

## Diagnostyka Diagnostic

### *Bursaphelenchus xylophilus*

#### Zakres

Niniejszy standard opisuje protokół diagnostyczny dotyczący *Bursaphelenchus xylophilus*<sup>1</sup>.

#### Zatwierdzenie i nowelizacja

Zatwierdzony po raz pierwszy we wrześniu 2000 r. Zrewidowana wersja zatwierdzona we wrześniu 2009.

#### Wprowadzenie

Węgorek sosnowiec (*Bursaphelenchus xylophilus*) jest organizmem szkodliwym znajdującym się na liście A1 agrofagów kwarantannowych EPPO. Nicień ten pochodzi z Ameryki Północnej (Kanada, USA, Meksyk (niepotwierdzone)) i uważa się, że został on zawleczony do Japonii na początku XX wieku wraz z drewnem eksportowanym do tego kraju. W Japonii wywołuje on masowe zamieranie rodzimych gatunków sosny (*Pinus densiflora*, *P. thunbergii*, *P. luchuensis*) i jest tam numerem jeden wśród szkodników drzew leśnych. Rozprzestrzenił się on także do Chin, Korei, Portugalii i Tajwanu. Ostatnimi laty stwierdza się także przyczynianie się przez ten gatunek do zamierania sosen na terenie USA, lecz dotyczy to tylko gatunków egzotycznych obcego pochodzenia, wliczając w to sosnę pospolitą, *P. sylvestris*, w cieplejszych, południowych regionach kraju. Pomimo ograniczonego występowania choroby wędnięcia sosny w Ameryce Północnej, *B. xylophilus* jest szeroko rozprzestrzeniony w nasadzeniach rodzimych gatunków drzew iglastych. W 1999 r.

*B. xylophilus* został stwierdzony w Portugalii na *P. pinaster*. W 2008 r. wykryto jego obecność w jednym drzewie w Hiszpanii, około 80 km od granicy z Portugalią.

*Pinus* spp. są najbardziej podatnymi na porażenie przez nicienia gatunkami drzew, drzewa z rodzajów *Abies*, *Chamaecyparis*, *Cedrus*, *Larix*, *Picea* i *Pseudotsuga* są także właściwymi żywicielami nicienia w saprofitycznej części jego cyklu życiowego.

W warunkach naturalnych *B. xylophilus* jest przenoszony z drzewa na drzewo w wyniku aktywności chrząszczy kózkowatych z rodzaju *Monochamus* (żerdzianka) (Coleoptera: Cerambycidae), które zasiedlają drewno. Nicienie mogą być przenoszone na gałęzie żywych drzew przez dorosłe chrząszcze (żer uzupełniający chrząszczy obu płci) lub, w zależności od gatunku chrząszcza z rodzaju *Monochamus*, na pnie lub większe gałęzie, wliczając w to odpady drzewne lub

<sup>1</sup> 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.

materiał pozostały po ścinie, względnie osłabione albo świeżo obumarłe drzewa, podczas składania jaj przez samice. Przeniesienie *B. xylophilus* na żywe drzewo podczas żeru uzupełniającego chrząszczy może w konsekwencji doprowadzić do pojawienia się na tym drzewie objawów choroby wędnięcia sosny, lecz tylko na podatnych gatunkach z rodzaju *Pinus* i przy wystąpieniu właściwych warunków klimatycznych i glebowych. Jakkolwiek przeniesienie *B. xylophilus* podczas żeru uzupełniającego na *Pinus* i drzewach z innych rodzajów może doprowadzać do powstawania objawów wędnięcia. Natomiast przeniesienie nicieni podczas składania jaj przez żerdzianki może mieć miejsce w przypadku większości, jeśli nie wszystkich, gatunków żywicielskich, o ile drzewa są osłabione, obumierają z jakichkolwiek przyczyn, lub niedawno obumarły i tym samym stają się odpowiednim miejscem do składania jaj przez chrząszcze z rodzaju *Monochamus*. Nicienie mogą być przenoszone podczas składania jaj przez chrząszcze na materiale takim jak drewno lub odpady pozostałe po ścinie drzew. Jedynym znanym wyjątkiem jest *Thuja plicata*, uznana za odporną na porażenie przez *Monochamus* spp., a tym samym na przeniknięcie nicieni. Tak więc, *B. xylophilus* można znaleźć w drewnie roślin *Pinus* spp. wykazujących objawy choroby wędnięcia powstałe w wyniku przeniknięcia *B. xylophilus*, lub w drewnie jakichkolwiek drzew iglastych (za wyjątkiem *T. plicata*), które są osłabione w wystarczającym stopniu, aby samice *Monochamus* spp. mogły składać na nie jaja i przenosić osobniki nicienia, które następnie rozwijają się na żywicielu jako organizmy saprofityczne. Nicienie mogą bardzo łatwo być przenoszone podczas obrotu handlowego, zarówno wraz z towarami (żywymi roślinami, drewnem okrągłym, drewnem przetartym, itp.) jak i drewnianymi materiałami opakowaniowymi towarzyszącymi różnym przewożonym towarom, oprócz drewnianych materiałów opakowaniowych spełniających wymagania Międzynarodowego Standardu dla Środków Fitosanitarnych (ISPM) nr 15 "Przepisy dotyczące drewnianych materiałów opakowaniowych w handlu międzynarodowym" (FAO, Rzym, wersja poprawiona, 2009). Więcej informacji na temat biologii, rozmieszczenia geograficznego i znaczenia gospodarczego nicienia podaje EPPO/CABI (1997).

## Tożsamość

**Nazwa:** *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner, 1934) Nickle, 1970

**Synonimy:** *Aphelenchoides xylophilus* Steiner et Buhner, 1934

*Bursaphelenchus lignicolus* Mamiya et Kiyohara, 1972

**Stanowisko taksonomiczne:** Nematoda, Rhabditida, Tylenchina, Aphelenchoidea, Aphelenchoididae, Parasitaphelenchinae.

**Komputerowy kod EPPO:** BURSXY

**Kategoria fitosanitarna:** lista A1 EPPO: nr. 158, 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/A1

## Wykrywanie

*B. xylophilus* może występować w następującym materiale z gatunków iglastych: roślinach do szadzenia, ciętych gałęziach, drewnie, oddzielonej korze, ścinkach drzewnych, lecz nie w szpilkach, szyszkach lub nasionach. Objawy porażenia przez nicienia nie są specyficzne, stąd należy pobierać próbki z importowanego drewna i drzewostanów iglastych. Wytyczne na temat pobierania próbek są podane w Załączniku 3 Procedury PM 9/1 na temat urzędowej kontroli występowania *Bursaphelenchus xylophilus* i jego wektorów. *B. xylophilus* może być stwierdzony także w dorosłych chrząszczach żerdzianek (*Monochamus* spp).

## Ekstrakcja z drewna

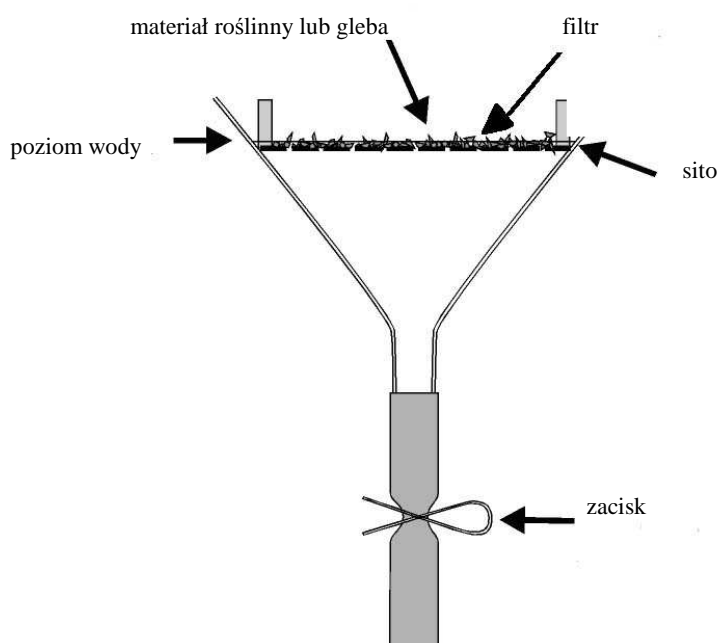
Próbki drewna powinny być inkubowane w temperaturze 25 °C przez przynajmniej 14 dni w celu umożliwienia namnożenia się jakichkolwiek nicieni znajdujących się w próbce i zwiększenia prawdopodobieństwa ich wykrycia.

Żywe nicienie mogą być wyekstrahowane z drewna przy użyciu metody Baermanna (patrz ryc. 1) polegającej na zanurzeniu niewielkich jego kawałków w wodzie na 48 godzin. Nicienie przechodzą z rozdrobnionego drewna do wody i gromadzą się w nóżce lejka zamkniętej zaciskiem.

Nicienie mogą być przeniesione, pod mikroskopem stereoskopowym, przy użyciu pipety lub igły, z niewielkiej szalki Petriego na szkiełko mikroskopowe podstawowe, w celu dalszych analiz pod mikroskopem świetlnym. Nicienie mogą być wyekstrahowane również przy użyciu urządzenia nawilżającego “mistifier” (Southey, 1986).

## Ekstrakcja z wektorów owadzych

Osobniki młodociane czwartego stadium mogą być wyizolowane z osobników wektorów owadzych nicienia. Analizowane owady należy pociąć na kawałki i poddać analizie przy użyciu metody Baermanna. W celu przeprowadzenia identyfikacji nicieni metodą morfologiczno-metryczną, osobniki zgromadzone w nóżce lejka należy umieścić na grzybni *Botrytis cinerea*, gdzie nastąpi ich wylinka do stadium dorosłego i namnożenie się. Szybciej można uzyskać wynik identyfikacji przy użyciu metod molekularnych, gdyż do analiz można przeznaczyć nicienie bezpośrednio po ekstrakcji.



Ryc. 1. Lejek Baermanna służący do ekstrakcji nicieni z materiału roślinnego lub gleby.

## Identyfikacja

### Identyfikacja postaci w oparciu o budowę morfologiczną

Identyfikacja *B. xylophilus* jest oparta na analizie cech morfologicznych osobników dorosłych. Analiza wymaga wykonania preparatów mikroskopowych dobrej jakości, dostępu do

silnie powiększającego mikroskopu oraz znacznego doświadczenia w zakresie taksonomii nicieni, zwłaszcza w odniesieniu do niewielkiej grupy gatunków blisko spokrewnionych z *B. xylophilus*.

W próbkach drewna można spotkać wiele różnych nicieni, zwłaszcza gdy rozpoczął się proces rozkładu tkanek. Niektóre spośród tych nicieni będą saprofitami, które nie posiadają silnie rozwiniętego sztyletu typowego dla nicieni z rzędu Tylenchida, podczas gdy inne w większości będą gatunkami z rzędu Aphelenchida, u których grzbietowy gruczoł przełyku otwiera się do środkowego rozszerzenia przełyku (w odróżnieniu od nicieni z rzędu Tylenchida u których grzbietowy gruczoł przełyku otwiera się do światła przełyku poza guzikami sztyletu). Osobniki dorosłe nicieni z rodzaju

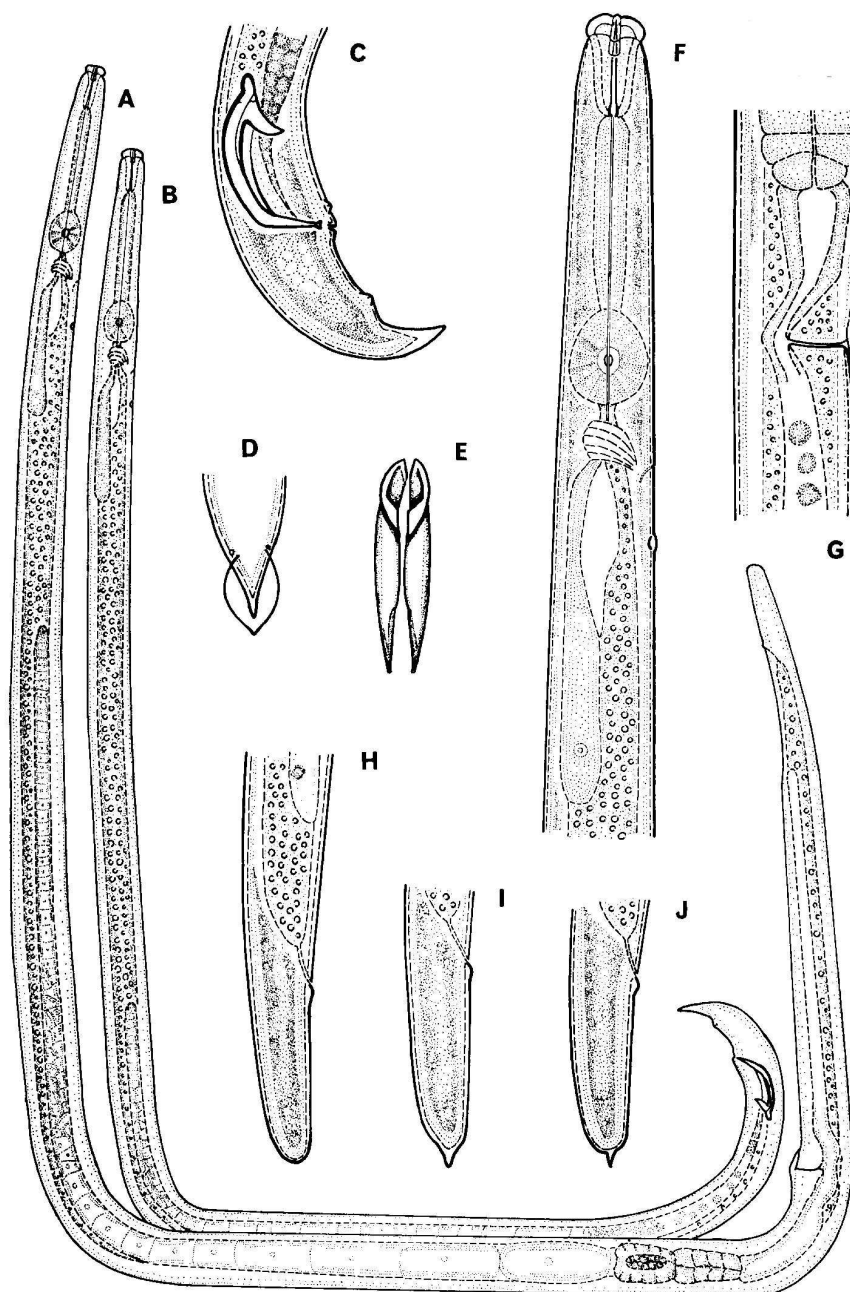
*Bursaphelenchus* mogą być odróżnione od innych nicieni przy użyciu klucza zamieszczonego w tabeli 1.

Tabela 1 Identyfikacja do rodzaju *Bursaphelenchus* nicieni wyizolowanych z drewna i kory (NBS: gatunek nie należący do rodzaju *Bursaphelenchus*)

1.	Sztylet o budowie typowej dla rzędu Tylenchida, występuje środkowe rozszerzenie przełyku.	2	
	Sztylet o budowie typowej dla rzędu Dorylaimida, brak środkowego rozszerzenia przełyku.		NBS
2	Środkowe rozszerzenie przełyku posiada zastawkę.	3	
	Środkowe rozszerzenie przełyku nie posiada zastawki.		NBS
3	Występuje pojedyncza gonada, a wulwa jest przesunięta ku tyłowi ciała.	4	
	Występują dwie gonady, a wulwa jest umieszczona przyśrodkowo.		NBS
4	Środkowe rozszerzenie przełyku jest silnie rozwinięte i dobrze widoczne pod małym powiększeniem mikroskopu, zwłaszcza u osobników utrwalonych, kształtu od owalnego poprzez okrągły do prostokątnego; obserwując nicienie z boku nie stwierdza się obecności ujścia grzbietowego gruczołu przełyku ani brzuszno- wygięcia światła przełyku za guzikami sztyletu.	5	
	Środkowe rozszerzenie przełyku jest mniejsze, kształtu od wrzecionowatego do okrągłego; obserwując nicienie z boku stwierdza się obecność ujścia grzbietowego gruczołu przełyku i brzuszno- wygięcia światła przełyku za guzikami sztyletu.		NBS
5	Gruczoły przełyku obejmują jelito po stronie grzbietowej.	6	
	Gruczoły przełyku są oddzielone od jelita.		NBS
6	Guziki sztyletu występują (mogą one być niewielkie).	7	
	Guziki sztyletu nie występują.		NBS
7	Na ogonie samca znajduje się torebka kopulacyjna (najlepiej jest ona widoczna po ułożeniu samca w pozycji grzbietowo- brzusznej, na można je zauważyć nawet pod mikroskopem stereoskopowym).	8	
	Torebka kopulacyjna nie występuje.		NBS
8	Odległość wulwy od przedniego końca ciała wynosi 70-80% długości ciała; ogon samca silnie wygięty na końcu		<i>Bursaphelenchus</i>
	Odległość wulwy od przedniego końca ciała wynosi 85-90% długości ciała; ogon samca nie jest silnie wygięty na końcu		NBS

NBS: gatunek nie należący do rodzaju *Bursaphelenchus*

Wiele gatunków z rodzaju *Bursaphelenchus* zasiedlających drewno rozwija się na produktach przemiany materii grzybów lub grzybach występujących na odchodach owadów żerujących w drewnie, takich jak chrząszcze kornikowate i kózkowate. W obrębie rodzaju *Bursaphelenchus* wydzielono kilka grup gatunków. Gatunki należące do grupy “*xylophilus*” charakteryzują się posiadaniem czterech linii bocznych, obecnością przedniej wargi wulwalnej u samic oraz dużych, wyraźnie łukowatych spikul u samców (rys. 2C) oraz posiadaniem na ogonie siedmiu brodawk kudalnych (najłatwiej można je zauważyć przy użyciu mikroskopu elektronowego skaningowego) (Braasch 2008). *B. xylophilus* można odróżnić od innych gatunków z grupy “*xylophilus*” przy użyciu klucza zamieszczonego w tabeli 2.



Ryc. 2. *Bursaphelenchus xylophilus* n.sp. (wg Mamiya i Kiyohara, 1972). (A) samica; (B) samiec; (C) ogon samca; (D) ogon samca od strony brzusznej z widoczną torebką kopulacyjną; (E) widok spikul samca od strony brzusznej; (F) przednia część ciała samicy; (G) samica – okolice wulwy; (H-J) ogon samicy.

Cechy zamieszczone w tabeli 2 są typowe i będzie można zaobserwować je w większości przypadków. Gdy cechy te występują identyfikacja *B. xylophilus* na podstawie budowy morfologicznej jest możliwa i powinna być łatwa. Jakkolwiek, obserwuje się pewną zmienność morfologiczną między populacjami. W przypadku jakichkolwiek wątpliwości w odniesieniu do powyższych kryteriów (kształtu ogona samic, umiejscowienia otworka wydalniczego, itp.) zaleca się przeprowadzenie testów molekularnych (patrz poniżej).

Tabela 2. Krótki klucz do identyfikacji *B. xylophilus* w obrębie grupy “*xylophilus*”.

1	Ogon samicy stożkowaty i zwężający się ku tyłowi zakończony mukronem lub bez mukrona. Ogon samicy walcowaty (ryc. 3E).	Gatunek inny niż <i>B. xylophilus</i> 2
2	Ogon samicy walcowaty, zaokrąglony na końcu, bez mukrona (ryc. 3E). Ogon samicy walcowaty, zakończony mukronem (ryc. 3 F).	<i>B. xylophilus</i> 3
3	Otworek wydalniczy na wysokości środkowego rozszerzenia przełyku lub przed nim. Otworek wydalniczy poza środkowym rozszerzeniem przełyku (ryc.3 B).	Gatunek inny niż <i>B. xylophilus</i> <i>B. xylophilus</i> forma z mukronem (rzadka)

*Uwaga:* Niniejszy klucz pozwala tylko na identyfikację *B. xylophilus*, natomiast klucz do identyfikacji innych gatunków znajduje się w pracy Ryssa i in., (2005).

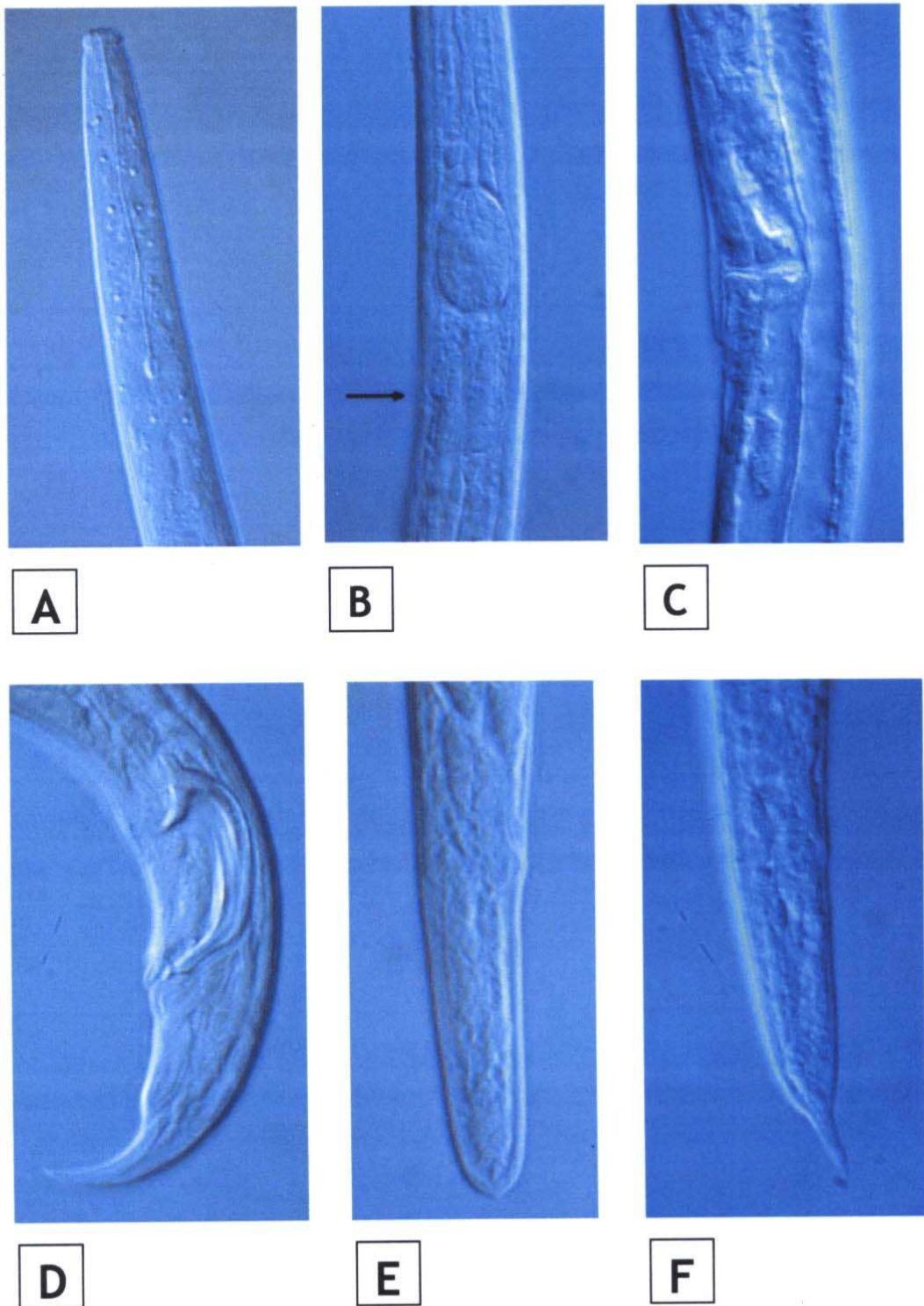
## Morfologia

*B. xylophilus* posiada generalne cechy morfologiczne rodzaju *Bursaphelenchus* (Nickle, 1970, Hunt, 1993): są to nicienie od małych do dużych, o wydłużonym ciele; głowa jest wysoka i wyraźnie oddzielona bruzdką od reszty ciała, z sześcioma wargami; sztylet dobrze rozwinięty, zwykle z niewielkimi zgrubieniami u nasady (ryc. 2 F, ryc.3 A); środkowe rozszerzenie przełyku dobrze rozwinięte (ryc. 2 F, ryc. 3 A, B).

Samica: wulwa przykryta wyraźnie rozwiniętą przednią wargą wulwalną (przykrycie wulwy) (rys. 2 G, ryc. 3 C); odległość wulwy od przodu ciała wynosi 70-80% długości ciała, długość woreczka zapochwowego jest 3 – 6 razy większa od szerokości ciała; ogon samicy walcowaty, u większości populacji szeroko zaokrąglony na końcu (ryc. 2 H, ryc. 3 E), lecz na jego końcu niekiedy może znajdować się niewielki, brodawkowaty wyrostek (ryc. 2 I-J) lub krótki mukron (forma z mukronem). Forma z mukronem występuje rzadko zarówno w Ameryce Północnej jak i na innych obszarach występowania nicienia.

Samiec: ogon silnie wygięty na stronę brzuszną, zaostrowany na końcu (ryc.3 D); na końcu ogona znajduje się niewielka torebka kopulacyjna, którą najłatwiej zauważyć w pozycji grzbietowo-brzusznej (ryc. 2 D); spikule silnie rozwinięte, wyraźnie łukowate z dużym, zaokrąglonym wierzchołkiem i rostrum zaostrowym na końcu; zakończone spłaszczeniem w formie dysku (cucullus); brak gubernaculum (ryc. 2 C, ryc. 3 D); brodawki znajdujące się na ogonie obejmują parę brodawek adanalnych znajdujących się tuż przed odbytem oraz dwóch par brodawek postanalnych znajdujących się tuż przed początkiem torebki kopulacyjnej oraz pojedynczej brodawki medialnej (przyśrodkowej) umieszczonej tuż przed odbytem.

Wymiary i cechy morfologiczne *B. xylophilus* zostały zestawione w tabeli 3.



Ryc. 3. Mikrofotografie *Bursaphelenchus xylophilus* i *B. mucronatus*: (A) *B. xylophilus* (USA) przednia część ciała (X896); (B) *B. xylophilus* (Japonia) otvorek wydalniczy (strzałka) (X1267); (C) *B. xylophilus* (Japonia) przednia warga wulwalna (X1274); (D) *B. xylophilus* (Japonia) ogon samca ze spikulami (X1478); (E) *B. xylophilus* (Japonia) ogon samicy (X1834); (F) *B. mucronatus* (Norwegia) ogon samicy z mukronem (X1718) (fotografie użyte przez Christera Magnussona, Bioforsk, Norwegia).

## **Identyfikacja przy użyciu metod biologii molekularnej**

Dostępne metody identyfikacji *B. xylophilus* obejmują sondy DNA poddane hybrydyzacji (Abad i in., 1991; Tares i in., 1994) i różne rodzaje testów PCR (Harmey i Harmey, 1993; Braasch i in., 1995; Iwahori i in., 1998; Hoyer i in., 1998; Braasch i in., 1999; Mota i in., 1999; Zheng i in., 2003; Kang i in., 2004; Matsunaga i Togashi, 2004; Burgermeister i in., 2005; Cao i in., 2005; Castagnone i in., 2005; Jiang i in., 2005; Leal i in., 2005; Takeuchi i in., 2005). Testy molekularne są używane w kwarantannie roślin w celu wykrycia *B. xylophilus* w produktach drzewnych, w związku z tym istotną kwestią jest możliwość wykrycia z ich użyciem nicieni żywych i martwych. Zastosowanie kilku środków fitosanitarnych pozwoli na zabicie *B. xylophilus* w drewnie, lecz martwe nicienie stale są w nim obecne i w zależności od metody ekstrakcji mogą być wykryte przy użyciu metod molekularnych.

Testy molekularne używane w regionie EPPO są opisane w Dodatkach:

- Test ITS RFLP PCR, który opracował Burgermeister i in. (2005) używany do odróżnienia *B. xylophilus* od 25 innych gatunków z rodzaju *Bursaphelenchus* (Dodatek 1).
- Specyficzny dla gatunku test, który opracował Castagnone i in. (2005), pozwalający na identyfikację *B. xylophilus*, wykorzystujący technikę PCR opartą na satelitarnym DNA (Dodatek 2).
- Test real-time PCR, który opracował François i in. (2007), pozwalający na identyfikację satelitarnego DNA *B. xylophilus* (Załącznik 3).

## **Materiały odniesienia**

Kultury odniesienia *Bursaphelenchus* spp. znajdują się w zbiorze kultur nicieni z rodzaju prowadzonych przez Instytut Juliusa Kühna, Instytut Krajowego i Międzynarodowego Zdrowia Roślin (Julius Kühn Institute, Institute for National and International Plant Health) w Brunshwiku (Braunschweig), Niemcy. Wiele gatunków z rodzaju *Bursaphelenchus* można hodować na *Botryotinia fuckeliana* lub innych grzybach (agar słodowy, PDA) w warunkach laboratoryjnych.

## **Raport z badania**

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



Tabela 3. Wymiary (cechy) *Bursaphelenchus xylophilus*

Wymiar (cecha)	Samce					Samice				
	Nickle i in. (1981) (n=5)	Mamiya i Kiyohara (1972) (n=30)	Mota i in.. (1999) (n=12) (Portugalia)	Penas i in. (2008) (Portugalia) a n=20	Penas i in. (2008) (Portugalia) b forma z mukronem n=10	Nickle i in. (1981) (n=5)	Mamiya i Kiyohara (1972) (n=40)	Mota i in.. (1999) (Portugalia) (n=12)	Penas i in. (2008) (Portugalia) n=20	Penas i in. (2008) (Portugalia) forma z mukronem n=10
Długość (L) mm	0,56 (0,52-0,60)	0,73 (0,59-0,82)	1,03 (0,80-1,30)	0,57 (0,45-0,69)	0,85 (0,70-0,99)	0,52 (0,45-0,61)	0,81 (0,71-1,01)	1,05 (0,89-1,29)	0,59 (0,51-0,66)	0,97 (0,81-1,15)
a	40,8 (35-45)	42,3 (36-47)	49,4 (44-56)	46,0 (40,2-58,5)	54,3 (38,7-63,7)	42,6 (37-48)	40,0 (33-46)	50,0 (41-58)	41,9 (32,8-50,6)	53,9 (49,0-58,8)
b	9,4 (8,4-10,5)	9,4 (7,6-11,3)	13,3 (11,1-14,9)	9,6 (8,2-10,7)	12,4 (10,4-13,9)	9,6 (8,3-10,5)	10,3 (9,4-12,8)	13,8 (12,7-16,4)	10,1 (9,1-11,2);	13,3 (12,1-14,3)
c	24,4 (21-29)	26,4 (21-31)	28,0 (24-32)	21,6 (19,1-24,6)	25,3 (20,4-29,0)	27,2 (23-31)	26,0 (23-32)	26,6 (22-32)	25,4 (20,2-29,0);	24,4 (18,8-28,0)
Sztylet, $\mu\text{m}$	13,3 (12,6-13,8)	14,9 (14-17)	12,6 (11-16)	11,0 (10,0-14,0)	14,6 (11,0-18,0)	12,8 (12,6-13,0)	15,9 (14-18)	12,3 (11-15)	11,2 (10,0-12,5)	14,7 (12,0-17,0)
Spikule, $\mu\text{m}$	21,2 (18,8-23,0)	27,0 (25-30)	24 (22-25)	19,3 (16,5-24,0)	26,3 (23,0-28,0)	-	-	-	-	-
Pozycja wulwy, % L	-	-	-	-	-	74,7 (73-78)	72,7 (67-78)	73,3 (70-76)	71,5 (70,1-72,9)	72,6 (71,5-73,5)

Należy zauważyć, że osobniki hodowane przez dłuższy okres czasu na kulturach grzyba *Botrytis*, na szalkach są znacznie dłuższe od nicieni świeżo wyekstrahowanych z drzew, stąd mogą zaistnieć różnice w wymiarach.

## Informacje dodatkowe

Dodatkowe informacje dotyczące opisanego organizmu można uzyskać od następujących osób:

G. Karssen, Plant Protection Service National Reference Laboratory P.O. Box 9102, 6700 HC Wageningen (Holandia).

C. Magnusson, Norwegian Institute of Agricultural and Environmental Research (Bioforsk), Høgskoleveien 7, NO-1432 Ås (Norwegia).

T. Schroeder Julius Kühn Institut (JKI), Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for National and International Plant Health, Messeweg 11-12, D-38104 Braunschweig (Niemcy).

S. Hockland, Food and Environment Research Agency, Sand Hutton, York YO41 1LZ (Wielka Brytania), we współpracy z D. Hunt, CABI Bioscience, Bakeham Lane, Egham TW20 9TY (Wielka Brytania).

C. Tilbury, Forest Research, Alice Holt Lodge, Wrecclesham, Farnham GU10 4EY (Wielka Brytania).

M. Moens, Institute for Agricultural and Fisheries Research, Burg. van Gansberghelaan 96, B-9820 Merelbeke (Belgia).

P. Abad, Laboratoire de Biologie des Invertébrés, INRA, B.P. 2078, 06606 Antibes (Francja).

## Podziękowania

Projekt niniejszego protokołu został pierwotnie sporządzony przez:

H. Braasch, Abteilung für nationale und internationale Angelegenheiten des Pflanzengesundheit, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Stahnsdorfer Damm 81, D-14532 Kleinmachnow (Niemcy)

W. Burgermeister i K. Metge, Institut für Pflanzenvirologie, Mikrobiologie und Biologische Sicherheit, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Messeweg 11, D-38104 Braunschweig (Niemcy).

Rewizja została dokonana przez Panel EPPO nt. Nicieni Kwarantannowych na podstawie projektu Protokołu Diagnostycznego dla Agrofagów Podlegających Przepisom IPPC dotyczącego *Bursaphelenchus xylophilus*.

## Materiały źródłowe

Abad P, Tares S, Brugier N, de Guiran G (1991) Characterization of the relationships in the pinewood nematode species complex (*B. xylophilus* SC) (*Bursaphelenchus* spp.) using a heterologous unc-22 DNA probe from *Caenorhabditis elegans*. *Parasitology* **102**, 303-308.

Braasch, H. (2008). The Enlargement of the *xylophilus* Group in the Genus *Bursaphelenchus*. W: Mota, M.M., Vieira (red.) Pine Wilt Disease: A Worldwide Threat to Forest Ecosystems. Springer: 139-149.

Braasch H, Burgermeister W, Pastrik K-H (1995) Differentiation of three *Bursaphelenchus* species by means of RAPD-PCR. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* **47**, 310-314.

Braasch H, Metge K, Burgermeister W (1999) [*Bursaphelenchus* species in conifers in Germany and their ITS-RFLP pattern.] *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* **51**, 312-320 (po niemiecku).

Braasch H, Burgermeister W (2002) *Bursaphelenchus rainulfi* sp.n. (Nematoda: Parasitaphelenchidae), first record of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 from Malaysia. *Nematology* **4**, 971-978.

- Burgermeister W, Metge K, Braasch H, Buchbach E (2005) ITS-RFLP patterns for differentiation of 26 *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Parasitaphelenchidae) and observations on their distribution. *Russian Journal of Nematology* **13** 29-42.
- Cao AX, Liu X.Z, Zhu SF, Lu BS (2005): Detection of the Pinewood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, using a Real Time Polymerase Chain reaction Assay. *Phytopathology* **95**, 566-571.
- Castagnone C, Abad P, Castagnone-Sereno P (2005) Satellite DNA-based species specific identification of single individuals of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) *European Journal of Plant Pathology* **112**, 191-193.
- François C, Castagnone C, Boonham N, Tomlinson J, Lawson R, Hockland S, Quill J, Vieira P, Mota M, Castagnone-Sereno P (2007) Satellite DNA as a target for TaqMan real-time PCR detection of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Molecular Plant Pathology* **8**, 803-809.
- EPPO/CABI (1996). *Bursaphelenchus xylophilus*. W: *Quarantine Pests for Europe*, 2<sup>nd</sup> edn, CAB International, Wallingford (Wielka Brytania).
- Ferris VR, Ferris JM, Faghihi J (1993) Variation in spacer ribosomal DNA in some cyst-forming species of plant parasitic nematodes. *Fundamental and Applied Nematology* **16**, 177-184.
- Gu J, Zhang J, Braasch H, Burgermeister W (2005) *Bursaphelenchus singaporensis* sp. n. (Nematoda: Parasitaphelenchidae) in packaging wood from Singapore – a new species of the *B. xylophilus* group. *Zootaxa* **988**, 1-12.
- Harmey JH, Harmey MA (1993) Detection and identification of *Bursaphelenchus* species with DNA fingerprinting and Polymerase Chain Reaction. *Journal of Nematology* **25**, 406-415.
- Hoyer U, Burgermeister W, Braasch H (1998) Identification of *Bursaphelenchus* species (Nematoda, Aphelenchoididae) on the basis of amplified ribosomal DNA (ITS-RFLP). *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* **50**, 273-277.
- Hunt D (1993) Genus *Bursaphelenchus* Fuchs, (1973). W: *Aphelenchida, Longidoridae and Trichodoridae, their Systematics and Bionomics*, pp.129-142. CAB International, Wallingford (Wielka Brytania).
- Iwahori H, Tsuda K, Kanzaki N, Izui K, Futai K (1998) PCR-RFLP and sequencing analysis of ribosomal DNA of *Bursaphelenchus* nematodes related to pine wilt disease. *Fundamental and Applied Nematology* **21**, 655-666.
- Jiang LiQin; Zheng JingWu, Waeyenberge L, Subbotin SA, Moens M (2005) Duplex PCR based identification of *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhrer, 1934) Nickle, 1970. *Russian Journal of Nematology* **13**, 115-121.
- Kang JS, Choi KS, Shin SC, Moon IS, Lee SG, Lee SH (2004): Development of an efficient PCR-based diagnosis protocol for the identification of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) *Nematology* **6**, 279-285.
- Kanzaki N, Aikawa T, Maehara N, Matsumoto K (2008) *Bursaphelenchus doui* Braasch, Gu, Burgermeister & Zhang 2005 (Aphelenchida: Parasitaphelenchidae), an associate of *Monochamus subfasciatus* Bates (Coleoptera: Cerambycidae) and *Pinus densiflora* Sieb. & Zucc. *Nematology* **10**, 69-78.
- Leal I, Green M, Allen E, Humble L, Rott M (2005) An effective PCR-based diagnostic method for the detection of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) in wood samples from lodgepole pine. *Nematology* **7**, 833-842.
- Matsunga K, Togashi K (2004) Among-tree difference in the inhibition of systemic dispersal of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) by *Pinus densiflora*. *Applied Entomology and Zoology* **39**, 271-277.
- Mamiya Y, Kiyohara T (1972) Description of *Bursaphelenchus lignicolus* n.sp. from pine wood and histopathology of nematode-infested trees. *Nematologica* **18**, 120-124.
- Mota MM, Braasch H, Bravo MA, Penas AC, Burgermeister W, Metge K, Sousa E (1999) First record of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology* **1**, 727-734.

- Nickle WR (1970) A Taxonomic Review of the Genera of the Aphelenchoidea (Fuchs, 1937) Thorne, 1949 (Nematoda: Tylenchida) *Journal of Nematology* **2**, 375-392.
- Nickle WR, Golden AM, Mamiya Y, Wergin WP (1981) On the taxonomy and morphology of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhrer, 1934) Nickle WR (1970) *Journal of Nematology* **2**, 385-392.
- Penas AC, Bravo MA, Valadas V, Mota M (2008). Detailed morphobiometric studies of *Bursaphelenchus xylophilus* and characterisation of other *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Parasitaphelenchidae) associated with *Pinus pinaster* in Portugal. *J. Nematode Morphol. Syst.* **10**, 137-163.
- Ryss A, Vieira P, Mota M, Kulinich O (2005) A synopsis of genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (*Aphelenchida: Parasitaphelenchidae*) with keys to species. *Nematology*, **7**, 393-458.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Schmitz B, Burgermeister W, Braasch H (1998) Molecular genetic classification of Central European *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax* populations. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* **50**, 310-317.
- Southey JF (1986) *Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes*. Her Majesty's Stationery Office, London (GB).
- Takeuchi, Y, Kanzaki N, Futai K (2005) A nested PCR-based method for detecting the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, from pine wood. *Nematology* **7**, 775-782.
- Tares S, Lemontey JM, de Guiran G, Abad P (1993) Cloning and characterization of a highly conserved satellite DNA sequence specific for the phytoparasitic nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Gene* **129**, 269-273.
- Tares S, Lemontey JM, de Guiran G, Abad P (1994) Use of species-specific satellite DNA from *Bursaphelenchus xylophilus* as a diagnostic probe. *Phytopathology* **84**, 294-298.
- Vrain TC (1993) Restriction fragment length polymorphism separates species of the *Xiphinema americanum* group. *Journal of Nematology* **25**, 361-364.
- Williams BD, Schrank B, Huynh C, Shownkeen R, Waterston DH (1992) A genetic mapping system in *Caenorhabditis elegans* based on polymorphic sequence-tagged sites. *Genetics* **131**, 609-624
- Zheng J, Subbotin SA, He S, Gu J, Moens M (2003). Molecular characterisation of some Asian isolates of *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* using PCR-RFLPs and sequences of ribosomal DNA. *Russian Journal of Nematology* **11**, 17-22.

## Dodatek 1 Test ITS RFLP PCR wg. Burgermeistera i in. (2005)

### 1. Informacje ogólne

- 1.1. Ten test został opisany przez Burgermeistera i in. 2005. Profile opisane w tej publikacji zostały uzupełnione o te, które otrzymano dla *B. doui* i *B. singaporensis* (Kanzaki i in., 2008; Gu i in., 2005)
- 1.2. Test opracowano w odniesieniu do 27 gatunków z rodzaju *Bursaphelenchus*, w tym dla 5 spośród 9 gatunków z grupy „*B. xylophilus*”: *B. conicaudatus*, *B. fraudulentus*, *B. luxuriosae*, *B. mucronatus*, *B. xylophilus*, *B. doui* i *B. singaporensis*.
- 1.3. Region poddawany analizie przy użyciu zestawu starterów umiejscowiony jest w regionie 18S - 26S rDNA.
- 1.4. Rozmiar amplicjonu waha się między 950 a 1030 pb.
- 1.5. Zestaw starterów:  
przedni: 5'-CGT-AAC-AAG-GTA-GCT-GTA-G-3' (Ferris i in., 1993)  
26S : 5'-TTTCAC- TCG-CCG-TTA-CTA-AGG-3' (Vrain, 1993)
- 1.6. Polimeraza Taq DNA (Stratagene lub Fermentas) jest używana do amplifikacji.
- 1.7. Końcowe stężenie każdego z używanych nukleotydów wynosi 0.2 μM.
- 1.8. Woda do testów molukularnych (molecular grade water - MGW) jest używana do sporządzania mieszanin reakcyjnych.
- 1.9. Pierwotnie test opracowano przy użyciu amplifikatora 9600 Perkin Elmer.

### 2. Metody

#### 2.1 Ekstrakcja kwasu nukleinowego

Ekstrakcję DNA przeprowadza się z materiału zawierającego różne stadia rozwojowe nicieni (samice, samce, osobniki młodociane). W czasie wcześniejszych prac wykorzystywano kilka metod ekstrakcji DNA, wliczając w to oczyszczanie DNA przez strącanie alkoholem (Hoyer i in., 1998; Braasch i Burgermeister, 2002), odwrotną adsorbcję na membranach krzemowych (Schmitz i in., 1998) lub użycie kulek magnetycznych (Mota i in., 1999; Braasch i in., 1999). Przy użyciu tych metod wystarczająca do amplifikacji ilość DNA może być wyekstrahowana z minimum 5 - 10 osobników nicieni.

Gdy ekstrakcję przeprowadza się z pojedynczych osobników nicieni, uzyskuje się DNA w ilości niezbędnej do przeprowadzenia testu PCR zaledwie z 30-80 % próbek, stąd użycie powyższych metod wymaga analizy przynajmniej 5 do 10 nicieni. Jakkolwiek, prawdopodobieństwo wyekstrahowania DNA w wymaganej ilości z pojedynczego osobnika nicienia ostatnio wzrosło do prawie do 100% w wyniku użycia metody adsorbcji na membranach krzemowych w wersji mikro (QIAamp DNA Micro Kit, Qiagen). Ekstrakcja DNA przy użyciu tej metody przebiega w następujący sposób:

Próbki nicieni (1 do 30 osobników) zostają umieszczone w 5 μl wody w probówkach Eppendorfa i zamrożone przed ekstrakcją w - 20°C. Przed ekstrakcją próbki są rozmrażane, mieszane z 10 μl buforu ATL (Qiagen) i homogenizowane w próbówce z użyciem mikrohomogenizatora (Eppendorf). Bufor ATL (170 μl) i 20 μl roztworu proteiny K (>600 mAU/ml) są dodane tak, aby opłukać homogenizator, próbka zostaje zmieszana i inkubowana w 56°C przez 3 h. Następnie dodaje się 200 μl buforu AL (Qiagen) zawierającego 1 μg nośnika RNA (Qiagen), a próbka zostaje zmieszana przy użyciu mieszania pulsacyjnego przez 15 s. Zostaje dodany etanol (200 μl), próbka zostaje poddana mieszanemu pulsacyjnemu przez 15 s, a następnie zostaje przeniesiona do kolumny QIAamp MinElute Column i odwirowywana przy 6 000 g przez 1 min. Supernatant jest usuwany, a kolumna jest przemywana dwukrotnie, po raz pierwszy z zastosowaniem 500 μl buforu AW1 (Qiagen) po którym następuje odwirowywanie przy 6 000 g

przez 1 min, a w drugiej kolejności poprzez dodanie 500 µl buforu AW2 (Qiagen) i odwirowywanie przy 6 000 g przez 1 min. Następnie kolumna zostaje poddana wirowaniu przy 20 000 g przez 3 min w celu wysuszenia membrany. W celu oczyszczenia zaadsorbowanego DNA, kolumna zostaje umieszczona w czystej probówce Eppendorfa, a następnie od 20 µl (w przypadku ekstrakcji DNA z pojedynczego nicienia) lub do 100 µl (w przypadku ekstrakcji DNA z maksimum 30 nicieni) buforu AE (Qiagen) wprowadza się na membranę. Próbkę jest inkubowana przez 10 min w temperaturze pokojowej i odwirowywana przy 20 000 g przez 1 min. Eluat zawierający wyekstrahowane DNA jest do chwili użycia przechowywany w  $-20^{\circ}\text{C}$ . Stężenie DNA można określić fluorometrycznie przy użyciu fluorometru DyNA Quant 200 (Hoefler/Pharmacia) i barwnika fluorescencyjnego Hoe 33258.

## 2.2 Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)

### 2.2.1 Mieszanina master mix (stężenie na 50-µL w przypadku pojedynczej reakcji)

10 mM Tris-HCl pH 8.8

50 mM KCl

2 mM  $\text{MgCl}_2$

0,1 mM każdego dNTP (Roche)

0,6 µM każdego starteru

2 jednostki polimerazy Taq DNA (Stratagene or Fermentas)

2 ng matrycy DNA

### 2.2.2 Parametry reakcji PCR

wstępna denaturacja w  $94^{\circ}\text{C}$  przez 2,5 min, 40 cykli reakcyjnych w  $94^{\circ}\text{C}$  przez 1 min,  $55^{\circ}\text{C}$  przez 1 min,  $72^{\circ}\text{C}$  przez 2 min i końcowa elongacja w  $72^{\circ}\text{C}$  przez 5 min.

## 2.3 Procedura RFLP

Właściwe ilości amplifikowanego DNA są trawione przez 3 jednostki restrykcyjnych endonukleaz: AluI, HaeIII, HinfI, MspI i RsaI, zgodnie z instrukcją producenta.

## 3. Istotne informacje nt. procedury

### 3.1. Analiza fragmentów DNA:

fragmenty DNA są rozdzielane elektroforetycznie na żelu agarozowym (odpowiednio 1,8% i 2,5% dla reakcji PCR i RFLP) i wizualizowane w świetle UV, zgodnie ze standardowymi procedurami (patrz Sambrook i in., 1989).

### 3.2. Identyfikacja gatunków:

Długość fragmentów restrykcyjnych przedstawiona jest w tabeli 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).

Tabela 4. Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych reakcji RFLP

Gatunek z rodzaju <i>Bursaphelenchus</i>	Produkt PCR (bp)	Fragmenty restrykcyjne (bp)				
		RsaI	HaeIII	MspI	HinfI	AluI
<i>B. conicaudatus</i>	980	510	550	290	270	380
		450	160	200	190	310
<i>B. dowi</i> *	981	435	723 <sup>1</sup>	328	292	616
		296	640 <sup>1</sup>	264	283	265
		228	205	165	228	
				114	154	
				110		
<i>B. fraudulentus</i>	1030	560	340	340	310	470
		470	290	290	260	390
			150	130	160	180
			110			
<i>B. luxuriosae</i>	950	500	750	450	270	600
		420	160	240	240	320
			50	130	170	
<i>B. mucronatus</i> typ europejski	950	410	620	370	410	700
		290	220	310	250	250
		230	110	280	130	
<i>B. mucronatus</i> typ azjatycki	950	500	620	370	410	700
		410	310	310	250	250
				280	130	
					90	
<i>B. singaporensis</i> **	950	500	840	300	510	370
		430	550	250	260	210
			290	130	140	140
			120			
<i>B. xylophilus</i>	950	500	730	570	270	460
		420	200	380	260	250
					140	140
						100

\*: wg. Kanzaki i in. (2008)

\*\*: wg. Gu i in. (2005)

<sup>1</sup> Badane populacje japońskie charakteryzują się obecnością albo pojedynczego prążka na wysokości 723bp lub dwóch prążków na wysokościach 640 i 723 bp. Badane populacje tajwańskie charakteryzują się obecnością tylko prążka na wysokości 640 bp.

## Dodatek 2 Test PCR oparty na satelitarnym DNA wg. Castagnone i in. (2005)

### 1. Informacje ogólne

- 1.1. Ta metoda została opracowana przez Castagnone i in., 2005.
- 1.2. Test opracowano dla czterech gatunków z rodzaju *Bursaphelenchus*, *B. leoni*, *B. mucronatus*, *B. tusciae*, *B. xylophilus* (3 izolaty).
- 1.3. Zestaw starterów odnosi się do rodziny satelitarnego DNA charakterystycznej dla *Bursaphelenchus xylophilus*.
- 1.4. Amplikonem jest drabinka multimerów rozłożonych co 160 bp monomer (160; 320; 480bp ....)
- 1.5. Zestaw starterów:  
J10-1: 5'-GGT-GTC-TAG-TAT-AAT-ATC-AGA-G-3'  
J10-2Rc: 5'-GTG-AAT-TAG-TGA-CGA-CGG-AGT-G-3'
- 1.6. Polimeraza Taq DNA (MP Biomedicals, ex Qbiogene, France) używana jest do amplifikacji
- 1.7. Końcowe stężenie każdego z używanych nukleotydów wynosi 0.2 μM.
- 1.8. Woda do testów molukularnych (molecular grade water - MGW) jest używana do sporządzania mieszanin reakcyjnych.
- 1.9. Pierwotnie test opracowano przy użyciu amplifikatora TRIO-Thermoblock (Biometra).

### 2. Metody

#### 2.1 Ekstrakcja kwasu nukleinowego

Amplifikacja jest przeprowadzana w odniesieniu do pojedynczych osobników, przygotowanych zgodnie procedurą testu PCR, która jest modyfikacją procedury opracowanej przez Williamsa i in. (1992). W skrócie, pojedyncze osobniki nicieni są przenoszone do suchej próbówki do testu PCR o cienkich ściankach, pokrytej 2.5 μl buforu do lizy (50 mM KCl, 10 mM tris pH 8.2, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 60 mg/ml proteinazy K, 0.45 % NP40, 0.45 % tween 20, 0.01 % żelatyny) i pokrytej olejem mineralnym. Probówki są umieszczane w temperaturze -80 °C przez 45 min, a następnie niezwłocznie są przenoszone do amplifikatora, najpierw do temperatury 60 °C na 60 min, a następnie do temperatury 95 °C na 15 min. Uzyskany w ten sposób "sok z nicieni" jest używany jako analizowany materiał (matryca) w specyficznej reakcji PCR.

#### 2.2 Reakcja łańcuchowa polimerazy

##### 2.2.1 Mieszanina master mix (stężenie na 25-μL w przypadku pojedynczej reakcji)

- 10 mM Tris-HCl pH 8.2
- 50 mM KCl
- 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0,2 mM każdego dNTP
- 250 ng każdego starteru
- 1 jednostka polimerazy Taq DNA (MP Biomedicals, ex Qbiogene)
- 10 ng matrycy DNA

##### 2.2.2 Parametry reakcji PCR

początkowa denaturacja w 94°C przez 5 min, 25 cykli reakcyjnych w 94°C przez 30 s, 64°C przez 1 min, 72°C przez 1 min i końcowa elongacja w 72°C przez 5 min.



### 3. Istotne informacje nt. procedury

#### 3.1. Analiza fragmentów DNA:

Fragmenty DNA są rozdzielane elektroforetycznie na żelu agarozowym (2,5% dla reakcji PCR) i wizualizowane w świetle UV, zgodnie ze standardowymi procedurami (patrz Sambrook i in., 1989).

#### 3.2. Identyfikacja gatunków:

Z uwagi na wykazanie, że rodzina satelitarnego DNA składa się z powtarzającego się materiału ułożonego w formie tandemicznych szyków (Tares i in., 1993), amplifikacja drabinki multimerów składających się z monomerów rozłożonych co 160bp zostaje uzyskana po reakcji PCR zawierającej DNA wyizolowane z *Bursaphelenchus xylophilus*. Natomiast w przypadku innych gatunków z rodzaju *Bursaphelenchus* proces amplifikacji nie zachodzi.

#### 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).

### Dodatek 3. Dostępny protokół real time PCR (François i in., 2007)

#### 1. Informacje ogólne

- 1.1. Ta metoda została opracowana przez Castagnone i in., 2005.
- 1.2. Test opracowano w odniesieniu do 11 gatunków z rodzaju *Bursaphelenchus*, *B. antoniae*, *B. conicaudatus*, *B. fraudulentus*, *B. hofmani*, *B. glochis*, *B. luxuriosae*, *B. mucronatus*, *B. pinophilus*, *B. sexdentati*, *B. tusciae* i *B. xylophilus* (13 izolatów).
- 1.3. Zestaw starterów odnosi się do amplikonu długości 77bp, o sekwencji monomerycznej jednostki MspI satelitarnego DNA *Bursaphelenchus xylophilus* (kod dostępu L09652).
- 1.4. Rozmiar amplikonu wynosi 77bp.
- 1.5. Zestaw starterów:  
BSatF: 5'-TGA-CGG-AGT-GAA-TTG-ACA-AGA-CA-3'  
BSatRV: 5'-AAG-CTG-AAA-CTT-GCC-ATG-CTA-AA-3'  
Sonda :  
BsatS: 5'-FAM-ACA-CCA-TTC-GAA-AGC-TAA-TCG-CCT-GAG-A-TAMRA-3'  
(Eurogentec)
- 1.6. Polimeraza Taq DNA (qPCR Core Kit, Eurogentec, Belgia) jest używana do amplifikacji.
- 1.7. Końcowe stężenie każdego z używanych nukleotydów wynosi 0.2µM.
- 1.8. Woda do testów molukularnych (molecular grade water - MGW) jest używana do sporządzania mieszanin reakcyjnych.
- 1.9. Pierwotnie test opracowano przy użyciu urządzenia Opticon 2 i oprogramowania Opticon 2 Monitor, wersja 3.1 (MJ Research), używanych do oceny czułości testu i amplifikatora SmartCycler II (Cepheid, Sunnyvale, CA) w celu analizy materiału wyekstrahowanego z drewna i przeprowadzenia porównań wyników analiz prowadzonych na pojedynczych osobnikach nicieni.

#### 2. Metody

##### 2.1. Ekstrakcja kwasu nukleinowego

Genomowy DNA łącznie z całej puli nicieni z poszczególnych izolatów jest ekstrahowany z użyciem metody fenolowo-polimerazowej (Sambrook i in., 1989), określony ilościowo spektrofotometrycznie, podzielony na równe ilości i jest przechowywany w temperaturze -80°C. Alternatywnie, DNA był izolowany z określonej liczby osobników nicieni (1-2000 osobników) przy użyciu procedury uproszczonej, tak jak opisano to uprzednio (Castagnone i in., 2005), z niewielką modyfikacją. W odróżnieniu do protokołu oryginalnego, objętość używanego buforu do lizy nie była stała, lecz proporcjonalna do liczby nicieni, tj. 3µl dla 1-4 nicieni i 20µl dla wyższej liczby nicieni.

##### 2.2. Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (Real Time Polymerase Chain Reaction)

2.2.1 Mieszanina master mix (stężenie na 25 µL w przypadku pojedynczej reakcji, tylko na sprzęcie firmy MJ Research)

- 1X mieszanina buforów (zestaw qPCR Core kit bez ROX – Eurogentec)
- 5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0,2 mM każdego dNTP
- 200 nM każdego starteru BsatF i BsatRV
- 200 nM BsatS (sonda)
- 0,5 jednostki polimerazy Taq DNA (zestaw qPCR Core kit, Eurogentec)
- 1µl matrycy genomowego DNA

2.2.2 Parametry reakcji PCR, na sprzęcie firmy MJ Research  
wstępna denaturacja w 94°C przez 10 min, 30 cykli reakcyjnych w 95°C przez 15 s, 59°C przez 30 s, pomiar fluorescencji i końcowy krok hybrydyzacji i elongacji w 59°C.

2.2.3. Mieszanina master mix (stężenie na 25 µL w przypadku pojedynczej reakcji, tylko na sprzęcie SmartCycler)

- 1X mieszanina buforów (Biogene, Kimbolton, Wielka Brytania)
- 5,5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 5% trehaloza (wagowo na objętość)
- 0,2 mM każdego dNTP
- 300 nM każdego startera BsatF i BsatRV
- 100 nM BsatS (sonda)
- 0,6 units Hot Taq (Biogene, Kimbolton, Wielka Brytania)
- 1 µl szablону genomowego DNA

2.2.4 Parametry reakcji PCR na sprzęcie SmartCycler  
denaturacja w 95°C przez 10 min, 40 cykli reakcyjnych w 95°C przez 15 s, 60°C przez 1 min, pomiar fluorescencji i końcowy krok wydłużania i elongacji w 60°C.

### 3. Istotne informacje nt. procedury

#### 3.1. Analiza amplifikacji DNA:

Fragmety DNA są rozdzielane elektroforetycznie na żelu agarozowym (2,5% dla reakcji PCR) i wizualizowane w świetle UV, zgodnie ze standardowymi procedurami (patrz Sambrook i in., 1989).

1 ng DNA *B. xylophilus* DNA daje wartość progową cyklu wynoszącą około 12-13 cykli (dane z projektu PORTCHECK).

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).

3.3. Test ten był używany w odniesieniu do nicieni oraz bezpośrednio w odniesieniu do sztucznie zainfekowanego drewna. Dodatkowe informacje na temat ekstrakcji i mieszaniny master mix można znaleźć w oryginalnym artykule dotyczącym użycia tego testu do wykrywania nicieni. Tym niemniej, w niniejszym protokole ten test jest zalecany tylko do identyfikacji nicieni wyizolowanych.

#### Dane na temat walidacji

Czułość analityczna i granica wykrywalności: 1 pg DNA (3 powtórzenia w oddzielnych eksperymentach)

Czułość diagnostyczna: 1 nicień (100% poprawnej identyfikacji)

Specyficzność: uzyskana przy użyciu dziesięciu innych gatunków z rodzaju *Bursaphelenchus*, w tym także mieszaniny nicieni (pozytywnie wykryto osobniki *B. xylophilus* stanowiące 1% osobników nicieni w mieszaninie z *B. mucronatus*, oraz nawet DNA *B. xylophilus* stanowiące 0,01% mieszaniny z DNA *B. mucronatus*).

Ten protokół został przetestowany w ramach projektu EU PORTCHECK na sprzęcie SmartCycler przy użyciu specyficznej mieszaniny (master mix) – mieszaniny Takara.

<b>Tłumaczenie z jęz. angielskiego:</b>	<b>Sprawdził:</b>	<b>Zatwierdził:</b>
Witold Karnkowski (GIORiN CL)	(GIORiN CL)	Janina Butrymowicz (GIORiN CL)
19.11.2010		