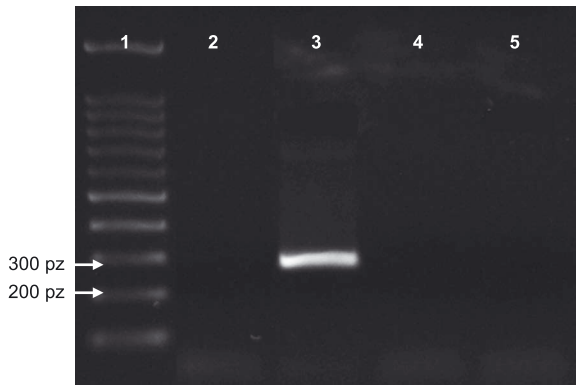


Rys. 1. Przykładowy wynik rozdziału w żelu agarozowym produktów reakcji PCR specyficznej dla *D. dipsaci*; 1 – marker masy cząsteczkowej (Nova 100 bp, Novazym), 2 – *D. dipsaci*, 3 – *D. gigas*, 4 – *D. destructor*, 5 – kontrola odczynnikowa.

B. Identyfikacja gatunku *Ditylenchus gigas*

Reakcję prowadzi się w 10 µl mieszaniny zawierającej:
- 0,2 U polimerazy Taq,
- 1x stężony bufor dołączony zwykle do polimerazy o składzie: 10 mM Tris-HCl pH 8,8, 1,5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100,
- 200 µM dNTP,
- 1 µM każdego ze starterów: DITuniF 5' – CTGTAGGTGAACCTGC – 3') i DITgigR (5' – GACCACCTGTCGATTC – 3'),
- 5 ng analizowanego genomowego DNA,
- wodę.

Spodziewana wielkość produktu tej reakcji wynosi ok. 270 pz. Poniżej przestawiono przykładowy wynik reakcji pozytywnej dla tego gatunku (Rys. 2).



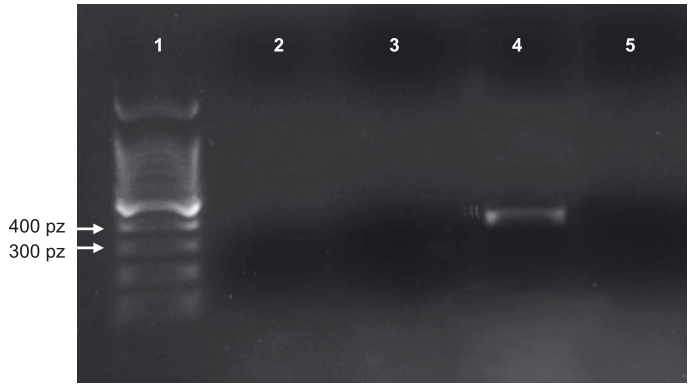
Rys. 2. Przykładowy wynik rozdziału w żelu agarozowym produktów reakcji PCR specyficznej dla *D. gigas*; 1 – marker masy cząsteczkowej (Nova 100 bp, Novazym), 2 – *D. dipsaci*, 3 – *D. gigas*, 4 – *D. destructor*, 5 – kontrola odczynnikowa.

C. Identyfikacja gatunku *Ditylenchus destructor*

Reakcję prowadzi się w 10 µl mieszaniny zawierającej:
- 0,2 U polimerazy Taq,
- 1x stężony bufor dołączony zwykle do polimerazy o składzie: 10 mM Tris-HCl pH 8,8, 1,5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100,

– 200 µM dNTP,
– 1 µM każdego ze starterów: DITuniF (5' – CTGTAGGTGAACCTGC – 3') i DITdesR (5' – GTTTTTCGCCCACAAATTAGC -3'),
– 5 ng analizowanego genomowego DNA,
– wodę.

Spodziewana wielkość produktu zależy od zidentyfikowanego haplotypu i wynosi pomiędzy ok. 152 a ok. 339 pz (Tabela 1). Poniżej przestawiono przykładowy wynik reakcji pozytywnej dla haplotypu C *D. destructor*, najczęściej znajdowanego na terenie Polski (Rys. 3).



Rys. 3. Przykładowy wynik rozdziału w żelu agarozowym produktów reakcji PCR specyficznej dla *D. destructor*; 1 – marker masy cząsteczkowej (Nova 100 bp, Novazym), 2 – *D. dipsaci*, 3 – *D. gigas*, 4 – *D. destructor*, 5 – kontrola odczynnikowa.

Profil termiczny powyższych reakcji jest następujący:
– wstępna denaturacja w 95°C przez 5 min.
– 35 cykli amplifikacji składających się z:
  • denaturacji w 95°C przez 30 s,
  • przyłączenia starterów (annealingu) w 63,5°C przez 30 s,
  • wydłużania produktu (elongacji) w 72°C przez 30 s,
– wydłużanie końcowe w 72°C przez 5 min.

Produkty reakcji należy rozdzielić elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika wiążącego się z DNA (np. Midori Green, Nippon), następnie żel analizuje się w świetle UV. W przypadku wyników pozytywnych na żelu powinien być widoczny pojedynczy produkt reakcji o spodziewanej wielkości.

UWAGA:

– Podczas nastawiania reakcji PCR i real-time PCR należy zachować ostrożność i pracować w sterylnych warunkach (najlepiej pod komorą z laminarnym przepływem powietrza), aby uniknąć zanieczyszczenia mieszaniny reakcyjnej niepożądanym DNA genomowym (z innych reakcji).
– Przeprowadzając każdą z reakcji PCR i real-time PCR należy oprócz próby badanej uwzględnić także kontrolę odczynnikową (mieszaninę reakcyjną zawierającą wodę

zamiast DNA), kontrolę negatywną (zawierającą DNA gatunku innego niż badany) oraz kontrolę pozytywną (zawierającą DNA gatunku badanego).
– Rozdzielając próby w żelu agarozowym należy zawsze rozdzielić także marker masy cząsteczkowej obejmujący swoim zakresem spodziewaną wielkość produktu PCR.

2.3. Reakcje real-time PCR umożliwiające rozróżnienie gatunków *D. dipsaci*, *D. gigas* i *D. destructor*

Reakcje real-time PCR przeprowadza się w sposób analogiczny do reakcji PCR i z wykorzystaniem tych samych par starterów, z tą różnicą, że przebieg reakcji może być monitorowany w czasie rzeczywistym, bez konieczności rozdzielania produktu w żelu agarozowym. Do przeprowadzenia reakcji stosuje się odpowiednie zestawy odczynników zawierające w swoim składzie oprócz polimerazy Taq, buforu i dNTP, także odpowiedni barwnik fluorescencyjny (np. iTaq Universal SYBR Green Supermix, BioRad) lub do polimerazy Taq (np. Allegro, Novazym) dodaje się interkalujący barwnik fluorescencyjny (np. EvaGreen, Biotium). Reakcję prowadzi się w objętości 10 µl, na którą składa się mieszanina odczynników w ilości podanej przez producenta, 1 µM każdego ze starterów, ok. 5 ng analizowanego genomowego DNA oraz woda.

A. Identyfikacja gatunku *Ditylenchus dipsaci*

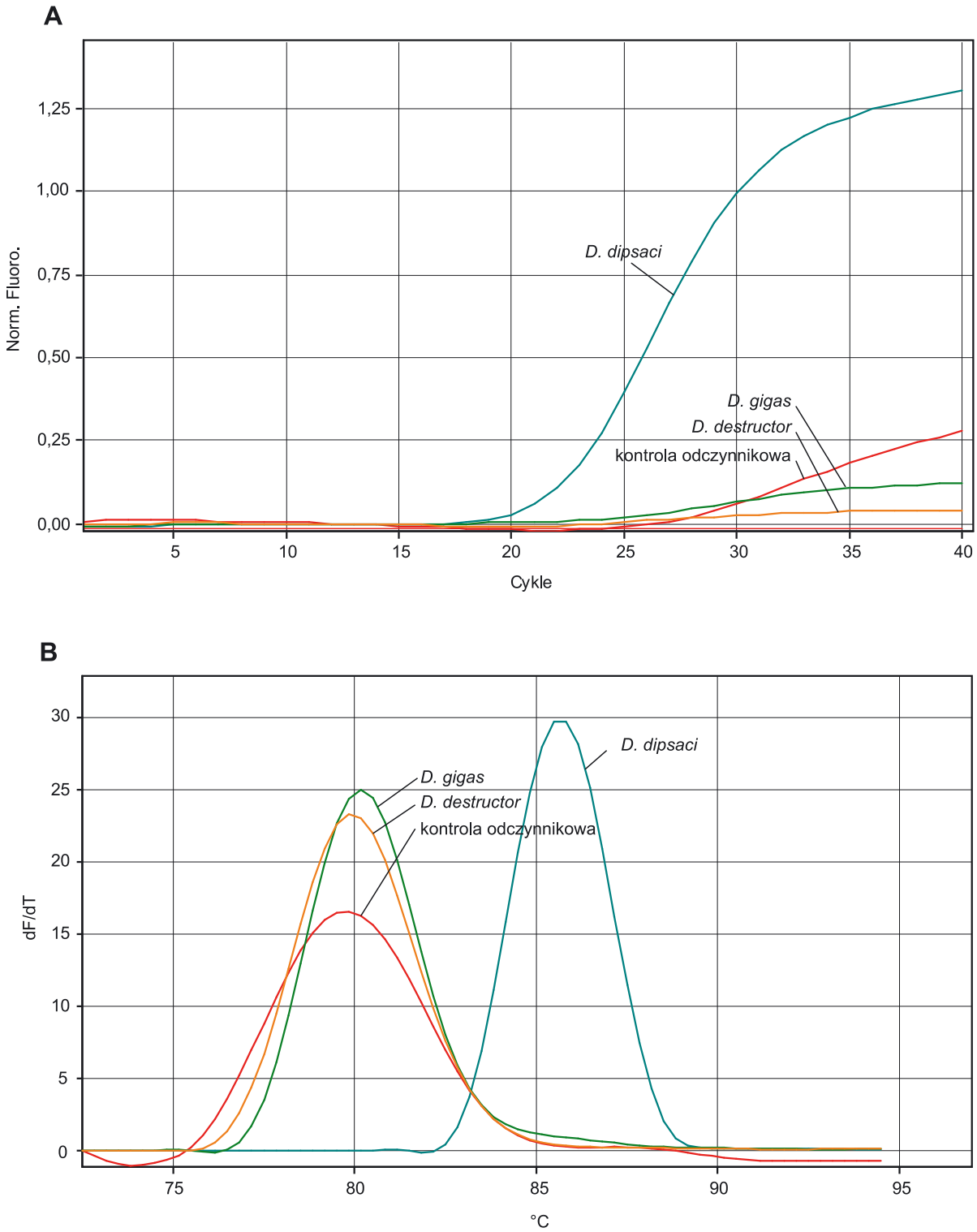
Reakcję prowadzi się w 10 µl mieszaniny zawierającej:
– 0,2 U polimerazy Taq,
– 1x stężony bufor dołączony zwykle do polimerazy o składzie: 10 mM Tris-HCl pH 8,8, 1,5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100,
– 200 µM DTP,
– 1x stężony barwnik EvaGreen,
– 1 µM każdego ze starterów: DITuniF (5' – CTGTAGGTGAACCTGC – 3') i DITdipR (5' – GACATCACCAGTGAGCATCG – 3'),
– 5 ng analizowanego genomowego DNA,
– wodę.

Temperatura topnienia produktu reakcji real-time PCR wynosi 86°C (Tabela 1). Poniżej przestawiono przykładowy wynik reakcji pozytywnej dla tego gatunku (Rys. 4).

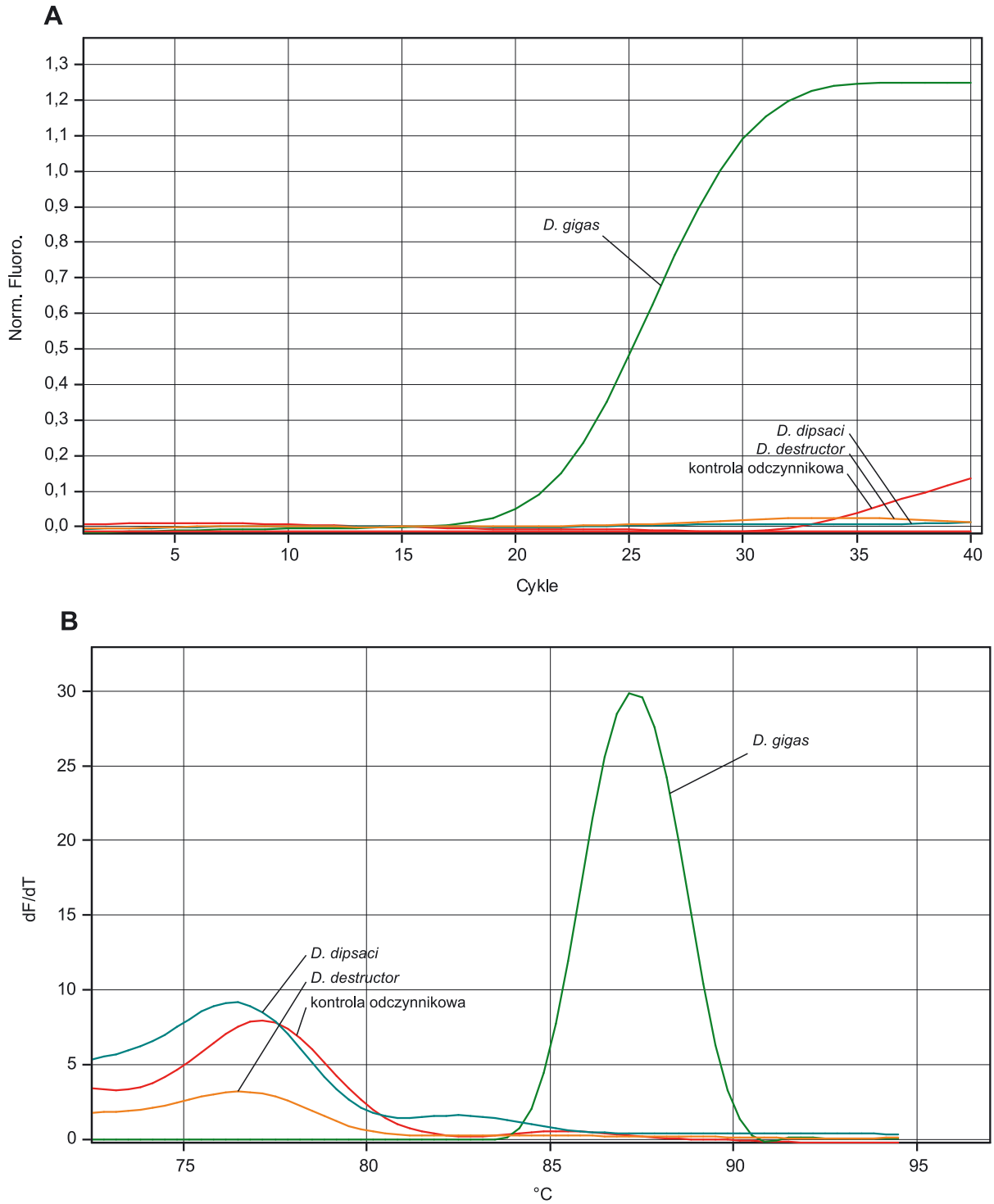
B. Identyfikacja gatunku *Ditylenchus gigas*

Reakcję prowadzi się w 10 µl mieszaniny zawierającej:
– 0,2 U polimerazy Taq,
– 1x stężony bufor dołączony zwykle do polimerazy o składzie: 10 mM Tris-HCl pH 8,8, 1,5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100,
– 200 µM dNTP,
– 1x stężony barwnik EvaGreen,
– 1 µM każdego ze starterów: DITuniF (5' – CTGTAGGTGAACCTGC – 3') i DITgigR (5' – GACCACCTGTCGATTC – 3'),
– 5 ng analizowanego genomowego DNA,
– wodę.

Temperatura topnienia produktu reakcji real-time PCR wynosi 88°C (Tabela 1). Poniżej przestawiono przykładowy wynik reakcji pozytywnej dla tego gatunku (Rys. 5).



Rys. 4. Przykładowy wynik reakcji real-time PCR specyficznej dla *D. dipsaci*: A. krzywa amplifikacji; B. krzywa dysocjacji



Rys. 5. Przykładowy wynik reakcji real-time PCR specyficznej dla *D. gigas*: A. krzywa amplifikacji; B. krzywa dysocjacji

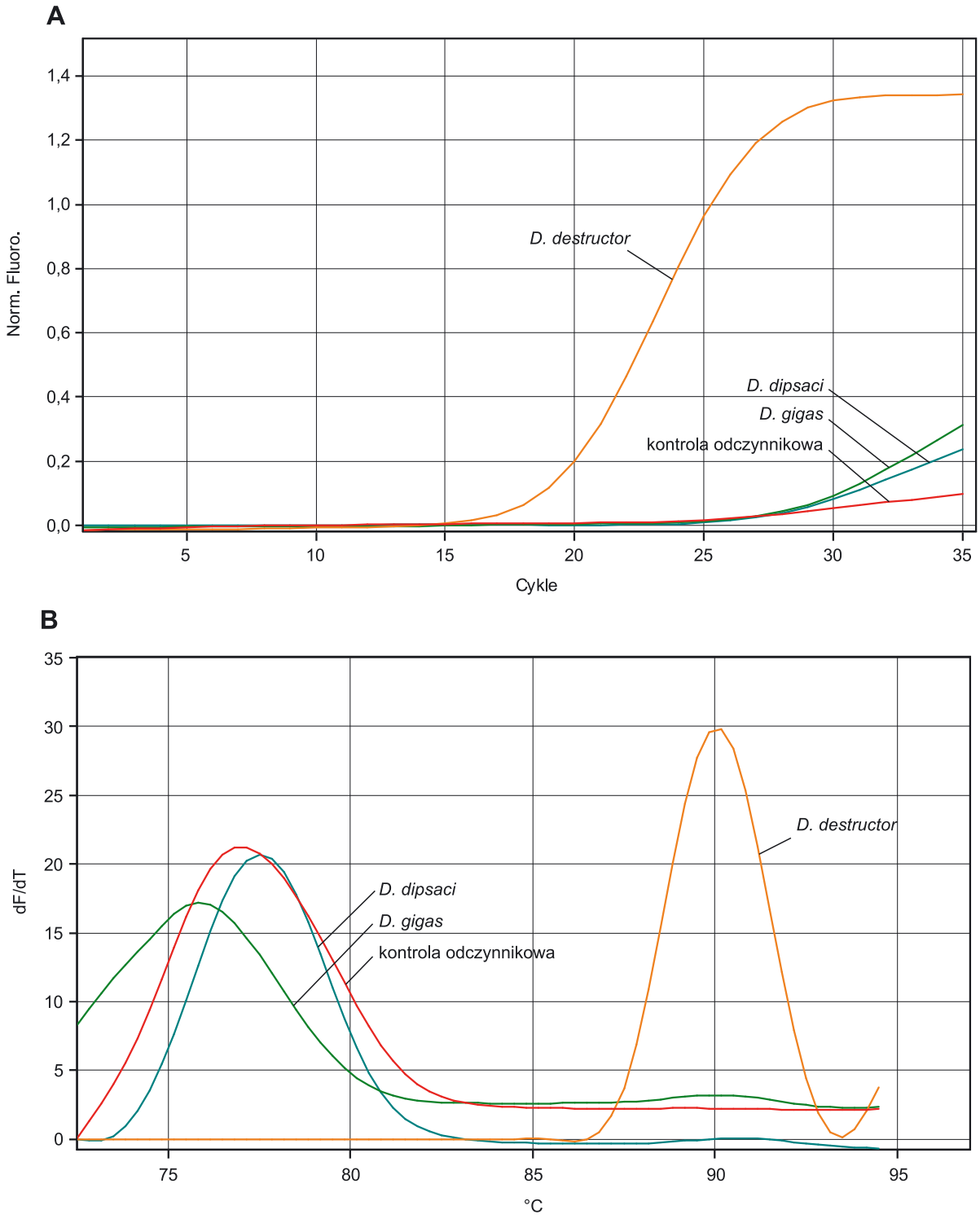
C. Identyfikacja gatunku *Ditylenchus destructor*

Reakcję prowadzi się w 10 µl mieszaniny zawierającej:

- 0,2 U polimerazy Taq,
- 1x stężony bufor dołączony zwykle do polimerazy o składzie: 10 mM Tris-HCl pH 8,8, 1,5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100,
- 200 µM dNTP,
- 1x stężony barwnik EvaGreen,

- 1 µM każdego ze starterów: DITuniF (5' – CTGTAGGTGAACCTGC – 3') i DITdesR (5' – GTTTTTCGCCCACAAATTAGC – 3'),
- 5 ng analizowanego genomowego DNA,
- wodę.

Temperatura topnienia produktu reakcji real-time PCR dla haplotypu C, najczęściej występującego na terenie Polski, wynosi 90°C. Poniżej przestawiono przykładowy wynik reakcji pozytywnej dla tego haplotypu (Rys. 6).



Rys. 6. Przykładowy wynik reakcji real-time PCR specyficznej dla *D. destructor*: A. krzywa amplifikacji; B. krzywa dysocjacji

Profil termiczny powyższych reakcji jest następujący:
– wstępna denaturacja w 95°C przez 5 min.
– 35 cykli amplifikacji składających się z:
- denaturacji w 95°C przez 30 s,
- przyłączenia starterów (annealingu) w 63,5°C przez 30 s,
- wydłużania produktu (elongacji) w 72°C przez 30 s.

Wyniki reakcji real-time PCR analizuje się przy pomocy odpowiedniego oprogramowania dostarczanego z aparaturą do real-time. Analizie podlega krzywa amplifikacji oraz krzywa dysocjacji (Rys. 4–6). W przypadku, gdy wynik jest pozytywny, temperatura topnienia produktu, odczytana z krzywej dysocjacji, powinna być specyficzna dla danego gatunku (Tabela 1.). Krzywa dysocjacji o innej temperaturze topnienia (najczęściej niższej niż oczekiwana, ponieważ topnieniu ulegają przeważnie struktury drugorzędowe tworzone przez startery) wskazuje na wynik niespecyficzny lub negatywny.

UWAGA:

Najbardziej wiarygodnym potwierdzeniem przynależności gatunkowej badanych nicieni jest analiza sekwencyjna produktów PCR uzyskanych w ww. reakcjach, którą można przeprowadzić w jednym z serwisów oferujących tego typu usługi (np. Genomed S.A.). Wynika to z możliwości zaistnienia takiego zróżnicowania w obrębie amplifikowanego regionu rDNA, że skutkowałoby to zajściem reakcji krzyżowych ze spokrewnionymi gatunkami. Wyniki sekwencjonowania należy porównać z danymi zdeponowanymi w bazie danych GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information).

3. LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA

Brzeski MW, 1998. Nematodes of Tylenchina in Poland and temperate Europe. Warszawa, Muzeum i Instytut Zoologii Polska Akademia Nauk, 397 pp.

Dobies T. 2004. Analiza faunistyczno – ekologiczna nicieni (Nematoda) wybranych szkółek leśnych ze szczególnym uwzględnieniem nicieni z rzędu Tylenchida. Praca doktorska. Wydział Leśny Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu. 102 ss.

Jeszke, A., Dobosz, R., Obrępalska-Stęplowska, A. 2015. A fast and sensitive method for the simultaneous identification of three important nematode species of the genus *Ditylenchus*. Pest Management Science 71(2): 243–249.

Karssen G., Willemsen N.M. 2010. The spiculum: an additional useful character for identification of *Ditylenchus dipsaci* and *D. destructor* (Nematoda: Anguinidae). Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 40: 211–212.

Volvas N., Troccoli A., Palomares-Rius J.E., De Luca F., Liébans G., Landa B.B., Subbotin S., Castillo P. 2011. *Ditylenchus gigas* n. sp. parasitizing broad bean: a new stem nematode singles out from the *Ditylenchus dipsaci* species complex using polyphasic approach with molecular phylogeny. Plant Pathology 60: 762–775.