

Diagnostyka **Diagnostic**

Meloidogyne chitwoodi* i *Meloidogyne fallax

Zakres

Niniejszy standard opisuje protokół diagnostyczny dotyczący *Meloidogyne chitwoodi* i *Meloidogyne fallax*.¹

Zatwierdzenie i nowelizacja

Zatwierdzony po raz pierwszy jako standard EPPO we wrześniu 2003 r.² Zrewidowana wersja zatwierdzona we wrześniu 2008 r.

Wprowadzenie

Jak dotąd opisano ponad 90 gatunków guzaków. Wszystkie gatunki tych nicieni to obligatoryjne endopasożyty uszkadzające korzenie roślin a ich występowanie stwierdza się na całym świecie. Około 10 gatunków wywołuje szkody w rolnictwie, z czego cztery gatunki to szkodniki o dużym znaczeniu gospodarczym szeroko rozprzestrzenione na obszarach użytkowanych rolniczo na całym świecie. Gatunki *Meloidogyne chitwoodi* i *Meloidogyne fallax* pasożytują na roślinach jedno- i dwuliściennych, wliczając w to kilka gatunków roślin uprawnych, takich jak ziemniaki, marchew i pomidor (Santo i in., 1980; O'Bannon i in., 1982; Brinkman i in., 1996; Karssen, 2002). Osobniki młodociane drugiego stadium są przywabiane przez korzenie, do których przedostają w pobliżu ich wierzchołków, skąd przenikają do kory pierwotnej. Pasożyty zaczynają odżywiać się komórkami rośliny, które bardzo szybko przekształcają się w komórki olbrzymie o wielu jądrach. W tym samym czasie, gdy ma miejsce tworzenie się komórek olbrzymich, komórki sąsiedniego pericyklu rozpoczynają się namnażać, co doprowadza do tworzenia się typowych wyrosli lub zgrubień. Guzaki są w stanie przemieszczać się aktywnie tylko kilka metrów w ciągu roku, lecz mogą one ulegać łatwemu przeniesieniu podczas transportu porażonych roślin i produktów roślinnych, w glebie przylegającej do narzędzi i maszyn rolniczych, a także wraz z wodą służącą do nawadniania.

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.

² Pierwsza wersja niniejszego standardu została opracowana w ramach projektu Unii Europejskiej DIAGPRO (SMT 4-CT98-2252) w wyniku współpracy laboratoriów biorących udział w tym projekcie i laboratoriów z różnych krajów europejskich uczestniczących w porównaniach międzylaboratoryjnych.

Guzaki oddziałują niekorzystnie na wzrost korzeni roślin żywicielskich oraz ilość i jakość plonów tych roślin. Objawy na nadziemnych częściach roślin zwykle nie są wyraźnie widoczne, lecz mogą one pojawić się w postaci zahamowania rozwoju roślin w różnym stopniu, braku wigoru oraz więdnienia roślin w przypadku ograniczonego dostępu wody. Rośliny żywicielskie mogą być silnie porażone, lecz zebrany materiał roślinny może nie wykazywać żadnych objawów porażenia, jak ma to niekiedy miejsce w przypadku bulw ziemniaka.

M. chitwoodi zostały opisane z północno-zachodniego regionu pacyficznego w USA w 1980 r. Obecnie jego występowanie notuje się w Argentynie, Belgii, Holandii, Niemczech, Portugalii, USA, Meksyku i RPA. *M. fallax* został wykryty po raz pierwszy w 1992 r. na polu doświadczalnym znajdującym się w odległości 1 mili (ok. 1,6 km, przy tłum) na północ od miejscowości Baexem (Holandia), gdzie początkowo wzięto go za odbiegającą od normy populację *M. chitwoodi* (Karssen, 1994; van Meggelen i in., 1994). Po pierwszym odnotowaniu nicienia stwierdzono jego obecność także w kilku dalszych stanowiskach w południowej i południowo-wschodniej części Holandii (Karssen, 1996a), w pobliżu granicy z Niemcami i Belgią. Został on także stwierdzony w inspekcji we Francji (Daher i in., 1996). Poza Europą gatunek ten odnotowano w Nowej Zelandii, Australii i RPA (Marshall i in., 2001; Nobbs i in., 2001; Fourie i in., 2001). Innym gatunkiem guzaka, bardzo blisko spokrewnionym z *M. chitwoodi* i *M. fallax* jest *M. minor* opisany na podstawie okazów zebranych z ziemniaka w 2004 r. Wykryto go jak dotąd w Wielkiej Brytanii, Irlandii, Belgii i Holandii. Wywołuje on szczególnie duże uszkodzenia na polach golfowych, gdzie przyczynia się do powstawania "choroby żółtych placów", lecz poraża też inne rośliny jedno- i dwuliścienne (Karssen i in., 2004).

Tożsamość

Nazwa: *Meloidogyne chitwoodi* Golden *et al.* 1980

Stanowisko taksonomiczne: Nematoda, Tylenchida³, Meloidogynidae

Komputerowy kod EPPO: MELGCH

Kategoria fitosanitarna: lista A2 EPPO nr 227, 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: I/A2.

Nazwa: *Meloidogyne fallax* Karssen 1996

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

Stanowisko taksonomiczne: Nematoda, Tylenchida³, Meloidogynidae

Komputerowy kod EPPO: MELGFA

Kategoria fitosanitarna: lista A2 EPPO nr 295, 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: I/A2

Wykrywanie

Wytyczne na temat pobierania próbek bulw ziemniaka z przeznaczeniem do badań na obecność *M. chitwoodi* i *M. fallax* podane są w standardzie PM 3/69 (OEPP/EPPO, 2006).

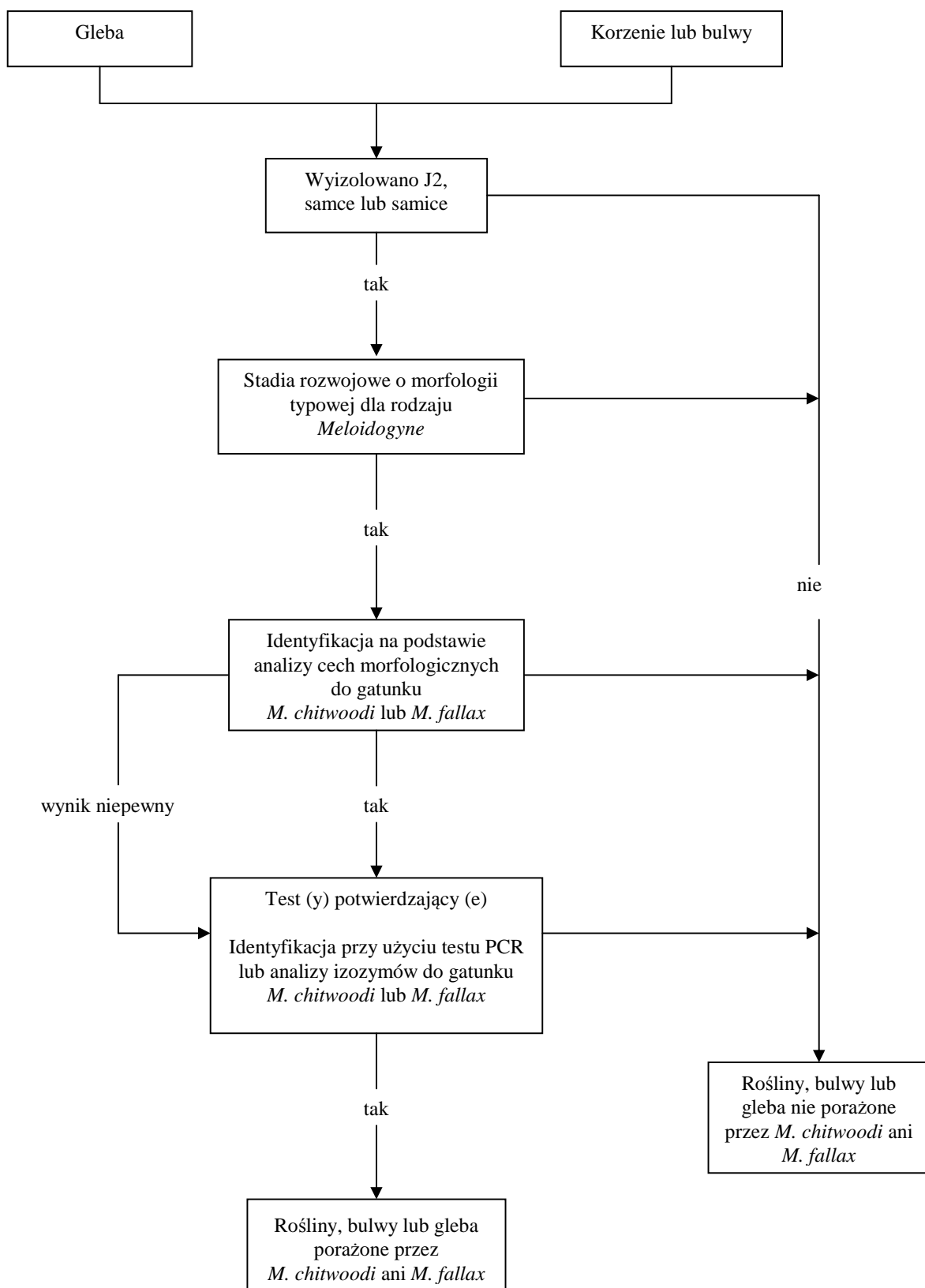
³ Ostatnie osiągnięcia w systematyce nicieni opierające się na danych morfologicznych i wynikach testów molekularnych wskazują na istnienie jednostki taksonomicznej "Tylenchomorpha" (De Ley i Blaxter, 2004).

Objawy

W przypadku silnego porażenia roślin, rozwój nadziemnych części roślin może być zahamowany i mogą one wykazywać objawy żółknięcia, podczas gdy objawy na podziemnych częściach roślin mają postać typowych wyrośli (ryc. 1). Wyrośla wywołane przez *M. chitwoodi* i *M. fallax* mają podobny wygląd do tych, które powstają w wyniku żerowania kilku innych gatunków guzaków, tj. są to stosunkowo małe wyrośla i zwykle nie wyrastają z nich korzenie drugiego rzędu (tak jak ma to miejsce w przypadku *M. hapla*). Na bulwach ziemniaka *M. chitwoodi* i *M. fallax* powodują powstawanie niewielkich wyrośli przypominających wyglądem krosty (w przypadku *M. hapla* te zgrubienia nie są wyraźnie widoczne). Na bulwach niektórych odmian ziemniaka mimo silnego porażenia przez guzaki żadne zewnętrzne objawy porażenia nie są widoczne, lecz wewnętrzna tkanka bulw, tuż pod skórką, jest nekrotyczna i zbrązowiała.



Ryc. 1. Marchew porażona przez *Meloidogyne fallax* (Źródło: Służba Ochrony Roślin, Holandia).



Ryc. 2. Diagram postępowania podczas wykrywania i identyfikacji *Meloidogyne chitwoodi* i *M. fallax*.

Identyfikacja

W celu zidentyfikowania guzaków, które mogą występować w danym materiale, należy najpierw wyekstrahować osobniki tych nicieni z korzeni, bulw ziemniaka oraz gleby i podłoża uprawowego, postępując zgodnie z procedurą przedstawioną w diagramie (ryc. 2). Jeśli na korzeniach zostaną stwierdzone wyrośla, wtedy można pozyskać wszystkie stadia rozwojowe nicieni, a zwłaszcza zgrubiałe samice, samce i osobniki młodociane drugiego stadium. Powinny one posiadać cechy morfologiczne charakterystyczne dla gatunków *Meloidogyne chitwoodi* lub *M. fallax*. Jeśli na korzeniach brak wyrośli, lecz z gleby zostaną pozyskane ruchome stadia nicieni (a zwłaszcza osobniki młodociane drugiego stadium), należy je odróżnić od innych nicieni zasiedlających glebę. Dojrzałe samice można zauważyć w korzeniach, pod mikroskopem stereoskopowym, przy użyciu światła przechodzącego. Identyfikacja do gatunku oparta jest na połączeniu analizy cech morfologicznych i wymiarów nicieni z zastosowaniem metod biochemicznych lub molekularnych (analiza izozymów lub test PCR). Do identyfikacji utrwalonych nicieni zamkniętych w preparatach mikroskopowych zaleca się użycie mikroskopu z kontrastem fazowym.

Ekstrakcja nicieni

Dojrzałe samice i inne stadia rozwojowe nicieni, takie jak samce (ryc. 3) i osobniki młodociane drugiego stadium powinny być wydobyte z tkanki roślinnej lub gleby przy użyciu właściwych metod (Dodatek 1).



Ryc. 3. Samiec *M. chitwoodi* (Karssen, 1996 a).

Morfologia

Morfologia nicieni z rodzaju *Meloidogyne*

Osiadłe samice są zgrubiałe, o pierścieniowanym oskórku, perłowo białe, kuliste lub gruszkowate, o długości 400–1300 μm i szerokości 300–700 μm . Sztylet jest wygięty na stronę grzbietową, długości 10–25 μm , z guzikami kształtu od zaokrąglonego do owalnego, które mogą być wyraźnie wyodrębnione od trzonu sztyletu lub posiadać przednią powierzchnię skierowaną ku tyłowi. Samce nie są osiadłe, kształtu robakowatego, o pierścieniowanym oskórku, lekko zwężające się ku przodowi, tępo zaokrąglone na końcu ciała, długości 700–2000 μm i szerokości 25–45 μm . Sztylet ma 13–30 μm długości, a guziki sztyletu mają zmienny kształt. Osobniki młodociane drugiego stadium nie są osiadłe, lecz kształtu robakowatego, o pierścieniowanym oskórku, zwężające się ku obu końcom, długości 250–700 μm i szerokości 12–18 μm ; ogon ma długość 15–100 μm , a przezroczysta część ogona 5–30 μm .

M. chitwoodi i *M. fallax*

Morfologiczne i morfometryczne różnice między *M. chitwoodi* i *M. fallax* zostały stwierdzone, gdy te dwa gatunki hodowano na tej samej roślinie żywicielskiej w porównywalnych warunkach (Karssen, 1995, 1996a). Najważniejsze różnice morfologiczne między samcami, samicami i osobnikami młodocianymi różnych gatunków guzaków zestawiono w tab.1.

Można też zwrócić uwagę na dodatkowe cechy:

Podczas obserwacji przy użyciu mikroskopu elektronowego skaningowego można zauważyć, że u *M. fallax* głowa samca posiada uwypuklony dysk wargowy. Odnotowano też drugorzędne różnice w morfologii płytek perinealnych samic (u *M. fallax* łuk grzbietowy jest stosunkowo wysoki, a linie perinealne – stosunkowo grube) oraz pozycji hemizonidu⁴ o osobników młodocianych drugiego stadium w porównaniu z umiejscowieniem otworka wydalniczego (na tym samym poziomie w przypadku *M. fallax*, a przylegający i umiejscowiony przed nim w przypadku for *M. chitwoodi*). Oba te gatunki są bardzo do siebie podobne morfologicznie, a nazwa *M. fallax* wywodzi się z faktu, że nicienie z tego gatunku były błędnie identyfikowane jako *M. chitwoodi* (Peterson i Vrain, 1996). Na ryc. 4–7 przedstawione są rysunki różnych stadiów rozwojowych *M. chitwoodi* i *M. fallax*. Jakkolwiek, podczas identyfikacji nicieni oprócz analiz przy użyciu metody morfologiczno-metrycznej należy zastosować metody biochemiczne (Dodatki 2 - 5).

Możliwe pomylenie z innymi gatunkami

Meloidogyne hapla różni się od *M. chitwoodi* i *M. fallax*: budową płytki perinealnej samicy (zaokrąglona z niskim łukiem grzbietowym i liniami bocznymi; w okolicy odbytu samicy występuje punktowanie oskórka); kształtem guzików sztyletu samca i samicy (niewielkie, zaokrąglone, wyraźnie wyodrębnione od trzonu sztyletu); kształtem głowy samca (szerokość głowy nie odpowiada szerokości pierwszego pierścienia ciała, lecz jest nieco większa od niego); kształtem ogona osobników młodocianych drugiego stadium (długi, wysmukły, zwężający się ku tyłowi, od delikatnie zaokrąglonego do zaostrego na końcu i bez wyraźnej granicy przezroczystej części ogona).

⁴ hemizonid - część układu nerwowego (komisura = spoidło łączące pnie nerwowe) widoczna pod mikroskopem w postaci struktury silnie załamującej światło w pobliżu otworu wydalniczego (przyp. tłum.)

Meloidogyne minor różni się od *M. chitwoodi* i *M. fallax* pod względem budowy płytki perinealnej samicy (mała, zaokrąglona z delikatnymi liniami perinealnymi); kształtem guzików szytletu (silnie rozwinięte i okrągłe) oraz pozycją hemizonidu w porównaniu z umiejscowieniem otworka wydalniczego (znajduje się przed otworkiem wydalniczym).

Publikacje Jepson (1987) i Karssena (2002) zawierają informacje na temat porównania *M. chitwoodi* i *M. fallax* z innymi gatunkami z rodzaju *Meloidogyne*, a Siddiqi (2000) podaje dane na temat ich porównania z innymi rodzajami w obrębie rzędu Tylenchida.

Tabela 1. Różnice morfologiczne i morfometryczne między *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax*, *M. minor* i *M. hapla* (µm) (Karssen, 2002; Karssen i in., 2004).

	<i>M. fallax</i>	<i>M. chitwoodi</i>	<i>M. minor</i>	<i>M. hapla</i>
Długość szytletu ♀	14,0-14,5	10,5-13,5	12,5-15	14,0-17,0
Długość szytletu ♂	18-21	16-18	17-19	17-23
Guziki szytletu ♀♂	silnie rozwinięte	drobne	silnie rozwinięte	drobne
Kształt guzików szytletu	zaokrąglone	nieregularne	owalne	zaokrąglone
Długość ciała J2	368-410	336-417	310-416	357-517
Długość ogona J2	46-55,5	39-47	49-63	46-69
Długość przezroczystej części ogona J2	12-16	8-12,5	12-22	12-19

Metody biochemiczne

Esbenshade i Triantaphyllou (1985) opracowali użyteczną metodę identyfikacji samic kilku gatunków z rodzaju *Meloidogyne* (wliczając w to *M. chitwoodi*) przy użyciu elektroforezy izozymów. Układ prążków dla izozymów - esterazy (EC 3.1.1.1) i dehydrogenazy jabłczanowej (EC 1.1.1.37) pozwala na identyfikację samic *M. fallax*, *M. chitwoodi*, *M. hapla* i *M. minor* (Karssen i in., 1995; Karssen, 1996b, Karssen i in., 2004). Oprócz tego użycie izozymów sześćfosforanowej dehydrogenazy glukozy (EC 1.1.1.49) pozwala na odróżnienie *M. chitwoodi* od *M. fallax* (van der Beek i Karssen, 1997). Test opisano w Dodatku 2.

Metody molekularne

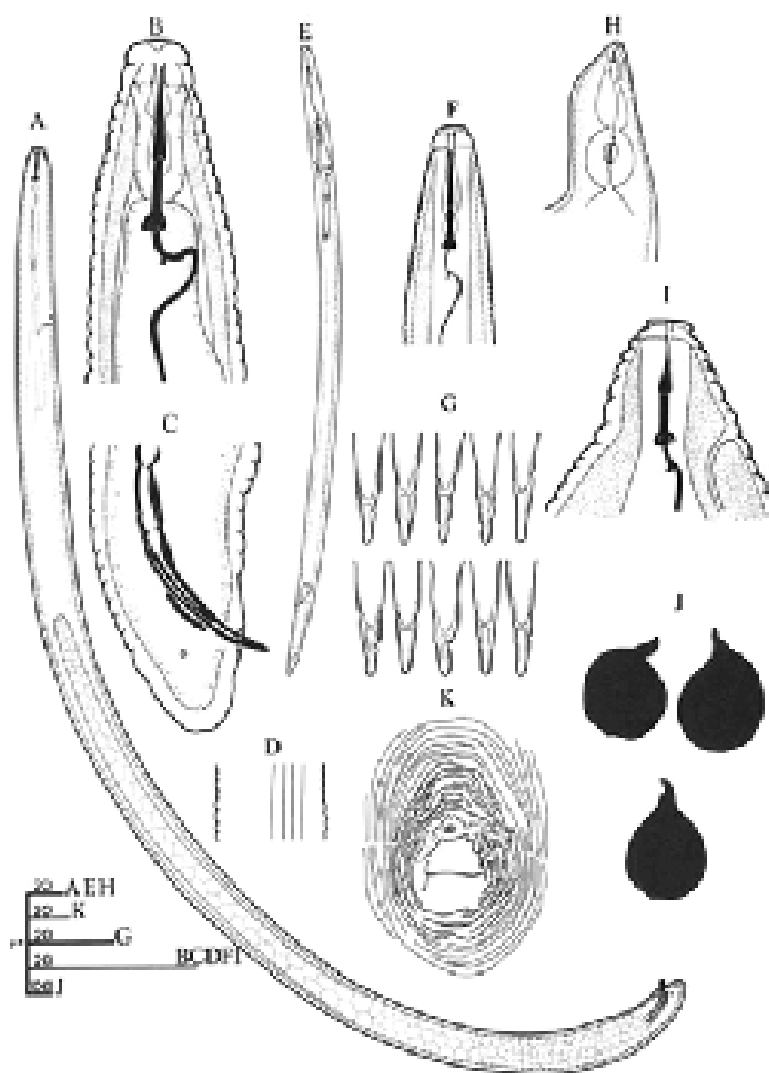
Rekomendowanymi metodami molekularnymi są wymienione poniżej testy PCR:

- Zijlstra (2000), wysoce czuły test PCR oparty na starterach specyficznych dla gatunku lub amplifikowane regiony scharakteryzowane przez sekwencję (SCAR) wywodzące się z fragmentów RAPD (Dodatek 3);
- Wishart i in. (2002), czuły test PCR oparty na starterach specyficznych dla gatunku wywodzących się z rybosomalnych regionów IGS (Dodatek 4);
- Zijlstra (1997), stosunkowo prosty test ITS PCR-RFLP oparty na powszechnie znanych starterach Vrain (Vrain i in., 1992) (Dodatek 5).

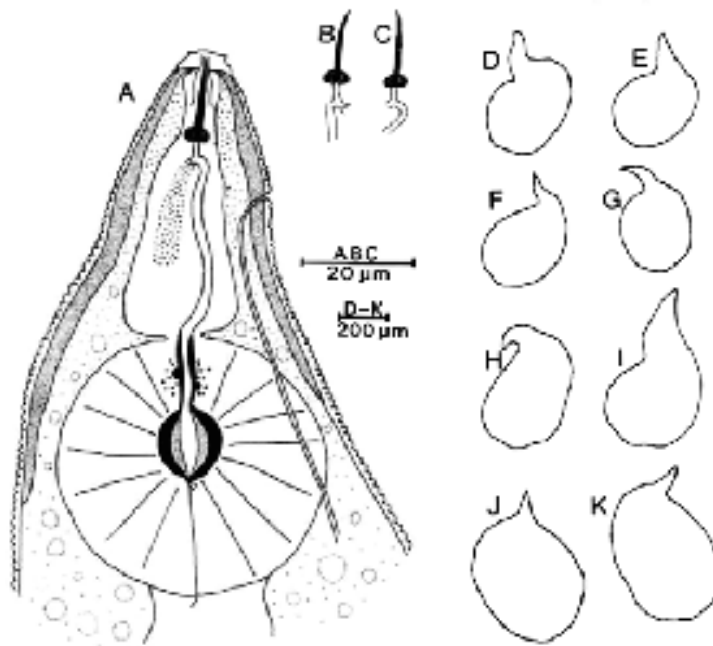
- Zijlstra i van Hoof (2006), test real-time Taqman oparty na sekwencjach ITS (Dodatek 6). Test real-time SYBR-green – test PCR oparty na sekwencjach rDNA (LSU) (www.blgg.nl) i Dodatek 7.

Testy PCR mogą być stosowane do identyfikacji wszystkich stadiów rozwojowych nicieni.

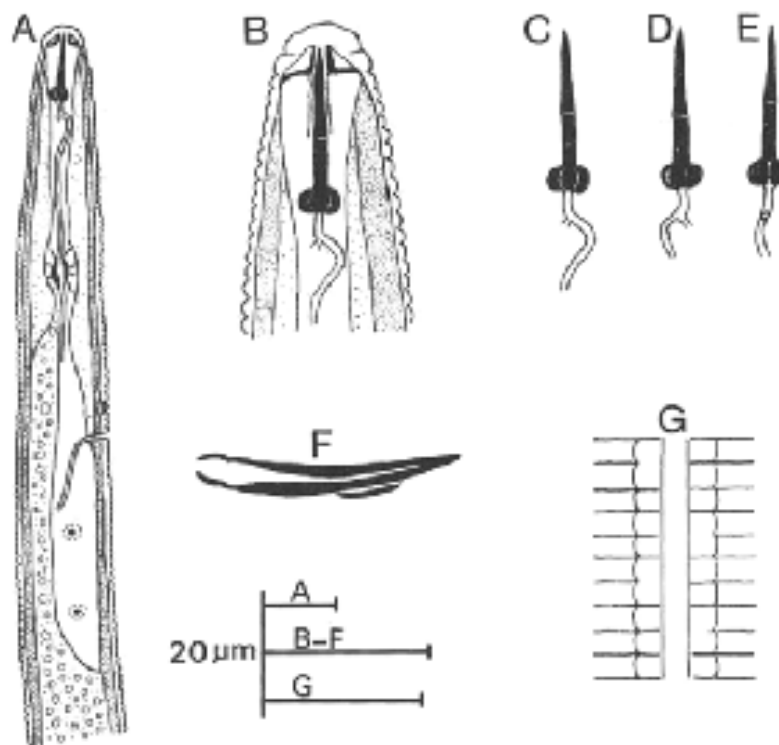
Klucz do identyfikacji pojedynczych osobników młodocianych siedmiu powszechnie występujących i mających znaczenie gospodarcze gatunków guzaków (*Meloidogyne* spp.) przy użyciu testów molekularnych opublikował Adam i in. (2007). Inną publikacją dotyczącą identyfikacji nicieni z rodzaju *Meloidogyne* przy użyciu starterów specyficznych dla gatunku jest praca Petersena i in. (1997).



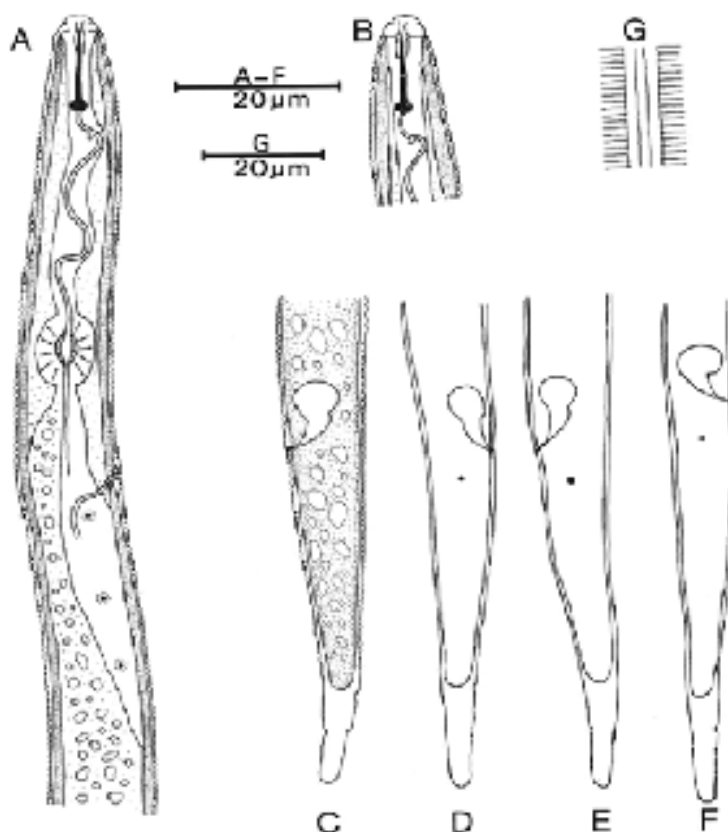
Ryc. 4. *Meloidogyne chitwoodi*: Samiec: (A) cały osobnik, widok z boku; (B) przednia część ciała, widok z boku; (C) tylna część ciała, widok z boku; (D) pole boczne; Osobnik młodociany drugiego stadium: (E) cały osobnik, widok z boku; (F) przednia część ciała, widok z boku (G) budowa ogona; Samica: (H, I) przednia część ciała, widok z boku; (J) wygląd ogólny; (K) płytkę perinealną (Santo i in, 1980).



Ryc. 5. *Meloidogyne fallax*: Samica (wygląd z boku): (A) przednia część ciała, (B, C) sztylety; (D-K) całe osobniki.



Ryc. 6. *Meloidogyne fallax*: Samiec: (A, B) przednia część ciała; (C-E) sztylety (E: widok od dołu); (F) spikule i gubernakulum; (G) linie boczne.



Ryc. 7. *Meloidogyne fallax*: Osobnik młodociany drugiego stadium (widok z boku): (A, B) przednia część ciała; (C-F) ogony; (G) linie boczne.

Materiały odniesienia

Materiały odniesienia można otrzymać z następujących źródeł:

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

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

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 następującego źródła: G. Karssen i LJMF den Nijs, Plant Protection Service, P.O. Box 9102, 6700 HC Wageningen (Holandia).

Podziękowania

Projekt niniejszego protokołu został pierwotnie sporządzony przez G. Karssena i LJMF den Nijs, Plant Protection Service, P.O. Box 9102, 6700 HC Wageningen (Holandia). Zrewidowana wersja została przygotowana przez G. Karssena i LFF Kox, Plant Protection Service, Wageningen (Holandia) i G. Anthoine, LNPV-Unité de Nematologie, Domaine de la Motte au Viconte, BP 35327 Le Rheu (Francja).

Materiały źródłowe

- Adam MAM, Phillips MS, Blok VC (2007). Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). *Plant Pathology* **56**, 190–197.
- Araya M, Caswell-Chen EP (1993) Enzymatic digestion of roots for the recovery of root-knot nematode developmental stages. *Journal of Nematology* **25**, 590–595.
- Brinkman H, Goossens JM, Van Riel HR (1996) Comparative host suitability of selected crop plants to *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*. *Anzeiger für Schädlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz* **96**, 127–129.
- Coolen WA (1979) Methods for the extraction of *Meloidogyne* spp. species and other nematodes from roots and soil. W: *Root-Knot Nematodes (Meloidogyne species) Systematics, Biology and Control* (Ed. Lamberti F & Taylor CE), pp. 317–329. Academic Press, London (Wielka Brytania).
- Daher S, Gillet S, Mugniéry D, Marzin H (1996) Discovery in France and characteristics of the Dutch variant of *Meloidogyne chitwoodi*. *Proceedings of the Third International Nematology Congress*, p. 188. Gosier (Gwadelupa).
- De Ley P, Blaxter M (2004). A new system for Nematoda: combining morphological characters with molecular trees, and translating clades into ranks and taxa. W: *Nematology Monographs and Perspectives*. (Ed. Cook R, Hunt DJ) pp 633-653, E.J. Brill. (Holandia).
- Esbenshade PR, Triantaphyllou AC (1985) Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* **17**, 6–20.
- Fourie H, Zijlstra C, McDonald AH (2001) Identification of root-knot nematode species occurring in South Africa using the SCAR-PCR technique. *Nematology* **3**, 675–689.
- Jepson SB (1987) *Identification of Root-Knot Nematodes (Meloidogyne spp.)*. CAB International, Wallingford (Wielka Brytania).

- Karssen G (1994) The use of isozyme phenotypes for the identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). W: *Annual Report 1992 Diagnostic Centre*, pp. 85–88. Plant Protection Service, Wageningen (Holandia).
- Karssen G (1995) Morphological and biochemical differentiation in *Meloidogyne chitwoodi* populations in the Netherlands. *Nematologica* **41**, 314–315.
- Karssen G (1996a) Description of *Meloidogyne fallax* n.sp., a root-knot nematode from the Netherlands. *Fundamental and Applied Nematology* **19**, 593–599.
- Karssen G (1996b) Differentiation between *Meloidogyne chitwoodi* and *Meloidogyne fallax*. *Annual Report 1995 Diagnostic Centre*, pp. 101–104. Plant Protection Service, Wageningen (Holandia).
- Karssen G (2002) *The Plant-Parasitic Nematode Genus Meloidogyne in Europe*. Brill Leiden, Köln (Niemcy).
- Karssen G, van Hoenselaar T, Verkerk-Bakker B, Janssen R (1995) Species identification of cyst and root-knot nematodes from potato by electrophoresis of individual females. *Electrophoresis* **16**, 105–109.
- Karssen G, Bolk RJ, van Aelst AC, van den Beld I, Kox, LFF, Korthals G, Molendijk L, Zijlstra C, van Hoof R, Cook R (2004) Description of *Meloidogyne minor* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode associated with yellow patch disease in golf courses. *Nematology* **6**, 59-72.
- Klerks MM, Zijlstra C, van Bruggen AHC (2004) Comparison of real-time PCR methods for detection of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 and quantification using a general internal amplification control. *Journal of Microbiological Methods* **59**, 337-349.
- Marshall JW, Zijlstra C, Knight KWL (2001) First record of *Meloidogyne fallax*. in New Zealand. *Australasian Plant Pathology* **30**, 283–284.
- Nobbs JM, Liu Q, Hartley D, Handoo Z, Williamson VM, Taylor S, Walker G, Curran J (2001) First record of *Meloidogyne fallax*. *Australasian Plant Pathology* **30**, 373.
- O'Bannon JH, Santo GS, Nyczepir AP (1982) Host range of the Columbia root-knot nematode. *Plant Disease* **66**, 1045–1048.
- OEPP/EPPO (2006) EPPO Standard PM 3/69 *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*: Sampling potato tubers for detection. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **36**, 421-422.
- Petersen DJ, Zijlstra C, Wishart J, Blok V, Vrain TC (1997) Specific probes efficiently distinguish root-knot nematode species using signature sequences in the ribosomal intragenic spacer. *Fundamental and Applied Nematology* **20**, 619-626.

- Peterson DJ, Vrain TC (1996) Rapid identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. hapla* and *M. fallax* using PCR primers to amplify their ribosomal intergenic spacer. *Fundamental and Applied Nematology* **19**, 601–605.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Santo GS, O'Bannon JH, Finley AM, Golden AM (1980) Occurrence and host range of a new root-knot nematode (*Meloidogyne chitwoodi*) in the Pacific Northwest. *Plant Disease* **64**, 951–952.
- Siddiqi MR (2000) *Tylenchida, Parasites of Plants and Insects*. CAB International, Wallingford (Wielka Brytania).
- Southey JF (1986) *Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes*. HMSO, London (Wielka Brytania).
- van der Beek JG, Karssen G (1997) Interspecific hybridization of meiotic parthenogenetic *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*. *Phytopathology* **87**, 1061–1066.
- van Meggelen JC, Karssen G, Janssen GJW, Verkerk-Bakker B, Janssen R (1994) A new race of *Meloidogyne chitwoodi* ? *Fundamental and Applied Nematology* **17** (1), 93-96.
- Viaene N, Mahieu T, de la Pena E (2007) Distribution of *Meloidogyne chitwoodi* in potato tubers and comparison of extraction methods. *Nematology* **9**, 143-150.
- Vrain TC, Wakarchuck DA, Lévesque AC, Hamilton RI (1992) Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. *Fundamental and Applied Nematology* **15**, 563-573.
- Wishart J, Phillips MS, Blok VC (2002) Ribosomal intergenic spacer: a polymerase chain reaction diagnostic for *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla*. *Phytopathology* **92**, 884–892.
- Zijlstra C (1997) A fast PCR assay to identify *Meloidogyne hapla*, *M. chitwoodi* and *M. fallax*, and to sensitively differentiate them from each other and from *M. incognita* in mixtures. *Fundamental and Applied Nematology* **20**, 505–511.
- Zijlstra C (2000) Identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla* based on SCAR-PCR: a powerful way of enabling reliable identification of populations or individuals that share common traits. *European Journal of Plant Pathology* **106**, 283–290.
- Zijlstra C, Lever AEM, Uenk BJ, van Silfhout CH (1995) Differences between ITS regions of isolates of root-knot nematodes *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. *Phytopathology* **85**, 1231–1237.
- Zijlstra C, van Hoof RA (2006) A multiplex real-time Polymerase Chain Reaction (Taqman) assay for the simultaneous detection of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*. *Phytopathology* **96** (11), 1255-1262.

Dodatek 1. Ekstrakcja ruchomych stadiów *Meloidogyne chitwoodi* i *M. fallax* z korzeni i gleby.

Ekstrakcja z tkanki roślinnej

Ekstrakcja z korzeni

Dojrzałe samice mogą być wydobyte z korzeni przy użyciu igieł preparacyjnych, lecz następnie powinny być one przechowywane w 0.9% roztworze NaCl w celu uniknięcia możliwości ich rozerwania w wyniku różnicy w ciśnieniu osmotycznym co nastąpiłoby w przypadku, gdyby były one umieszczone w zwykłej wodzie. Alternatywnie korzenie lub bulwy ziemniaka mogą być poddane trawieniu przy użyciu enzymów celulazy i pektynazy w celu pozyskania samic i innych stadiów rozwojowych nicieni (Araya i Caswell-Chen, 1993). Osobniki młodociane drugiego stadium i samce można wyizolować z korzeni roślin podejrzanych o porażenie przy użyciu metody inkubacji: korzenie zostają dokładnie umyte w celu usunięcia resztek przylegającej gleby i pocięte na małe kawałki (długości 2 – 10 cm). Kawałki te są umieszczone na wilgotnym filtrze znajdującym się w sicie ekstrakcyjnym. Sito wkłada się do płaskiego naczynia, gdzie znajduje się cienka warstwa wody, a tak przygotowany zestaw ekstrakcyjny umieszcza się na 14 dni w komorze do inkubacji, gdzie panuje temperatura 20 °C. Co 48 godzin należy wymieniać wodę w celu zapobieżenia pojawiania się procesów gnilnych zawiesiny i obumierania nicieni. W tym okresie czasu większość osobników młodocianych wylęgnie się z jaj, opuści tkankę roślinną i przez filtr przejdzie do wody. Woda z nicieniami zostanie przelana do szklanej szalki i poddana analizie przy użyciu mikroskopu stereoskopowego przy powiększeniu 25–35×.

Szybszą metodą ekstrakcji nicieni jest metoda maceracji, odwirowywania i flotacji, którą opracował Coolen (1979): korzenie są homogenizowane przy użyciu elektrycznego miksera przez 30 s przy 12600 obrotów min^{-1} . Zawiesina jest cedzona przez sito o średnicy oczek 1200 μm i przemywana. Woda pozostała po przemyciu zawiesiny, która przeszła przez sito, jest odwirowywana z dodatkiem 1% kaolinu w proszku przy 1500 g przez 4 min. Osad jest ponownie wprowadzany w formę zawiesiny w roztworach sacharozy, MgSO_4 lub ZnSO_4 (sacharoza 484 g l^{-1} ; gęstość 1,18 g/cm^3 ; MgSO_4 i ZnSO_4 , gęstość 1,16 g/cm^3) i odwirowywany przy 1500 g przez 4 min. Supernatant jest cedzony przez sito o średnicy oczek 20 μm . Nicienie mogą być spłukane z powierzchni sita i zebrane w szklanej szalce w celu analizy pod mikroskopem stereoskopowym, przy powiększeniu 25–35×. Nicienie mogą być wykryte także w wyniku enzymatycznego rozkładu tkanek roślinnych, lecz ta metoda jest stosunkowo kosztowna.

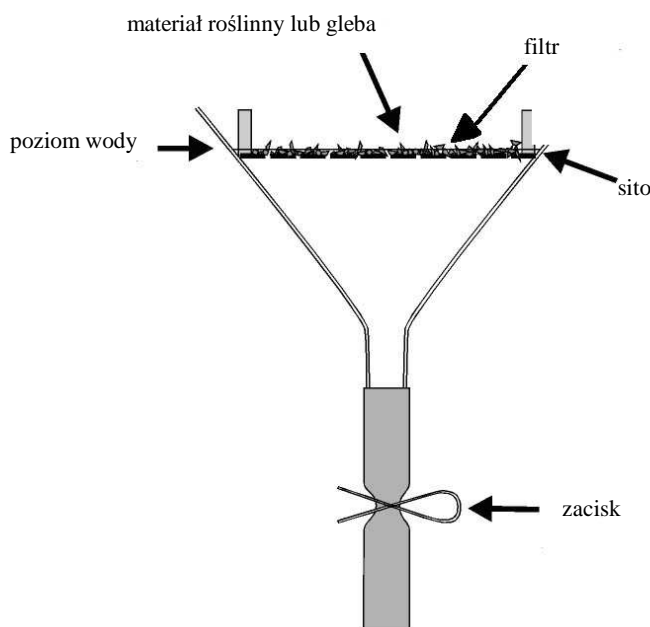
Ekstrakcja z bulw ziemniaka

Miksowanie tkanek roślinnych lub zewnętrznych warstw bulw ziemniaka (sięgających do wiązek naczyniowych) w mikserze, przy wysokich obrotach, przez 2 min, pozwala na wyekstrahowanie jaj, osobników młodocianych i samic. Z tkanek pozostałych po miksowaniu nicienie mogą być wydobyte przy użyciu sit lub metody flotacji z odwirowaniem (Viaene i in., 2007). Alternatywnie bulwy ziemniaka mogą być poddane rozkładowi przy użyciu enzymów celulazy i pektynazy w celu pozyskania samic i innych stadiów rozwojowych nicieni. (Araya i Caswell-Chen, 1993). Inne właściwe metody ekstrakcji ruchomych stadiów nicieni z tkanki roślinnej mogą także być użyte, należy jednak w takim przypadku uwzględnić czas niezbędny do dojrzewania jaj przed wyjściem z nich osobników młodocianych.

Ekstrakcja z gleby

W celu ekstrakcji samców i osobników młodocianych drugiego stadium z niewielkiej ilości gleby, należy umieścić cienką warstwę gleby (2–3 mm) na filtrze znajdującym się w sicie z nylonową siatką o dużych oczkach. Sito zostaje ostrożnie zanurzone w lejku Baermanna wypełnionym wodą (szklany lejek, na którego nóżce znajdują się wężyk z zaciskiem) tak, aby znajdująca się na nim gleba została nasiąknięta wodą w całości (ryc. 8). Po upływie 48 h nicienie, które opuściły glebę, przechodzą do nóżki lejka. Można je pozyskać poprzez spuszczenie niewielkiej ilości wody z nóżki lejka na szklaną szalkę. Obserwację pozyskanych nicieni prowadzi się pod mikroskopem stereoskopowym, przy powiększeniu 25–35x.

W przypadku konieczności analizy większych ilości gleby można użyć standardowych metod stosowanych podczas ekstrakcji z gleby nicieni aktywnych o długości 0.3–1.2 mm (Southey, 1986). Przykładowo do analizy na obecność nicieni próbki gleby o wadze 100 g można użyć następującej, prostej metody flotacji i przesiewania: próbka zostaje wprowadzona do wiadra z wodą o objętości 10 l. Cząstki gleby zostają zawieszane w wodzie w wyniku energicznego zamieszania przez 10 s, a następnie pozwala się na ich osiadanie przez 45 s. Supernatant jest cedzony przez zestaw 3 sit o średnicy oczek 50 μm . Materiał pozostały na sitach jest spłukiwany do zlewki, a następnie przelewany na sitko z nylonową siatką umieszczone w lejku Baermanna (tak, jak podano to powyżej, lecz bez użycia filtru). Po upływie 24 h nicienie mogą być zebrane przez spuszczenie niewielkiej ilości wody z nóżki lejka na szklaną szalkę. Zawartość szalki poddaje się analizie pod mikroskopem stereoskopowym, przy powiększeniu 25 –35x. Przy użyciu tej prostej metody można wyizolować nicienie celem ich identyfikacji, lecz jest ona mało wydajna, zważywszy na liczbę pozyskanych nicieni, w porównaniu z bardziej złożonymi metodami, jak metoda z zastosowaniem aparatu Oostenbrinka i aparatu Seinhorsta (Southey, 1986). Można także użyć metody podwójnego odwirowywania, którą opisał Coolen (1979) (odwirowywanie najpierw w wodzie, z dodatkiem kaolinu, a następnie w roztworze MgSO_4 , ZnSO_4 lub sacharozy).



Ryc. 8. Lejek Baermanna służący do ekstrakcji nicieni z korzeni lub gleby.

Dodatek 2. Elektroforeza izozymów w celu identyfikacji *Meloidogyne chitwoodi* i *M. fallax*.

1. Informacje ogólne

- 1.1 Kilka skutecznych metod elektroforezy izozymów można wykorzystać do identyfikacji pojedynczych osobników młodych, składających jaja samic nicieni z rodzaju *Meloidogyne*. Poniższa metoda została opracowana przez Esbenshade i Triantaphyllou (1985) i zmodyfikowana oraz przystosowana do przeprowadzenia z zastosowaniem elektroforezy typu PhastSystem, tj. przy użyciu automatycznego aparatu do przeprowadzania elektroforezy, tak jak opisał to Karssen i in. (1995). Zaleca się dokonanie analizy z wykorzystaniem dwóch żeli, co pozwala na jednoczesną identyfikację 24 samic. Metoda ta oparta jest na przeprowadzeniu elektroforezy na żelu poliakrylamidowym o określonym gradiencie, w przerywanym systemie buforowym.
- 1.2 Aparat do elektroforezy typu PhastSystem, gotowe żele i matryce do przygotowania próbki są wytwarzane przez Amersham Electrophoresis i sprzedawane przez GE Healthcare.

2. Próbki

- 2.1 Korzenie porażone przez guzaki umieszcza się w 0.9% roztworze NaCl, a młode samice guzaków, składające jaja, wyizolowuje się pod mikroskopem stereoskopowym i wprowadza do 0.9% roztworu NaCl znajdującego się w naczyniu umieszczonym na lodzie lub przechowuje w zamrażalniku, w maksymalnej temperaturze -20°C .
- 2.2 Przed elektroforezą samice przenosi się, w celu odsolenia, z roztworu NaCl na kilka minut do wody wysokiej jakości "reagent-grade water" znajdującej się w naczyniu umieszczonym na lodzie.

3. Przygotowanie próbek

- 3.1. Po odsoleniu samice umieszcza się po jednej sztuce w poszczególnych studzienkach matrycy do przygotowywania próbki.
- 3.2. W dwóch środkowych studzienkach umieszcza się po jednej samicy guzaka stanowiącej materiał odniesienia (najlepiej z gatunku *Meloidogyne javanica*).
- 3.3. Do każdej studzienki dodaje się 0.6 μl buforu ekstrakcyjnego (20% sacharozy, 2% Triton X-100 i 0.01% Bromophenol Blue).
- 3.4. Samice są starannie macerowane przy użyciu szklanej pałeczki, a zmacerowany materiał zostaje umieszczony w dwóch aplikatorach próby 12/03 (0,3 μl /studzienka).
- 3.5. Aplikatory umieścić w wycięciach odpowiednio lewej i prawej ramki do aplikatorów.

4. Elektroforeza

- 4.1. Przed przeprowadzeniem elektroforezy dwa żele "PhastGel" o gradiencie 8-25 umieszcza się na płytach do elektroforezy, które uprzednio ochłodzono do temperatury 10°C .

4.2. Podczas elektroforezy realizowany jest następujący program⁵:

Sample appl. Down at step 3.2 0Vh.

Sample appl. Up at step 3.3 0Vh.

Sep. 3.1 400V, 10 mA, 2.5 W, 10⁰C, 10 Vh.

Sep. 3.2 400V, 1 mA, 2.5 W, 10⁰C, 2 Vh.

Sep. 3.3 400V, 10 mA, 2.5 W, 10⁰C, 125 Vh.

4.3 Po umieszczeniu aplikatorów próby w aparacie można rozpocząć realizację programu.

4.4 Po zakończeniu elektroforezy żele umieszczane są w szalkach Petriego celem przeprowadzenia wybarwiania.

5. Wybarwianie

5.1. Jeden żel jest przeznaczony do wybarwiania w celu określenia ruchliwości esterazy (Est, EC 3.1.1.1), a drugi – ruchliwości dehydrogenazy jabłczanowej (Mdh, EC 1.1.1.37).

5.2. Roztwory stosowane podczas wybarwiania przygotować zgodnie z zaleceniami podanymi w tab. 2.

5.3. Roztwór do wybarwiania dodać do każdej szalki Petriego z żelem, którą następnie umieścić w inkubatorze, w temperaturze 37⁰C.

5.4. Całkowity czas wybarwiania wynosi 60 minut w przypadku esterazy i 5 minut w przypadku dehydrogenazy jabłczanowej.

Tabela 2. Roztwory do wybarwiania esterazy (Est) i dehydrogenazy jabłczanowej. (Mdh)

Esteraza	
0.1 M bufor fosforanowy, pH 7,3	100 ml
Fast Blue RR salt	0,06 g
EDTA	0,03 g
Octan α -naftyłu (rozpuszczony w 2 ml acetonu)	0,04 g
Dehydrogenaza jabłczanowa	
Beta-NAD	0,05 g
Nitro Blue Tetrazolium	0,03 g
Metosiarczan fenazyny	0,002 g
0.5 M Tris, pH 7,1	5 ml
Stock ¹	7,5 ml
Woda wysokiej jakości "Reagent-grade water"	70 ml

¹ 10,6 g Na₂CO₃ + 1,34 g kwasu L-jabłkowego w 100 ml wody.

⁵ Przedstawione zapisy pojawiają się w wyświetlaczu aparatu. Dlatego nie jest uzasadnione ich tłumaczenie na język polski.(przyp. tłum.).

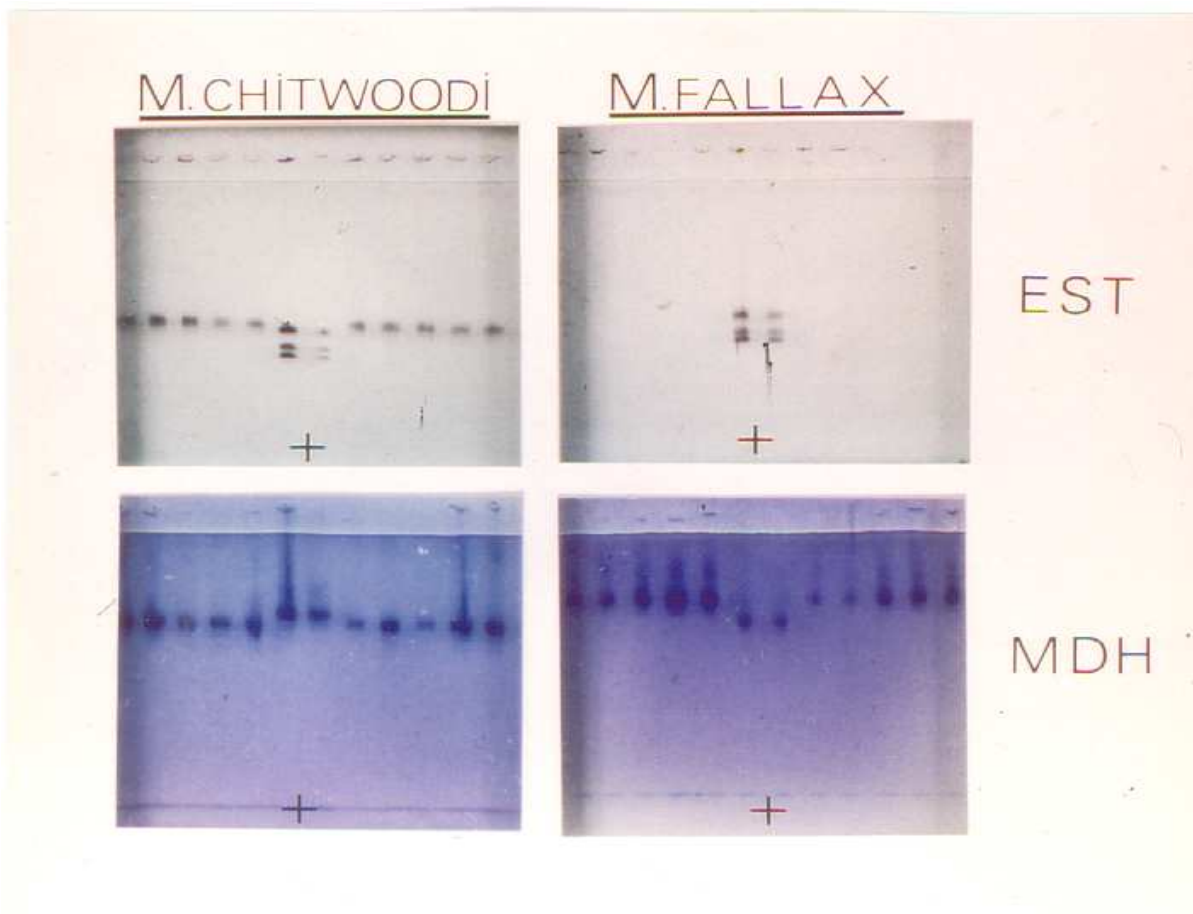
6. Wyniki

- 6.1. Uzyskany układ prążków należy porównać z przedstawionym na ryc. 9, lub zmierzyć ich względną ruchliwość (w %) i porównać z danymi znajdującymi się w tab. 3.
- 6.2. W przypadku gatunku *M. fallax* zwykle brak pasków esterazy, lecz w przypadku wydłużenia okresu barwienia (przez okres przekraczający 1 godzinę), pojawiają się trzy słabo widoczne paski.
- 6.3. Jak dotąd nie obserwowano odchylenia od rozkładu pasków dla *M. chitwoodi* i *M. fallax*. Jednak, gdy miałyby one miejsce, najlepiej porównać z danymi odnoszącymi się do izozymów, które podają Esbenshade i Triantaphyllou (1985).

Tabela 3. Względna ruchliwość (w %) dla esterazy (Est) i dehydrogenazy jabłczanowej (Mdh) wraz z oznaczeniem kodowym typu układu prążków.

Gatunek	Mdh	Est
<i>M. chitwoodi</i>	N1a 31,5	S1 51
<i>M. fallax</i>	N1b 20	F3 31, 40, 58*
<i>M. javanica</i>	N1 28	J3 54,5, 62, 65,5
<i>M. hapla</i>	H1 47,5	H1 57,5
<i>M. minor</i>	N1a 31,5	VS1 38

*Słabe prążki dla esterazy typu F3 pojawiają się dopiero po dłuższym wybarwianiu, lecz zwykle nie notuje się aktywności esterazy dla gatunku *M. fallax*.



Ryc. 9 Układ prążków esterazy (EST) i dehydrogenazy jabłczanowej (MDH) dla *M. chitwoodi* i *M. fallax*.

Dodatek 3. Test PCR do identyfikacji *M. chitwoodi* i *M. fallax* oparty na sekwencji wygenerowanej przez marker SCAR.

1. Informacje ogólne

- 1.1 Ten test opisała Zijlstra i in. (2000).
- 1.2 Nicienie (osobniki młodociane drugiego stadium, samice, jaja, samce) zostają wyekstrahowane z korzeni, bulw ziemniaka lub gleby, tak jak opisano to w Dodatku 2. Osobniki nicieni są pozyskiwane z wyekstrahowanego materiału i umieszczane w 50 µl sterylnej wody.
- 1.3 Regiony poddawane analizie wywodzą się z amplifikowanych regionów scharakteryzowanych przez sekwencję SCAR, specyficznych dla *M. chitwoodi* i *M. fallax*.
- 1.4 Specyficzny dla *M. chitwoodi* starter przedni Fc (5'-TGG AGA GCA GCA GGA GAA AGA - 3') i starter wsteczny Rc (5'-(GGT CTG AGT GAG GAC AAG AGT A ') przyczyniają się do uzyskania amplikonu o wielkości 800 par zasad (pz).
- 1.5 Specyficzny dla *M. fallax* starter przedni Ff (5'-CCA AAC TAT CGT AAT GCA TTA TT'-3') i starter wsteczny Rf (5'-'GGA CAC AGT AAT TCA TGA GCT AG -3') przyczyniają się do powstania amplikonu o wielkości 515 par zasad (pz).
- 1.6 Polimeraza Taq DNA 5 U ml⁻¹ (Roche) jest używana do amplifikacji.
- 1.7 Końcowe stężenie każdego z używanych nukleotydów wynosi 0,2 mM.
- 1.8 Bufory: bufor 1 x PCR zawierający 15 mM MgCl₂ wynosi 1,5mM.
- 1.9 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.
- 1.10 Amplifikacja jest przeprowadzona z zastosowaniem amplifikatora pracującego według technologii Peltiera, z płytą grzejącą np.PTC-200 (MJ-Research).

2. Metody

- 2.1 Ekstrakcja i oczyszczanie kwasu nukleinowego
 - 2.1.1. DNA można wyekstrahować z nicieni przy użyciu zestawu High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche), postępując zgodnie z protokołem opracowanym dla analizy tkanek ssaków. DNA zostaje wymyte przez 40 µl buforu wymywającego (10 mM TrisHCl, pH 8,5 [w 25°C]). Nie jest konieczne rozgniatanie nicieni przed rozpoczęciem izolacji DNA.
 - 2.1.2. Nie jest wymagane oczyszczanie DNA. Wyekstrahowane DNA może być od razu przeznaczone do użycia lub przechowywane przez noc w temperaturze 4°C, albo przez dłuższy okres czasu w temperaturze -20°C.
- 2.2. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)
 - 2.2.1. Mieszanina master mix (stężenie na 25 µl w przypadku pojedynczej reakcji):
 - 16,6 µl wody do testów molekularnych (Molecular Grade Water)
 - 2,5 µl 10 X buforu reakcyjnego zawierającego 15 mM MgCl₂, końcowe stężenie 1 X;
 - 1,5 mM MgCl₂
 - 0,5 µl dNTPs (10 mM każdy), końcowe stężenie 0.2 mM

0,6 µM każdego startera z poszczególnych par starterów

0,1 µl polimerazy Taq DNA (5 U µl⁻¹, Roche), końcowa ilość 0,5 jednostki

5 µl wyekstrahowanego DNA pozyskanego w sposób opisany powyżej.

2.2.2. Parametry reakcji PCR podczas testu na obecność *M. chitwoodi*:

94°C przez 2 min, 45 cykli w 94°C przez 30 s, 60°C przez 30 s, 72°C przez 1 min i końcowa elongacja w 72°C przez 10 min.

2.2.3. Parametry reakcji PCR podczas testu na obecność *M. fallax*:

94°C przez 2 min, 45 cykli w 94°C przez 30 s, 58°C przez 30 s, 72°C przez 1 min i końcowa elongacja w 72°C przez 10 min.

3. Istotne informacje nt. procedury

- 3.1. Fragmenty DNA są rozdzielane elektroforetycznie na żelu agarozowym i wizualizowane w świetle UV, zgodnie ze standardowymi procedurami (patrz Sambrook i in., 1989).
- 3.2. 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).

Dodatek 4. Test PCR do identyfikacji *Meloidogyne chitwoodi* i *M. fallax* oparty na IGS.

1. Informacje ogólne

- 1.1. Ten test opisał Wishart i in. (2002).
- 1.2. Nicienie (osobniki młodociane drugiego stadium, samice, jaja, samce) zostają wyekstrahowane z korzeni, bulw ziemniaka lub gleby, tak jak opisano to w Dodatku 2. Osobniki nicieni pozyskane z wyekstrahowanego materiału są umieszczone w 50 μ l sterylnej wody.
- 1.3. Test jest zaprojektowany dla sekwencji regionu międzygenowego (IGS) w rDNA u *Meloidogyne* spp. Produktem reakcji jest amplikon o wielkości 540 par zasad (pz) dla *M. chitwoodi* i 670 par zasad (pz) dla *M. fallax*.
- 1.4. Użyte oligonukleotydy: przedni starter JMV1 (5'- GGA TGG CGT GCT TTC AAC -3') hybrydujący w genie 5S oraz starter wsteczny JMV2 (5'- TTTCCCCTT ATG ATG TTT ACC C -3') hybrydujący w regionie IGS.
- 1.5. Polimeraza Taq DNA 5 U ml⁻¹ (Promega) jest używana do amplifikacji.
- 1.6. Końcowe stężenie każdego z używanych nukleotydów wynosi 2 mM.
- 1.7. Bufory: 5 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0 w 25°C), 1% Triton, 1,5 mM MgCl₂.
- 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 μ m) i wolna od nukleaz.
- 1.9. Amplifikacja jest przeprowadzona z zastosowaniem amplifikatora pracującego według technologii Peltiera z płytą grzejącą np. PTC-200 (MJ-Research).

2. Metody

- 2.1 Ekstrakcja i oczyszczanie kwasu nukleinowego
 - 2.1.1. DNA można wyekstrahować z nicieni (najlepiej w liczbie 5 lub więcej sztuk) przy użyciu zestawu High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche), postępując zgodnie z protokołem opracowanym dla ssaków. DNA zostaje wymyte przez 40 μ l buforu wymywającego (10 mM TrisHCl, pH 8,5 [w 25°C]). Nie jest konieczne rozgniatanie nicieni przed rozpoczęciem izolacji DNA.
 - 2.1.2. Nie jest wymagane oczyszczanie DNA. Wyekstrahowane DNA może być od razu przeznaczone do użycia lub przechowywane przez noc w temperaturze 4°C, albo przez dłuższy okres czasu w temperaturze -20°C.
- 2.2. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)
 - 2.2.1. Mieszanina master mix (stężenie na 25 μ l w przypadku pojedynczej reakcji):
 - 16,6 μ l wody do testów molekularnych (Molecular Grade Water)
 - bufor: 5 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0 w 25°C), 1% Triton, 1,5 mM MgCl₂
 - 2 mM każdego dNTP
 - 200 nM przedniego startera JMV1
 - 200 nM odwrotnego startera JMV2
 - 0,2 μ l polimerazy Taq DNA (5 U μ l⁻¹, Promega), końcowa ilość 1 jednostka
 - 5 μ l wyekstrahowanego DNA pozyskanego w sposób opisany powyżej.

2.2.2 . Parametry reakcji PCR.

35 cykli w 94°C przez 30 s, 55°C przez 30 s, 72°C przez 90 s i końcowa elongacja w 72°C przez 10 min.⁶

3. Istotne informacje nt. procedury

- 3.1. Fragmenty DNA są rozdzielane elektroforetycznie na żelu agarozowym i wizualizowane w świetle UV, zgodnie ze standardowymi procedurami (patrz Sambrook i in., 1989).
- 3.2. 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).

⁶ W oryginalnym tekście punkt ten nosi numer 2.2.4., co należy uznać za błąd (przyp. tłum.)

Dodatek 5. Test PCR-RFLP oparty na regionach rybosomalnych ITS, przeznaczony do identyfikacji *Meloidogyne chitwoodi* i *M. fallax*.

1. Informacje ogólne

- 1.1. Ten test opisała Zijlstra (1997).
- 1.2. Nicienie (osobniki młodociane drugiego stadium, samice, jaja, samce) zostają wyekstrahowane z korzeni, bulw ziemniaka lub gleby, tak jak opisano to w Dodatku 2. Osobniki nicieni są pozyskiwane z wyekstrahowanego materiału i umieszczone w 50 µl sterylnej wody.
- 1.3. Test odnosi się do regionu wewnętrznego przerywnika ulegającego transkrypcji (ITS) sekwencji rDNA dla *Meloidogyne* spp. przyczyniającego się do uzyskania amplikonu o wielkości 760 par zasad (pz) zarówno dla *M. chitwoodi* jak i *M. fallax*.
- 1.4. Użyte oligonukleotydy: uniwersalne startery specyficzne dla regionu ITS opisane przez Vrainia i in. (1993): przedni starter 18S (5' TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT -3')⁷ i starter wsteczny 26S (5' - TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG -3')⁷.
- 1.5. Polimeraza HotStart Taq DNA, 5 U ml⁻¹ (Qiagen) jest używana do amplifikacji.
- 1.6. Końcowe stężenie każdego z używanych nukleotydów wynosi 0,2 mM.
- 1.7. Bufory: 10 x bufor PCR zawierający 15 mM MgCl₂.
- 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.
- 1.9. Amplifikacja jest przeprowadzona z zastosowaniem amplifikatora typu Peltiera z płytą grzejącą np. PTC-200 (MJ-Research).

2. Metody

- 2.1 Ekstrakcja i oczyszczanie kwasu nukleinowego.
 - 2.1.1. DNA można wyekstrahować z nicieni (najlepiej w liczbie 5 lub więcej sztuk) przy użyciu zestawu High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche), postępując zgodnie z protokołem opracowanym dla ssaków. DNA zostaje wymyte przez 40 µl buforu wymywającego (10 mM TrisHCl, pH 8,5). Nie jest konieczne rozgniatanie nicieni przed rozpoczęciem izolacji DNA.
 - 2.1.2. Nie jest wymagane oczyszczanie DNA. Wyekstrahowane DNA może być od razu przeznaczone do użycia lub przechowywane przez noc w temperaturze 4°C, albo przez dłuższy okres czasu w temperaturze -20°C.
- 2.2. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)
 - 2.2.1. Mieszanina master mix (stężenie na 25 µl w przypadku pojedynczej reakcji):
 - 16,5 µl wody do testów molekularnych (Molecular Grade Water)
 - 2,5 µl 10 X buforu reakcyjnego (Qiagen), zawierającego 15 mM MgCl₂, końcowe stężenie 1 X; 1,5 mM MgCl₂
 - 0,5 µl dNTP (10 mM każdy), końcowe stężenie 0,2 mM

⁷ W różnych publikacjach startery 18S i 26S określane są też jako odpowiednio 5367 i 5368.

0,15 µl przedniego starteru 5367 (100 µM), końcowe stężenie 0,6 µM
 0,15 µl starteru odwrotnego 5368 (100 µM), końcowe stężenie 0,6 µM.
 0,2 µl polimerazy HotStar Taq DNA Polymerase (Qiagen, 5 U µl⁻¹), końcowa ilość 1 jednostka
 5,0 µl wyekstrahowanego DNA pozyskanego w sposób opisany powyżej.

2.2.2. Parametry reakcji PCR.

94°C przez 15 min, 45 cykli w 94°C przez 15 s, 58°C przez 30 s, 72°C przez 1 min i końcowa elongacja w 72°C przez 10 min.

2.3. Restrykcja amplikonu PCR

2.3.1. Mieszanina restrykcyjna (stężenie w przeliczeniu na 10 µl w przypadku pojedynczej reakcji)

3,5 µl ody do testów molekularnych (Molecular Grade Water)

10 µl 10 X buforu restrykcyjnego (Promega)

0,5 µl enzymu restrykcyjnego RsaI (10 U µl⁻¹; Promega)

5 µl amplikonu PCR

2.3.2. Czas inkubacji i temperatura trawienia.

Jedna godzina w 37°C.

2.3.3. Jeśli jest to konieczne, produkty przed analizą należy przechowywać w temperaturze 4°C.

3. Istotne informacje nt. procedury

3.1. 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.

Układ pasków produktów reakcji restrykcyjnej dla *M. hapla*, *M. chitwoodi* i *M. fallax* przy enzymów restrykcyjnych DraI i RsaI (Zijlstra i in. 1995) są przedstawione w tab. 4.

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. Ta metoda może być użyta tylko w odniesieniu do nicieni zidentyfikowanych na podstawie budowy morfologicznej jako *Meloidogyne* sp., gdyż startery nie są specyficzne dla *Meloidogyne* spp.

Tabela 4. Układ pasków produktów reakcji restrykcyjnej dla *M. hapla*, *M. chitwoodi* i *M. fallax*, przy użyciu enzymów restrykcyjnych DraI i RsaI (Zijlstra i in., 1995)

	<i>M. hapla</i>	<i>M. chitwoodi</i>	<i>M. fallax</i>
DraI	360, 380	660, 100	650, 110
RsaI	620, 140	760	630, 130

Dodatek 6. Test real-time PCR (Taqman) RFLP oparty na regionach rybosomalnych ITS do identyfikacji *Meloidogyne chitwoodi* i *M. fallax*, dyskutowany przez ekspertów holenderskich i francuskich.

1. Informacje ogólne

- 1.1. Ten test opisali Zijlstra i van Hoof (2006).
- 1.2. Nicienie (osobniki młodociane drugiego stadium, samice, jaja, samce) zostają wyekstrahowane z korzeni, bulw ziemniaka lub gleby, tak jak opisano to w Dodatku 2. Osobniki nicieni są pozyskiwane z wyekstrahowanego materiału i umieszczone w 50 µl sterylnej wody.
- 1.3. Test odnosi się do regionu wewnętrznego przerywnika ulegającego transkrypcji 2 (ITS) sekwencji rDNA dla *Meloidogyne* spp. przyczyniającego się do uzyskania ampliconu o wielkości 75 par zasad (pz).
- 1.4. Użyte oligonukleotydy: przedni starter FC612ITS (5'-TGT ATA CTT TAT AAT TTTTCT GTT TTG-3'); wsteczny starter RcFTAQ (5'-AAA AAA TAA AGC ATA TTTGATACA A-3'); specyficzna dla *M. chitwoodi* sonda MGB Taqman pMcFAM (5'-TGC AAT TTT ATT GAA TAA-3'), producent FAM; specyficzna dla *M. fallax* sonda MGB Taqman pMfVIC (5'-TAC AAT TTG TTG AAT AAT-3'), producent VIC.
- 1.5. Mieszanki do reakcji PCR są przygotowywane z użyciem zestawu qPCR Core kit (Eurogentec).
- 1.6. Polimeraza HotGoldStar DNA (5 U ml⁻¹; Eurogentec) jest używana do amplifikacji.
- 1.7. Bufor: 10 x bufor reakcyjny zawierający barwnik pasywny ROX (Eurogentec).
- 1.8. Końcowe stężenie używanych nukleotydów (Eurogentec) wynosi 200 µM.
- 1.9. Końcowe stężenie używanego MgCl₂ wynosi 5,0 mM.
- 1.10. 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.
- 1.11. Amplifikacja jest przeprowadzona z zastosowaniem amplifikatora do real-time PCR np. systemu wykrywającego sekwencję ABI 7900 lub 7700 (Applied Biosystems).

2. Metody

- 2.1 Ekstrakcja i oczyszczanie kwasu nukleinowego
 - 2.1.1. DNA można wyekstrahować z nicieni (najlepiej w liczbie 5 lub więcej sztuk) przy użyciu zestawu High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche), postępując zgodnie z protokołem opracowanym dla ssaków. DNA zostaje wymyte przez 40 µl buforu wymywającego (10 mM TrisHCl, pH 8,5). Nie jest konieczne rozgniatanie nicieni przed rozpoczęciem izolacji DNA.
 - 2.1.2. DNA można wyizolować z obierek ziemniaka przy użyciu zestawu do izolacji dna z tkanki roślinnej (Plant DNA isolation kit) firmy BioNobile lub systemu do oczyszczania DNA wyizolowanego z żywności (Wizard Magnetic DNA purification System for food) firmy Promega.. DNA zostaje wymyte przy użyciu 50 µl buforu wymywającego. Tkanka ziemniaka może być rozerwana poprzez wysuszenie w niskiej temperaturze lub w sposób mechaniczny (np. z użyciem urządzenia Grindomix MM-200, Retsch).

2.1.3. Nie jest wymagane oczyszczanie DNA. Wyekstrahowane DNA może być od razu przeznaczone do użycia lub przechowywane przez noc w temperaturze 4°C, albo przez dłuższy okres czasu w temperaturze -20°C.

2.2. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)

2.2.1. Mieszanina master mix (stężenie na 30 µl w przypadku pojedynczej reakcji):

17,9 µl wody do testów molekularnych (Molecular Grade Water)

3,0 µl 10 X buforu reakcyjnego (Eurogentec), końcowe stężenie 1 X

3,0 µl 50 mM MgCl₂, końcowe stężenie 5,0 µM

1,2 µl dNTP (5 mM każdy), końcowe stężenie 200 nM

0,9 µl przedniego startera FC612ITS (10 µM), końcowe stężenie 300 nM

0,9 µl startera odwrotnego RcFTAQ (10 µM), końcowe stężenie 300 nM

0,45 µl sondy pMcFAM (10 µM), końcowe stężenie 150 nM

0,45 µl sondy pMfVIC (10 µM), końcowe stężenie 150 nM

0,2 µl polimerazy HotStarGold DNA (Eurogentec, 5 U µL⁻¹), 1 jednostka

2,0 µl wyekstrahowanego DNA pozyskanego w sposób opisany powyżej

2.2.2. Parametry reakcji PCR.

95°C przez 10 min, 40 cykli w 95°C przez 15 s i 56°C przez 1 min.

2.2.3. Wartość progowa cyklu (Ct) wynosząca < 40, w przypadku, gdy użyto sondę pMcFAM albo pMfVIC wskazuje odpowiednio na obecność *M. chitwoodi* lub *M. fallax*.

3. Istotne informacje nt. procedury

3.1. 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).

3.2. W celu dokonania sprawdzenia na obecność wystąpienia reakcji fałszywie negatywnej, spowodowanej przez zahamowanie reakcji amplifikacji, do każdej mieszaniny reakcyjnej można dodać Wewnętrzną Kontrolę Amplifikacji (Internal Amplification Control, IAC; 10 fg), 150 nM przedniego startera IAC FPgfp (5'-TGG CCC TGT CCT TTT ACC AG-3'), 150 nM startera odwrotnego IAC RPgfp (5'-TTT TCG TTG GGA TCT TTC GAA-3'), 150 nM sondy IAC MGB TaqMan pIAC (5'-ACA CAA TCT GCC), producent NED i substancję hamującą barwienie Eclipse Dark Quencher (Klerks i in., 2004). IAC jest fluoryzującą na zielono białkową strukturą plazmidu. Można ją otrzymać od Dr. C. Zijlstra, Plant Research International, Wageningen, Holandia.

3.3. Ta metoda była użyta do analiz nicieni, ale może być także stosowana bezpośrednio w odniesieniu do bulw ziemniaka, cebul krokusa i cebul irysa.

Dodatek 7. Test real-time PCR SYBR-green w celu wykrycia *M. chitwoodi* i *M. fallax* oparty na sekwencjach rDNA (LSU).

1. Informacje ogólne

- 1.1 Ten protokół został opracowany przez firmę Blgg bv. i Laboratorium Nematologii (Uniwersytet w Wageningen, Holandia). Opracowanie specyficznych dla gatunku starterów LSU rDNA było efektem przeprowadzania przez Holtermana i in. (2006). badań filogenetycznych w obrębie typu Nematoda (opartych na SSU rDNA). Sekwencje starterów dla nicieni z rodzaju *Meloidogyne* były zestawione (porównane) z 400 sekwencjami dla nicieni znajdującymi się w bazie danych sekwencji LSU rDNA, wliczając w to 77 sekwencji rDNA dla 24 różnych gatunków z rodzaju *Meloidogyne*. Startery dla *M. chitwoodi* i *M. fallax* odpowiadają tylko sekwencjom LSU rDNA odpowiednio dla *M. chitwoodi* i *M. fallax*.
- 1.2 Określenie czułości analitycznej i specyficzności analitycznej przeprowadzono przy użyciu systemu wykrywającego w analizie real time PCR - Biorad MyiQ. Specyficzność analityczna zestawu starterów odnoszących się do *M. chitwoodi* i *M. fallax*. była testowana z użyciem plazmidowego DNA i genomowego DNA odpowiednio dla *M. chitwoodi* i *M. fallax*, a oprócz tego dla *M. hapla*, *M. minor* i *M. naasi*. Nie stwierdzono wyników fałszywie pozytywnych dla wymienionych gatunków. Wykrycie organizmu będącego przedmiotem analizy ma miejsce, gdy wartość progowa cyklu (Ct) różni się przynajmniej o 15 cykli w porównaniu z organizmem nie będącym przedmiotem analizy. Pozwala to na wykrycie jednego osobnika nicienia w mieszaninie przynajmniej 10000 osobników z blisko spokrewnionych gatunków nie będących organizmami podlegającymi analizie. Testowi może być poddany ekstrakt DNA wyizolowany z pojedynczego nicienia lub ekstrakt DNA wyizolowany z całej grupy nicieni. Wartość czułości analitycznej (próg wykrywalności) wynosi jeden osobnik młodociany lub jajo. Alternatywnie, startery mogą być użyte do przeprowadzenia konwencjonalnego testu PCR.

2. Metody

- 2.1 Zestaw wykrywający LSU (28S) zawiera startery przeznaczone do użycia podczas testu (real-time) PCR dla *M. chitwoodi* i *M. fallax*.

3. Istotne informacje nt. procedury

- 3.1. 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).
- 3.2. Więcej informacji, dane na temat zestawów starterów i informacje kontaktowe można uzyskać od firmy Blgg bv z Holandiii (wchodząc na stronę <http://www.blgg.nl>).

Tłumaczenie z jęz. angielskiego:	Sprawdził:	Zatwierdził:
Witold Karnkowski (GIORiN CL)	Tomasz Konefał (GIORiN CL)	Janina Butrymowicz (GIORiN CL)
01.10.2012	10.12.2012	