

**Diagnostyka**  
**Diagnostic****PM 7/4(3) *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. Wersja po drugiej rewizji zatwierdzona we wrześniu 2012 r.

**Wprowadzenie**

Węgorzek sosnowiec (*Bursaphelenchus xylophilus*) jest organizmem szkodliwym znajdującym się na liście A2 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 kontynentalnej części Portugalii na *P. pinaster*, a w 2009 r. na wyspie Madera. Ograniczone ogniska szkodnika wykryte w Hiszpanii w latach 2008, 2010 i 2012 są w trakcie wyniszczania. Uaktualnione informacje nt. rozmieszczenia geograficznego znajdują się w bazie danych EPPO - PQR<sup>2</sup>.

*Pinus* spp. są najbardziej podatnymi na porażenie przez nicienia gatunkami drzew, lecz drzewa z rodzajów *Abies*, *Chamaecyparis*, *Cedrus*, *Larix*, *Picea* i *Pseudotsuga* odnotowano także jako żywicieli nicienia (Evans i in., 1996).

W warunkach naturalnych *B. xylophilus* jest przenoszony z drzewa na drzewo w wyniku aktywności chrząszczy kózkowatych z rodzaju *Monochamus* (żerdzianka) (Coleoptera:

<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

<sup>2</sup> <http://www.eppo.org/DATABASES/pqr/pqr.htm>

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 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 nie przyczynić się 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 i 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 także 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).

Procedura diagnostyczna w odniesieniu do *Bursaphelenchus xylophilus* jest przedstawiona na ryc. 1.

## Tożsamość

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

**Synonimy:** *Aphelenchoides xylophilus* Steiner et Buhrer, 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

*Bursaphelenchus 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. *Bursaphelenchus 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 lejków Baermanna, polegającej na zanurzeniu niewielkich kawałków drewna (o szerokości nie większej niż 1 cm, porąbane przy użyciu metody, gdzie nie następuje wydzielanie się ciepła) w wodzie na 48 godzin. Nicienie przechodzą z rozdrobnionego drewna do wody i gromadzą się w nóżce lejka zamkniętej zaciskiem. Inne metody obejmujące zanurzenie drewna w wodzie oraz metoda z użyciem zamgławiaczki są także właściwe (patrz Standard PM 7/XXX *Ekstrakcja nicieni, w przygotowaniu*)<sup>3</sup>. Pod mikroskopem stereoskopowym nicienie mogą być przeniesione z małej szalki Petriego na szkiełko mikroskopowe podstawowe, przy pomocy pipety lub igły, w celu analizy mikroskopowej i identyfikacji na podstawie cech morfologicznych. Testy molekularne mogą być przeprowadzone w celu sprawdzenia zawartości ekstraktu z drewna (patrz Dodatek 4) lecz ich wynik powinien być potwierdzony przez identyfikację na podstawie cech morfologicznych. Gdy notuje się obecność tylko osobników młodocianych, należy przeprowadzić ich hodowlę na grzybie *Botryotinia fuckeliana* w celu uzyskania osobników dorosłych niezbędnych do identyfikacji (Shroeder i in., 2009).

### **Ekstrakcja z wektorów owadzich**

Osobniki młodociane czwartego stadium mogą być wyizolowane z osobników wektorów owadzich nicienia. Analizowane owady należy pociąć na kawałki i poddać analizie przez okres ponad 24 h przy użyciu metody Baermanna. W celu przeprowadzenia identyfikacji nicieni metodą morfologiczno-metryczną, osobniki zgromadzone w nóżce lejka należy umieścić na grzybni *Botryotinia* (syn. *Botrytis cinerea*), gdzie nastąpi ich wylinka do stadium dorosłego i namnożenie się.

### **Identyfikacja**

#### **Identyfikacja postaci w oparciu o budowę morfologiczną**

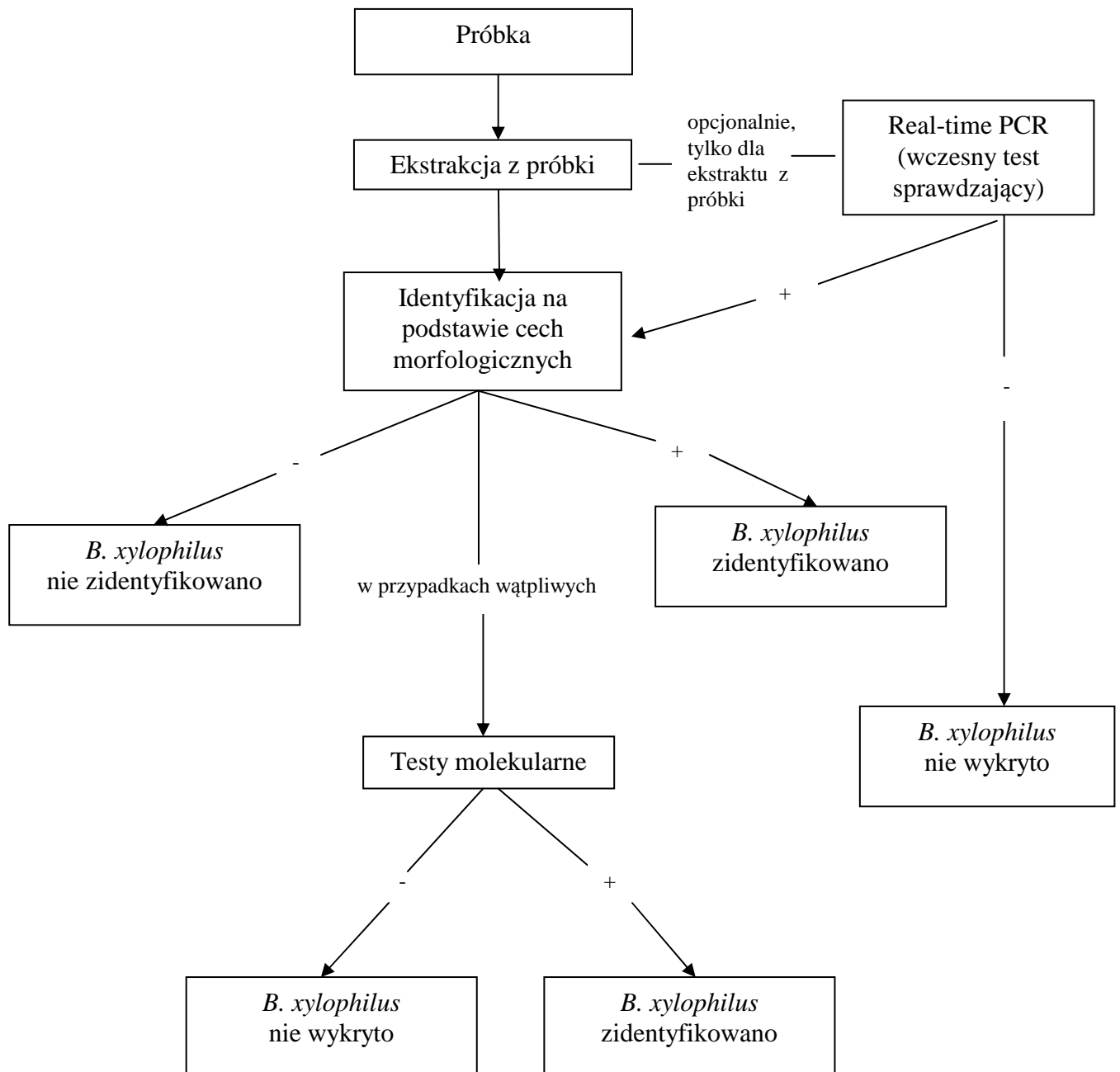
Identyfikacja *B. xylophilus* jest oparta na analizie cech morfologicznych osobników dorosłych, przy czym powinna ona obejmować osobniki obu płci. Analiza wymaga wykonania preparatów mikroskopowych dobrej jakości, dostępu do silnie powiększającego mikroskopu oraz znacznego doświadczenia w zakresie taksonomii 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 pasożytujących na roślinach, 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 przełyku). Osobniki dorosłe nicieni z rodzaju *Bursaphelenchus* grupa *xylophilus* mogą być odróżnione od innych nicieni przy użyciu klucza zamieszczonego w tabeli 1.

---

<sup>3</sup> Dokument ten obecnie już został opublikowany jako standard PM 7/119 (przyp. tłum.).

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 i 3B) oraz posiadaniem na ogonie siedmiu brodawek kaudalnych (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. 1. Diagram postępowania podczas wykrywania i identyfikacji *Bursaphelenchus xylophilus*.

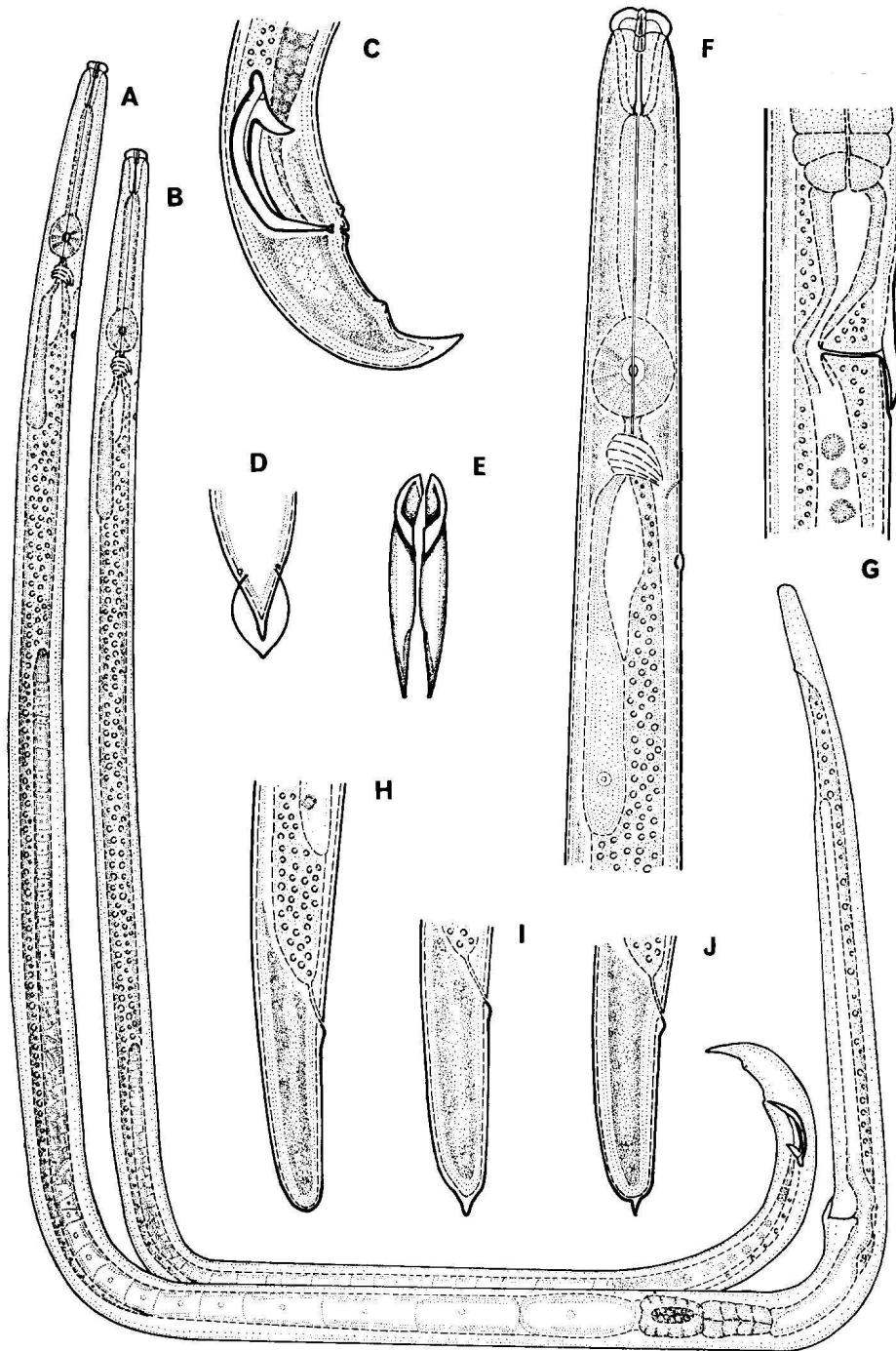
Cechy zamieszczone w tabeli 2 są typowe i będzie można zaobserwować je w większości przypadków. Jakkolwiek, obserwuje się pewną zmienność morfologiczną między populacjami.

W przypadku jakichkolwiek wątpliwości w odniesieniu do powyższych kryteriów (kształtu ogona samic, umiejscowienia otworka wydalniczego, itp.) zaleca się przeprowadzenie testów molekularnych (patrz poniżej).

Tabela 1 Identyfikacja do rodzaju *Bursaphelenchus* (nicienie wyizolowane z drewna i kory)

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	9	
	Odległość wulwy od przedniego końca ciała wynosi 85-90% długości ciała; ogon samca nie jest silnie wygięty na końcu		NBS
9.	Pała boczne z 4 liniami; wulwa z wyraźną wargą wulwalną; spikule silnie łukowato zgięte (ryc. 2C i 3C-D)		<i>Bursaphelenchus</i> grupa <i>xylophilus</i> (BXG)
	Cechy inne		Gatunek spoza rodzaju <i>Bursaphelenchus</i> grupa <i>xylophilus</i>

NBS: gatunek nie należący do rodzaju *Bursaphelenchus*



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.

Tabela 2. Krótki klucz do identyfikacji *Bursaphelenchus xylophilus* w obrębie grupy „*xylophilus*” (nicienie wyekstrahowane z drewna i kory).

1	Ogon samicy stożkowaty (rys. 3A) lub silnie zwężający się ku tyłowi zakończony mukronem lub bez mukrona. Ogon samicy szeroko walcowaty, zakończony mikronem lub bez mikrona (ryc. 2 H i 3 B).	Gatunek inny niż <i>B. xylophilus</i> 2
2	Długość spikul >30 µm  Długość spikul <30 µm	Gatunek inny niż <i>B. xylophilus</i> 3
3	Spikule z krótkim i zaostrozonym rostrum; lamina spikul zaokrąglona (ryc. 3 C)  Spikule z długim i zaostrozonym rostrum; lamina spikul zgięta pod kątem (ryc. 2 C, 3 D)	Gatunek inny niż <i>B. xylophilus</i> 4
4	Przednia warga wulwalna samicy zgięta i kończy się znacznym wgłębieniem (ryc. 3 E) Przednia warga wulwalna samicy prosta i nie kończy się wgłębieniem (ryc. 2 G, 3 F)	Gatunek inny niż <i>B. xylophilus</i> 5
5	Ogon samicy bez mukrona (ryc. 2 H, 3 B) lub z niewielkim wyrostkiem (ryc. 2 I-J) Ogon samicy z mukronem (ryc. 3G)	<i>B. xylophilus</i> (forma z zaokrąglonym ogonem) 6
6	Otworek wydalniczy przed środkowym rozszerzeniem przełyku  Otworek wydalniczy na wysokości środkowego rozszerzenia przełyku lub poza nim (ryc. 3 H)	Gatunek inny niż <i>B. xylophilus</i> <i>B. mucronatus kolymensis</i> i <i>B. xylophilus</i> (forma z mukronem)*
	<b>Umiejscowienia środkowego rozszerzenia przełyku nie można zaobserwować</b>	Identyfikacja na podstawie cech morfologicznych nie jest możliwa. Należy przeprowadzić testy molekularne.

\* Forma *B. xylophilus* z mukronem jest notowana głównie z Ameryce Północnej i zaleca się przeprowadzenie testów molekularnych (Gu i in., 2011) w celu jednoznacznego odróżnienia tej formy od „typu europejskiego” *B. mucronatus*, tj. *Bursaphelenchus mucronatus kolymensis* (Braasch i in.. 2011).

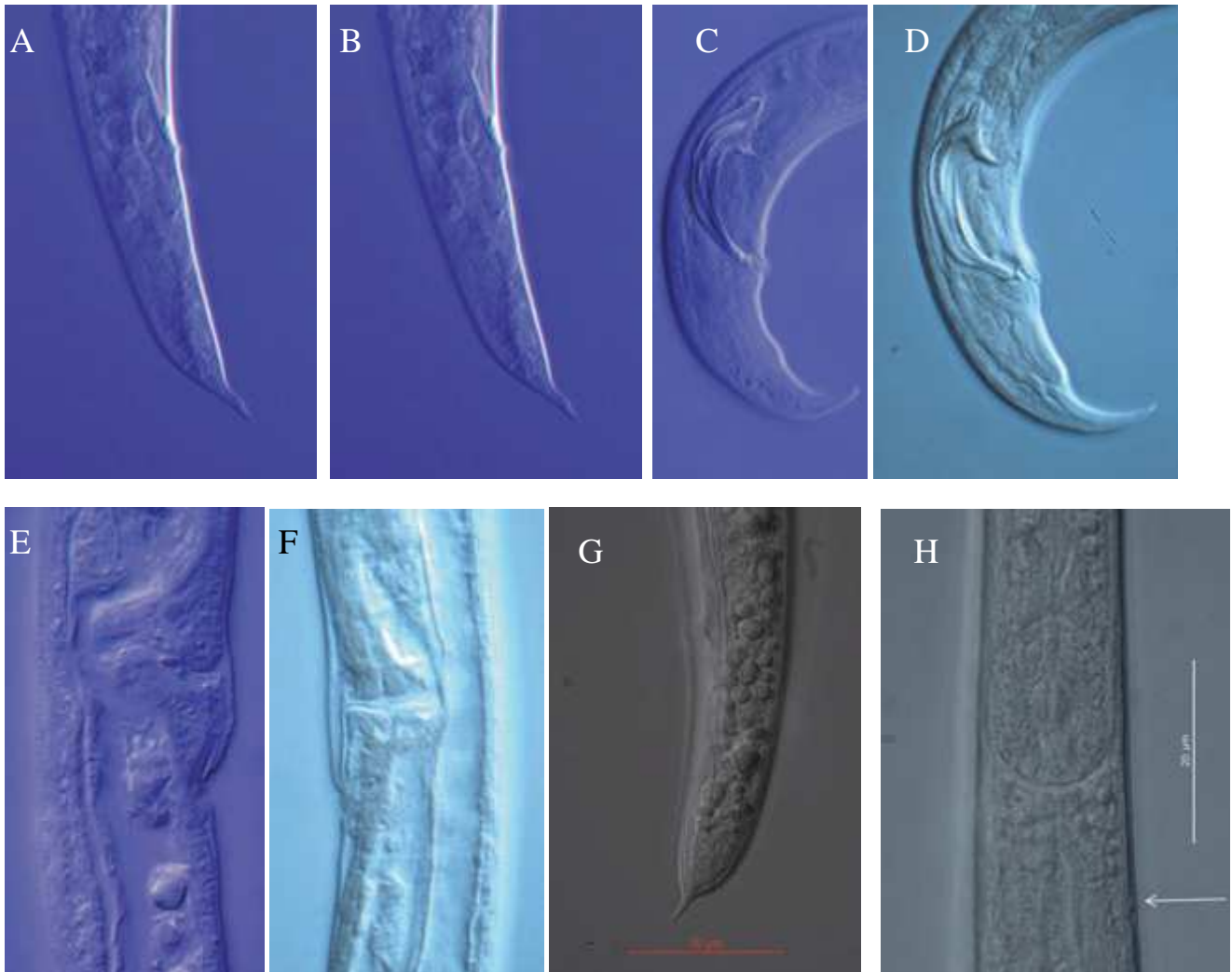
Uwaga: Niniejszy klucz pozwala tylko na identyfikację *B. xylophilus*, klucz do identyfikacji innych gatunków znajduje się w pracy Ryssa i in., (2005). Hodowla nicieni na kulturach grzybów na agarze może zwiększyć zmienność kształtu ich ogona.

## Morfologia

*Bursaphelenchus 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. 3 F); środkowe rozszerzenie przełyku dobrze rozwinięte (ryc. 3 F).

*Samica:*

Wulwa przykryta wyraźnie rozwiniętą przednią wargą wulwalną (przykrycie wulwy) i nie kończy się wgłębieniem (ryc 2 G i 3F); 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 i 3 B), lecz na jego końcu niekiedy może znajdować się niewielki, brodawkowaty wyrostek lub krótki mukron (ryc. 2 I-J). Forma z mukronem *B.xylophilus* posiada mukron (ryc. 3 G) przypominający mukron *B. mucronatus*. Forma z mukronem występuje rzadko zarówno w Ameryce Północnej jak i na innych obszarach występowania nicienia.



Ryc. 3. Cechy morfologiczne *Bursaphelenchus* spp. (A) *B. mucronatus* „typ wschodnioazjatycki” posiadający stożkowaty ogon z mukronem. (B) *B. xylophilus*, ogon samicy z ‘formy z zaokrąglonym ogonem’; (C) *B. tryphloeii* kształt spikul; (D) *B. xylophilus* kształt spikul; (E) *B. populi*, posiadający zgiętą przednią wargę wulwalną kończącą się zagłębieniem w ścianie ciała; (F) *B. xylophilus* posiadający prostą wargę wulwalną; (G) *B. xylophilus* forma z mukronem (US 10). (H) *B. xylophilus* forma z mukronem (US 10) z pokazaną pozycją kanałika wydalniczego poza środkowym rozszerzeniem przetyku (strzałka). Fotografie: A, C, E (Prof. Marek Tomalak, Instytut Ochrony Roślin, Poznań, Polska); B, D, F, G, H (Christer Magnusson Bioforsk, Norwegia).



*Samiec:*

Ogon silnie wygięty na stronę brzuszną (ryc. 2 CF i 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 zaostrozonym na końcu; zakończone spłaszczeniem w formie dysku (cucullus); brak gubernaculum (ryc. 2 C i 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. Należy przy tym dodać, że wymiary tego samego gatunku i szczepu nicienia mogą różnić się w przypadku, gdy nicienie rozwijały się na podłożu naturalnym (tj. drewnie) czy też sztucznym (tj. na kulturach grzybów na agarze).

### **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, 1999; Iwahori i in., 1998; Hoyer i in., 1998; 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). Gdy testy molekularne są używane w kwarantannie roślin w celu wykrycia *B. xylophilus* w produktach drzewnych, 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. (2009) używany do odróżnienia *B. xylophilus* od 44 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) i przystosowanie tego testu real-time PCR do bezpośredniego wykrywania nicieni w materiale wyekstrahowanym z drewna (Dodatek 4), które zostało dokonane przez Anses-LSV (Francja).

### **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 Brunszwiku (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*

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) forma z mukronem b) n=10	Nickle i in. (1981) (n=5)	amiya i Kiyohara (1972) (n=40)	lota 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, µm	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, µm	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 *Botrytis* na szalkach są znacznie dłuższe od nicieni świeżo wyekstrahowanych z drzew, stąd mogą zaistnieć różnice w wymiarach.

(a) Stosunek długości ciała nicienia do największej szerokości (zwykle w środkowej części ciała); (b) Stosunek długości ciała nicienia do długości przetyku liczonej od warg do zastawki w miejscu połączenia przetyku z jelitem; (c) Stosunek długości ciała nicienia do długości ogona.

## Informacja zwrotna na temat tego Protokołu Diagnostycznego

Jeśli masz jakieś komentarze dotyczące tego Protokołu Diagnostycznego, lub jakichkolwiek testów opisanych w nim, lub gdy możesz dostarczyć dodatkowe dane na temat walidacji testów zamieszczonych w tym protokole, z którymi chciałbyś się podzielić, wtedy prosimy o skontaktowanie się pod adresem [diagnostics@eppo.int](mailto:diagnostics@eppo.int)

## Rewizja protokołu

Co roku ma miejsce przegląd standardów diagnostycznych w celu określenia potrzeby ich rewizji. Standardy uznane, jako wymagające rewizji są oznaczone jako takie na stronie EPPO. Gdy w druku znajdzie się errata i poprawka do standardu, zostanie to również zaznaczone na tej stronie.

## Informacje dodatkowe

Dodatkowe informacje dotyczące opisanego organizmu można uzyskać od następujących osób:

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

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

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

Prior T, Food and Environment Research Agency, Sand Hutton, York YO41 1LZ (Wielka Brytania),

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

Abad P, INRA UMR1301/UNSA/CNRS UMR6243 Interactions Biotiques et Santé Végétale Equipe "Interactions Plantes-Nématodes" BP167 400, route des Chappes 06903 Sophia Antipolis cedex (Francja)

Anthoine G, Anses – Plant Health Laboratory 7 rue Jean Dixméras 49044 Angers Cedex 01 (Francja)

Tomalak M, Institute of Plant Protection – National Research Institute, 60-318 Poznań (Polska)

## Podziękowania

Projekt niniejszego protokołu został pierwotnie sporządzony przez: Braasch H, Abteilung für nationale und internationale Angelegenheiten des Pflanzengesundheit, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Stahnsdorfer Damm 81, D-14532 Kleinmachnow (Niemcy), Bürgermeister W i Metge K, 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*. Materiał *B. xylophilus* (forma z mukronem) został zyczliwie udostępniony przez Thomasa Schroedera, JKL, Niemcy.

## 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, Gu J, Burgermeister, W. (2011) *Bursaphelenchus mucronatus kolymensis* comb. n. – new definition of the "European" type of *B. mucronatus*. *J. Nematode Morphology and Systematics*. **14**, 77-90.
- 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. . <http://www.springerlink.com> (dostęp 1 marca 2013)
- Braasch H, Burgermeister W, Pastrik K-H (1995) Differentiation of three *Bursaphelenchus* species by means of RAPD-PCR. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdiensts* **47**, 310-314.
- Braasch H, Metge K, Burgermeister W (1999) [*Bursaphelenchus* species in conifers in Germany and their ITS-RFLP pattern.] *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdiensts* **51**, 312-320 (po niemiecku).
- 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.
- Burgermeister W, Braasch H, Metge K, Gu J, Schröder T., Woldt E (2009): ITS-RFLP analysis, an efficient tool for identification of *Bursaphelenchus* species. *Nematology* **11**, 649-668.
- 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 (1997). *Bursaphelenchus xylophilus*. W: *Quarantine Pests for Europe*, 2<sup>nd</sup> edn, CAB International, Wallingford (Wielka Brytania).
- Evans, H. F., McNamara, D. G., Braasch, H., Chadoeuf, J. & Magnusson, C. 1996. Pest Risk Analysis (PRA) for the territories of the European Union (as PRA area) on *Bursaphelenchus xylophilus* and its vectors in the genus *Monochamus*. *EPPO Bulletin* **26**, 199-249.
- 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 Pflanzenschutzdiensts* **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.
- 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, New York (USA).
- Schröder T, McNamara DG, Gaar V (2009) Guidance on sampling to detect pin wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* in trees, wood and insects. *EPPO Bulletin*. **39**, 179-188.
- Stanton JM, McNicol CD, Steele V (1998) Non-manual lysis of second stage *Meloidogyne* juveniles for identification of pure and mixed samples based on polymerase chain reaction. *Australian Plant Pathology*. **27**, 112-115.
- 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 (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. (2009)

### 1. Informacje ogólne

- 1.1. Ten test został opisany przez Burgermeistera i in. w latach 2005, 2009.
- 1.2. Region poddawany analizie przy użyciu zestawu starterów umiejscowiony jest w regionie 18S - 26S rDNA.
- 1.3. Izolacja kwasu nukleinowego przeprowadzana jest z nicieni w różnym stadium rozwoju.
- 1.4. Rozmiar amplikonu dla siedmiu gatunków z grupy *B. xylophilus* waha się między 950 a 1030 pz.
- 1.5. Zestaw starterów:
  - przedni: 5'-CGT-AAC-AAG-GTA-GCT-GTA-G-3' (Ferris i in., 1993)
  - 26S: 5'-TTT-CAC-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).

Poniżej opisano kilka metod ekstrakcji, które mogą być stosowane:

- **QIAamp DNA Micro Kit, Qiagen**

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 próbce 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 próbce Eppendorfa, a następnie od 20 μl (w przypadku ekstrakcji DNA z pojedynczego nicienia) do 100 μl (w przypadku ekstrakcji DNA z maksimum 30 nicieni) buforu AE (Qiagen) wprowadza się na membranę. Próbka 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°C. Stężenie DNA można określić fluorometrycznie przy użyciu fluorometru DyNA Quant 200 (Hofer/Pharmacia) i barwnika fluoroscencyjnego Hoe 33258.

- **Liza (zmodyfikowano od Stanton i in. 1998)**

Próbki nicieni (1 do 30 osobników) są inkubowane w 20 µl 0,25 M NaOH w 25°C przez 16 godzin i następnie ogrzewano do temperatury 99°C przez 2 min. Próbkę ochłodzono do temperatury pokojowej i dodawano w trakcie vortexowania 20 µl 0,25 M HCl, 5 µl Tris – HCl pH 8.0 oraz 5 µl 2% Tritonu X – 100. Końcowe pH próbki wyniosło 8,0. W oryginalnej metodzie opisanej przez Stanton i in. (1998), NaOH zawierało próbki tylko częściowo zubożone przez dodanie 10 µl zamiast 20 µl 0,25 M HCl co spowodowało, że ostatecznie próbka była silnie alkaliczna z pH w przybliżeniu 12. Za pomocą tej metody z uzyskanego ekstraktu można określić fluorometrycznie stężenie DNA przy użyciu fluorometru DyNA Quant 200 (Hoefer/Pharmacia/GE Healthcare, Monachium, Niemcy) i barwnika fluoroscencyjnego Hoe 33258.

Przy obu metodach ekstrakcji DNA, wystarczająca ilość DNA dla reakcji PCR powinna być uzyskana z pojedynczego nicienia (można zobaczyć opis w sekcji na temat kryteriów wydajności).

Inne metody ekstrakcji DNA z pojedynczego nicienia bez oczyszczania DNA są również opisane.

- Ekstrakcja DNA według Iwahori i in. (2000)

Okaz nicienia *Bursaphelenchus* jest umieszczony w 1 µl wody, pozostawiony do wyschnięcia i rozgnieciony na bibule filtracyjnej. Bibuła filtracyjna z nicieniami działa jak matryca DNA i zostaje natychmiast przeniesiona do próbki PCR gdzie zostaje zmieszana z roztworem do PCR albo podlega ekstrakcji za pomocą buforu PCR skąd powstały ekstrakt stosuje się jako matrycę do reakcji PCR.

- „bufor lizujący dla robaków”

Pojedynczy okaz *Bursaphelenchus* jest umieszczony w 5 µl buforu do lizy, zamrożony w -70°C na 10 min., podgrzany do 60°C przez 1 godzinę, a następnie w temperaturze 95°C przez 15 min w celu uzyskania DNA do reakcji PCR.

## 2.2 Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)

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

Reagent	Stężenie początkowe	Objętość na reakcję (µl)	Końcowe stężenie
Bufor PCR (zawierający 10 mM Tris – HCl, pH 8.8, 50 mM KCl; taki sam dostawca jak w przypadku polimerazy DNA)	10x	5	1x
MgCl <sub>2</sub>	10 mM	12,5*	2,5 mM*
dNTPs (Roche)	25 mM	0,4*	0,2 mM*
Startery (dla każdego)	50 µM	0,6	0,6 µM
Polimeraza DNA (Stratagene lub Fermentas)	5 U µL <sup>-1</sup>	0,4	2 U
DNA		2 ng (objętość zależy od stężenia DNA)	
Woda do biologii molekularnej	nie dotyczy	dopełnić do 50	nie dotyczy
SUMA		50	

\*Kiedy używamy Polimerazę Taq DNA firmy Fermentas (Burgermeister i in., 2009).

### 2.2.2 Parametry reakcji PCR

Wstępna denaturacja w 94°C przez 2,5 min, 40 cykli reakcyjnych w 94°C przez 1 min, 55°C przez 1 min, 72°C przez 2 min i końcowa elongacja w 72°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.

## 2.4 Analiza fragmentów DNA:

Fragmety DNA są rozdzielane w trakcie elektroforezy w żelu agarozowym (odpowiednio 1,8% i 2,5% dla reakcji PCR i RFLP) oraz są one wizualizowane w świetle UV, zgodnie ze standardowymi procedurami (np. Sambrook i in., 1989).

## 3. Istotne informacje na temat procedury

### 3.1. Kontrole

Aby uzyskać wiarygodne wyniki badania powinny być zawarte następujące kontrole zewnętrzne podczas każdej izolacji kwasu nukleinowego i amplifikacji odpowiednio docelowego organizmu i zarazem jego kwasu nukleinowego

- Negatywna kontrola izolacji (z ang. NIC) to monitoring kontaminacji podczas ekstrakcji kwasu nukleinowego: czysta ekstrakcja buforami
- Pozytywna kontrola izolacji (z ang. PIC) aby zapewnić, że izolowany kwas nukleinowy jest w wystarczającej ilości i jakości: ekstrakcja kwasu nukleinowego i następnie amplifikacja DNA docelowego organizmu.
- Negatywna kontrola amplifikacji (z ang. NAC) aby wykluczyć fałszywie pozytywny wynik wynikający z kontaminacji podczas przygotowywania mixu do PCR: do przygotowania mixu należy użyć wody do biologii molekularnej.
- Pozytywna kontrola amplifikacji (z ang. PAC) do monitorowania wydajności amplifikacji: jest to amplifikacja kwasu nukleinowego docelowego organizmu. Ta kontrola może zawierać kwas nukleinowy wyizolowany z docelowego organizmu, cały genom DNA lub syntetyczną kontrolę (na przykład sklonowany produkt PCR).

Jako alternatywę (lub dodatkowo) do zewnętrznych kontroli pozytywnych (z ang. PIC i PAC), można użyć wewnętrzną kontrolę pozytywną (z ang. IPC), która może być wykorzystywana do monitorowania każdej próbki oddzielnie. Może ona zawierać: amplifikację (co-amplification) endogennego kwasu nukleinowego, z użyciem konserwatywnych starterów, które amplifikują konserwatywny lecz niedocelowy fragment kwasu nukleinowego, jednak obecny w badanej próbce (np. eukariotyczny fragment 18S rDNA), amplifikacja próbki wzbogaconej egzogennym kwasem nukleinowym, który nie wchodzi w reakcję z docelowym DNA (np. syntetyczna, wewnętrzna kontrola amplifikacji) albo amplifikacja zdublowanej próbki wzbogacona docelowego DNA.

### 3.2. Interpretacja wyników:

Weryfikacja kontroli:

- NIC i NAC nie powinny zawierać produktu amplifikacji
- PIC i PAC powinny zawierać produkty określonej długości fragmentów restrykcyjnych, które przedstawiono w tabeli 4.
- Gdy odpowiedni IPC był użyty to powinien dać on oczekiwany produkt.

*Gdy te warunki zostały spełnione:*

- Próbka będzie uważana za pozytywną jeżeli uzyskane długości fragmentów restrykcyjnych będą takie jak w tabeli 4.
- Próbka będzie uważana za negatywną, gdy nie będzie żadnych prążków lub będą ale w innych wielkościach.
- Badanie powinno być powtórzone jeżeli uzyskamy jakiegokolwiek sprzeczne bądź niejasne wyniki.



Tabela 4. Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych reakcji RFLP (z Burgermeister i in., 2005, za wyjątkiem przypadków, gdzie podano inaczej)

Gatunek z rodzaju <i>Bursaphelenchus</i>	Produkt PCR (pz)	Fragmenty restrykcyjne (pz)				
		RsaI	HaeIII	MspI	HinfI	AluI
<i>B. conicaudatus</i>	980	510	550	290	270	380
		450	160	200	190	310
				120	90	
<i>B. doui</i> *	981	435	640	328	283	616
		296	205	264	228	365
		228	83	165	209	
		22	53	114	154	
				110	83	24
<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	90
<i>B. mucronatus</i> typ azjatycki	950	500	620	370	410	700
		410	310	310	250	250
				280	130	90
<i>B. singaporensis</i> *	914	474	800	299	494	357
		418	532	254	261	209
		22	268	237	135	195
			114	124	24	153
<i>B. xylophilus</i>	950	500	730	570	270	460
		420	200	380	260	250
					140	140
					100	

\*Burgermeister i in. (2009) zawarli informację, że wielkości par zasad (pz) zostały opisane na podstawie analiz sekwencjonowania a niektóre prążki mogą nie być widoczne po elektroforezie (np. za małe wielkości prążków lub są one zbyt blisko siebie).

#### 4. Dostępne parametry walidacyjne metody

Następujące kryteria zostały przekazane przez Anses – Laboratorium Zdrowia Roślin (Francja) w maju 2011:

4.1. Czulość metody  
5 nicieni.

4.2. Specyficzność metody

W publikacji Burgermeister i in. (2009) badanie było oceniane z użyciem 44 gatunków *Bursaphelenchus*, wśród których było 7 z 9 gatunków grupy *B. xylophilus*: *B. conicaudatus*, *B. doui*, *B. fraudulentus*, *B. luxuriosae*, *B. mucronatus*, *B. singaporensis* i *B. xylophilus*.

Dane walidacji z Francji:

Było badanych 7 docelowych i 15 niedocelowych populacji (tabela 5). Nie zaobserwowano żadnych reakcji krzyżowych.

Tabela 5. Lista gatunków użytych podczas walidacji.

Numer identyfikacyjny	Gatunek	Położenie geograficzne	Numer identyfikacyjny	Gatunek	Położenie geograficzne
04-415-1	<i>B. xylophilus</i>	Kanada	04-421-1	<i>B. mucronatus</i>	Francja
08-1063-1 (J10)	<i>B. xylophilus</i>	Azja	05-948-1	<i>B. mucronatus</i>	Francja
08-104-1	<i>B. xylophilus</i>	Chiny	04-1245-1	<i>B. mucronatus</i>	Francja
05-54-1	<i>B. xylophilus</i>	Portugalia	09-376-1 (J13)	<i>B. mucronatus</i>	Azja
08-746-1	<i>B. xylophilus</i>	Chiny	08-767-1	<i>B. mucronatus</i>	Chiny
08-747-1	<i>B. xylophilus</i>	Japonia	08-770-1	<i>B. mucronatus</i>	Japonia
09-374-1	<i>B. xylophilus</i>	Kanada	06-1284-1	<i>B. sexdentati</i>	Francja
09-85-1	<i>B. doui</i>		06-1285-1	<i>B. sexdentati</i>	Francja
09-89-1	<i>B. fraudulentus</i>		07-1052-1	<i>B. sp.</i>	Francja
09-90-1	<i>B. singaporensis</i>		06-1280-1	<i>B. sp.</i>	Francja
09-91-1	<i>B. macromucronatus</i>		06-1674-1	<i>B. sp.</i>	Chiny

4.3. Powtarzalność metody  
100% .

4.4. Odtwarzalność metody  
100% dla 5 osobników.

## 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. Zestaw starterów odnosi się do rodziny satelitarnego DNA charakterystycznej dla *Bursaphelenchus xylophilus*.
- 1.3. Kwas nukleinowy pochodził z nicieni w różnym stadium rozwojowym.
- 1.4. Amplikon stanowi drabinka multimerów składających się z jednostkowych monomerów o wielkości (160; 320; 480 pz ....).
- 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, Francja) używana jest do amplifikacji.
- 1.7. Końcowe stężenie każdego z używanych nukleotydów wynosi 0,2 μM.
- 1.8. Woda do testów molekularnych (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 probówki 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<sup>-1</sup> 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. Uzyskana w ten sposób zawiesina DNA jest używana jako analizowany materiał (szablon) w specyficznej reakcji PCR.

#### 2.2 Reakcja łańcuchowa polimerazy

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

Reagent	Stężenie początkowe	Objętość na reakcję (μl)	Końcowe stężenie
Bufor PCR (zawierający 10 mM Tris – HCl, pH 8,2, 50 mM KCl)	10x	2,5	1x
MgCl <sub>2</sub>	10 mM*	6,25	2,5 mM
dNTPs (Roche)	25 mM*	0,2	0,2 mM
Startery (dla każdego)	50 μM*	0,74	250 ng ekwiwalent 1,48 μM
Polimeraza DNA (MP Biomedicals lub Qbiogene)	5 U μL <sup>-1</sup>	0,2	1 U
DNA		10 ng (objętość zależy od stężenia DNA)	
Woda do biologii molekularnej		Dopełnić do 25	
SUMA		25	

\*Podano na przykładzie analiz laboratoryjnych

### 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.

### 2.2.3 Analiza fragmentów DNA

Fragmenty DNA są rozdzielane podczas elektroforezy w żelu agarozowym (2,5%) i są one wizualizowane w świetle UV, zgodnie ze standardowymi procedurami (np. Sambrook i in., 1989).

## 3. Istotne informacje na temat procedury

### 3.1. Kontrole

Aby uzyskać wiarygodne wyniki badania podczas każdej izolacji kwasu nukleinowego i amplifikacji DNA docelowego organizmu powinno się załączyć następujące kontrole zewnętrzne:

- Negatywna kontrola izolacji (z ang. NIC) to monitoring kontaminacji podczas ekstrakcji kwasu nukleinowego: czysta ekstrakcja buforami
- Pozytywna kontrola izolacji (z ang. PIC) aby zapewnić, że izolowany kwas nukleinowy jest w wystarczającej ilości i jakości: ekstrakcja kwasu nukleinowego i następnie amplifikacja DNA docelowego organizmu.
- Negatywna kontrola amplifikacji (z ang. NAC) aby wykluczyć fałszywie pozytywny wynik wynikający z kontaminacji podczas przygotowywania mixu do PCR: do przygotowania mixu należy użyć wody do biologii molekularnej.
- Pozytywna kontrola amplifikacji (z ang. PAC) to monitoring wydajności amplifikacji: jest to amplifikacja z kwasem nukleinowym docelowego organizmu. Ta kontrola może zawierać kwas nukleinowy wyizolowany z docelowego organizmu, cały genom DNA wyizolowany z porażonej tkanki gospodarza, cały zamplifikowany genom DNA lub syntetyczną kontrolę (na przykład sklonowany produkt PCR). Dla reakcji PCR nie przeprowadzonych na wyizolowanych organizmach, najlepiej byłoby, gdyby kontrola pozytywna amplifikacji PAC była blisko granicy wykrywalności.

Jako alternatywę (lub dodatkowo) do zewnętrznych kontroli pozytywnych (z ang. PIC i PAC), dodaje się wewnętrzną kontrolę pozytywną (z ang. IPC), która może być wykorzystywana do monitorowania każdej próbki oddzielnie. Pozytywna wewnętrzna kontrola może albo być genami obecnymi w matrixowym DNA lub być dodana do zawiesiny DNA.

Alternatywna wewnętrzna pozytywna kontrola może zawierać: specyficzną amplifikację albo amplifikację (co-amplification) endogennego kwasu nukleinowego, z użyciem konserwatywnych starterów, które amplifikują konserwatywny lecz niedocelowy fragment kwasu nukleinowego, jednak obecny w badanej próbce (np. eukariotyczny fragment 18S rDNA), amplifikacja próbki wzbogaconej egzogennym kwasem nukleinowym (kontrola sekwencji), który nie wchodzi w reakcję z docelowym DNA (np. syntetyczna wewnętrzna kontrola amplifikacji) albo amplifikacja zdublowanej próbki wzbogacona docelowego DNA.

### 3.2. Interpretacja wyników:

Weryfikacja kontroli:

- NIC i NAC nie powinny zawierać produktu amplifikacji
- PIC i PAC powinny zawierać produkty wynikające z amplifikacji drabinki multimerów składających się z jednostkowych monomerów o wielkości 160 pz. uzyskanych po reakcji PCR
- Gdy odpowiedni IPC był użyty to powinien dać on oczekiwany produkt.

Gdy te warunki zostały spełnione:

- Próbkę będzie uważana za pozytywną jeżeli amplifikacja drabinki multimerów składających się z jednostkowych monomerów o wielkości 160 pz zostanie uzyskana po reakcji PCR
- Próbkę będzie uważana za negatywną, gdy nie będzie żadnych prążków lub nie będą odpowiadały wyznaczonemu wzorcowi drabinki prążków.
- Badanie powinno być powtórzone jeżeli uzyskamy jakiegokolwiek sprzeczne bądź niejasne wyniki.

#### 4. Dostępne parametry walidacyjne metody

Następujące kryteria zostały przedstawione przez Anses – Laboratorium Zdrowia Roślin (Francja) w maju 2011

- 4.1. Czulość metody  
2 - 5 nicieni.
- 4.2. Specyficzność metody  
Castagnone i in. (2005), przedstawili, że badanie oceniono na podstawie czterech gatunków *Bursaphelenchus*, *B. leoni*, *B. mucronatus*, *B. tusciae*, *B. xylophilus* (3 izolaty). Podczas badań walidacyjnych przeprowadzonych przez ANSES – LSV (2011) 7 docelowych populacji zostało przeanalizowanych a 15 niedocelowych (patrz tabela 5) nie. Nie zaobserwowano żadnych reakcji krzyżowych.
- 4.3. Powtarzalność metody  
100% .
- 4.4. Odtwarzalność metody  
95,8% dla 2 nicieni. 100 % dla 5 nicieni.

## Dodatek 3 - Protokół real time PCR (François i in., 2007)

### 1. Informacje ogólne

- 1.1. Ta metoda została opracowana przez François i in., 2007.
- 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 77pz, o sekwencji monomerycznej jednostki MspI satelitarnego DNA *Bursaphelenchus xylophilus* (kod dostępu L09652).
- 1.4. Rozmiar amplikonu wynosi 77 pz.
- 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 (MJ Research) i amplifikatora SmartCycler II (Cepheid, Sunnyvale, CA) w celu analizy materiału wyekstrahowanego z drewna i przeprowadzenia porównań wyników analiz prowadzonych na pojedynczych osobnikach nicieni.
- 1.10. Przy użyciu urządzenia Opticon 2 (MJ Research), dane były analizowane za pomocą oprogramowania Option 2 Monitos software wersja 3.1 według instrukcji producenta (MJ Research).

Badanie zostało przeprowadzone z nicieni a także bezpośrednio ze sztucznie porażonego drewna. Uzupełniające informacje na temat izolacji DNA, zrobienia Martermixu do reakcji real time PCR są dostępne w oryginalnym artykule dotyczącym korzystania z tego badania jak i z narzędzi detekcyjnych. Jakkolwiek w tym protokole ta analiza jest rekomendowana do identyfikacji wyizolowanych nicieni.

### 2. Metody

#### 2.1. Ekstrakcja kwasu nukleinowego z izolowanych nicieni.

Genomowy DNA łącznie z różnych nicieni z każdego izolatu 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, patrz dodatek 2) z drobnymi modyfikacjami. W odróżnieniu do protokołu oryginalnego, objętość używanego buforu do lizy (lysis buffer) 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)  
W celu identyfikacji wyizolowanych nicieni, urządzenie MJ Research jest wykorzystywane z następującymi warunkami.

2.2.1 Mieszanina master mix (stężenie na 25- $\mu$ L w przypadku pojedynczej reakcji, na sprzęcie firmy MJ Research)

Reagent	Stężenie początkowe	Objętość na reakcję ( $\mu$ l)	Końcowe stężenie
Woda do biologii molekularnej		17,6	
Bufor PCR (zawierający 10 mM Tris – HCl, pH 8.2, 50 mM KCl, qPCR core kit firmy Eurogentec)	10x	2,5	1x
MgCl <sub>2</sub> (Eurogentec)	50 mM	2,5	5 mM
dNTPs (Eurogentec)	5 mM	1	0,2 mM
Startery (dla każdego)	50 $\mu$ M*	0,1	200 nM
Sonda Probe BsatS	50 $\mu$ M*	0,1	200 nM
HotGoldStar Polimeraza DNA (Eurogentec qPCR core kit)	5 U $\mu$ L <sup>-1</sup>	0,2	1 U
Podsuma		24	
DNA (matryca genomowego DNA)		1	
SUMA		25	

\*Podano na przykładzie analiz laboratoryjnych

2.2.2 Parametry reakcji PCR, na sprzęcie firmy MJ Research.

Wstępna denaturacja w 95°C przez 10 min, 30 cykli reakcyjnych w 95°C przez 15 s, 59°C przez 30 s, pomiar fluorescencji jest wykonany podczas anilingu/ elongacji w 59°C.

### 3. Istotne informacje nt. procedury

#### 3.1. Kontrole

Aby uzyskać wiarygodne wyniki badania powinny być zawarte następujące kontrole zewnętrzne podczas każdej izolacji kwasu nukleinowego i amplifikacji odpowiednio docelowego organizmu i zarazem jego kwasu nukleinowego

- Negatywna kontrola izolacji (z ang. NIC) to monitoring kontaminacji podczas ekstrakcji kwasu nukleinowego: czysta ekstrakcja buforami.
- Pozytywna kontrola izolacji (z ang. PIC) aby zapewnić, że izolowany kwas nukleinowy jest w wystarczającej ilości i jakości: ekstrakcja kwasu nukleinowego i następnie amplifikacja DNA docelowego organizmu.
- Negatywna kontrola amplifikacji (z ang. NAC) aby wykluczyć fałszywie pozytywny wynik wynikający z kontaminacji podczas przygotowywania mixu do PCR: do przygotowania mixu należy użyć wody do biologii molekularnej.
- Pozytywna kontrola amplifikacji (z ang. PAC) to monitoring wydajności amplifikacji: jest to amplifikacja z kwasem nukleinowym docelowego organizmu. Ta kontrola może zawierać kwas nukleinowy wyizolowany z docelowego organizmu, cały genom DNA wyizolowany z porażonej tkanki gospodarza, cały zamplifikowany genom DNA lub syntetyczną kontrolę (na przykład sklonowany produkt PCR).

### 3.2. Interpretacja wyników

Cykl wartości odcięcia (cut off value) dla *B. xylophilus* przypada na  $25.58 \pm 2.35$  i został ustawiony na podstawie analizy przeprowadzonej za pomocą sprzętu/ materiałów i odczynników opisanych w tym rozdziale. Kiedy jest konieczność to punkt Ct powinien być wyznaczony przez wymaganą kontrolę wewnętrzną. Punkt Ct odcięcia powinien być zweryfikowany w każdym laboratorium przy wdrażaniu testu po raz pierwszy.

Weryfikacja kontroli:

- Krzywe PIC i PAC powinny być wykładnicze.
- NIC i NAC powinny dać wynik negatywny (Ct > od wartości odcięcia).
- PIC i PAC powinny mieć Ct poniżej wartości odcięcia.

Gdy te warunki są spełnione:

- Badanie będzie uważane za pozytywne, jeżeli powstanie wyraźna krzywa wykładnicza amplifikacji z punktem Ct poniżej wartości odcięcia.
- Badanie będzie uważane za negatywne, jeżeli nie powstanie wyraźna krzywa wykładnicza amplifikacji a punkt Ct będzie równy lub znajdzie się powyżej wartości odcięcia (cut off value).
- Badanie powinno się powtórzyć, jeżeli pojawią się jakiegokolwiek sprzeczności lub niejasności.

## 4. Dostępne parametry walidacyjne metody

Następujące kryteria zostały przedstawione w oryginalnym artykule (Francois i in., 2007).

### 4.1. Czułość metody

Czułość metody/granica wykrywalności: 1 pg DNA (3 powtórzenia w oddzielnych doświadczeniach)

### 4.2. Specyficzność metody

Specyficzność: osiągnięta na podstawie badania dziesięciu innych gatunków *Bursaphelenchus*, a także na podstawie badania mieszaniny zmieszanych nicieni (1% *B. xylophilus* z *B. mucronatus* pozytywnie wykrytym; możliwość wykrycia nawet 0,01% DNA *B. xylophilus* wśród DNA *B. mucronatus*).

### 4.3. Powtarzalność metody

Uzyskano 100% czułości na podstawie doświadczenia powtarzanego trzykrotnie. Ten protokół poddano do wykonania w ramach projektu EU PORTCHECK z użyciem SmartCycler i specyficznego mastermixu (Takara mix).



## Dodatek 4 - Protokół real time PCR do bezpośredniego wykrywania nicieni w materiale wyekstrahowanym z drewna

### 1. Informacje ogólne

- 1.1. Ten protokół został rozwinięty przez Anses-LSV (Francja) w latach 2009-2011, na podstawie testu opracowanego przez François i in. (2007).
- 1.2. Test oceniano na podstawie analizy *B. xylophilus* (7 populacji), *B. mucronatus* (6 populacji), *B. doui*, *B. fraudulentus*, *B. macromucronatus*, *B. singaporensis*, *B. sexdentati* (2 populacje), *Bursaphelenchus sp.* (3 populacje).
- 1.3. Starter amplifikuje region o długości 77 pz docelowej sekwencji *Bursaphelenchus xylophilus* MspI jednostki monomerycznej satelitarnego DNA (numer dostępu L09652) Dodatkowo uniwersalny starter region 18SrDNA będący u Eukariota, jest zawarty w badaniach jako kontrola pozytywna.
- 1.4. Długość amplikonu dla docelowego nicienia ma 77 pz długości a 150 pz dla uniwersalnej kontroli.
- 1.5. Zestaw starterów i sondy (Eurogentec):  
Startery:  
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-BHQ1-3'  
Uniwersalny zestaw starterów i sondy (Eurogentec):  
Startery:  
18 S uni-F 5'-GCA-AGG-CTG-AAA-CTT-AAA-GGA-A-3';  
18S uni-R 5'-CCA-CCA-CCC-ATA-GAA-TCA-AGA-3'  
Sonda: 18S uni-P 5'-JOE-ACG-GAA-GGG-CAC-CAC-CAG-GAG-T-BHQ1-3'
- 1.6. Polimeraza Taq DNA: Lightcycler® 480 probes master (2x skoncentrowany, gotowa do użycia hot-start PCR mix, Roche diagnostics), zawierając FastStart Taq DNA polimerazę, bufor reakcyjny, dNTP mix (z dUTP zamiast dTTP) i 6,4 mM MgCl<sub>2</sub>.
- 1.7. Do przygotowania mixu należy użyć wodę do biologii molekularnej.
- 1.8. Badanie doskonalono i oceniano za pomocą urządzenia Lightcycler® 32 kapilarny (Roche) and Lightcycler® LC480 dołkowy (Roche). Solidność również oceniono na innych aparatach do PCR (patrz punkt 4).
- 1.9. Dla urządzenia Lightcycler® 32 kapilarnego (Roche), użyto oprogramowania Lightcycler® 4.1 z automatycznymi ustawieniami analizy. For Lightcycler® LC480 dołkowego (Roche), użyto oprogramowania Lightcycler® 480 wydanie 1.5.0 z również automatycznymi ustawieniami analizy.

### 2. Metody

2.1. Izolacja i oczyszczanie kwasów nukleinowych.

Do ekstrakcji DNA użyto QIAamp® DNA mini kit firmy Qiagen.

Izolację DNA wykonano z nicieni uzyskanych podczas ich ekstrakcji z drewna.

Przed ekstrakcją DNA należy zrobić kilka kroków, takich jak:

- Ekstrakt nicieni jest przetwarzany w próbówce ze stożkowym dnem (co najmniej 30 ml) przez okres co najmniej 3 godzin, w celu wytworzenia „depozytu” zawierającego nicienie. W przybliżeniu 1,5 ml ostrożnie usunąć znad osadu i przenieść do 2 ml próbówki. Taką próbkę zwirować w 15000 g przez 10 min i odrzucić supernatant. Na tym etapie, próbki mogą być przechowywane w zamrażarce, do czasu dalszego przetwarzania

- Mechaniczną ekstrakcję przeprowadza się z szklanymi kulkami (1 kulka o wielkości 3 mm i kilka kulek po 1 mm, firmy Sigma); Te kulki należy dodać do każdej próbki. Ponadto należy również dodać do próbki przed włączeniem rozbijania ich kulkami (30 uderzeń na sekundę przez 40 sekund) 180 µl buforu lizującego (oznaczony jako ATL w zestawie do# izaolacji) i 20 µl proteiny K (odczynnik dostarczony w zestawie QIAmp firmy Qiagen). Procedura ekstrakcji DNA jest następnie kontynuowana przez przeniesienie zawartości z próbki na dołączoną kolumnę z zestawu QIAmp Qiagen. Ekstrakcja DNA przebiega według rekomendowanej procedury zestawu QIAmp Qiagen kit (Instrukcja zapewniona przez QiagenThird, wersja z kwietnia 2010. Protokół: Oczyszczanie DNA z tkanek (DNA Purification from Tissues QIAamp DNA Mini Kit).

## 2.2 Reakcja łańcuchowa polimerazy Real time PCR

2.2.1 Master mix (koncentracja na 20 µl przy pojedynczej reakcji na urządzeniu Lightcycler LC480 (Roche Diagnostics).

Preferuje się, aby analiza była w duplikacji (2 dołki na jedną próbkę w przeprowadzonym badaniu).

Reagent	Wyjściowa koncentracja	Objętość na reakcję (µL)	Końcowa koncentracja
Woda do biologii molekularnej		4,44	N.A.
Real time PCR mix zawierający MgCl <sub>2</sub> , hot start DNAPolimerazę, dNTPs (Roche)	2 x	10	1x
BsatF	50 µM	0,12	0,3 µM
BsatR	50 µM	0,12	0,3 µM
BsatS	50 µM	0,04	0,1 µM
18SuniF	50 µM	0,12	0,3 µM
18SuniR	50 µM	0,12	0,3 µM
18SuniP	50 µM	0,04	0,1 µM
Podsuma		15	
DNA		5	
Suma		20	

### 2.2.2. Parametry reakcji PCR.

Wstępna denaturacja w 95°C przez 10 min, 35 cykli w 95°C przez 15s, 60°C przez 1 min, pomiar fluorescencji następuje podczas anilingu/ elongacji (60°C).

## 3. Istotne informacje na temat procedury

### 3.1. Kontrole:

Aby uzyskać wiarygodne wyniki badania powinny być zawarte następujące kontrole podczas każdej izolacji kwasu nukleinowego i amplifikacji odpowiednio docelowego organizmu i zarazem jego kwasu nukleinowego

- Negatywna kontrola izolacji (z ang. NIC) w celu monitorowania kontaminacji docelowym DNA *B. xylophilus*, podczas izolacji kwasu nukleinowego: izolacja kwasu nukleinowego i późniejsza amplifikacja nieskażonej próbki tkanką gospodarza (kiedy mamy doczynienia z materiałem roślinnym) lub czysty bufor ekstrakcyjny.
- Pozytywna kontrola izolacji (z ang. PIC) aby zapewnić, że wyizolowano kwas nukleinowy o wystarczającej jakości i ilości: w naszym przypadku, zastosowanie konserwowanych starterów do amplifikacji konserwatywnego niedocelowego regionu kwasu nukleinowego, świadczącego o obecności DNA w próbce (region eukariotyczny 18S rDNA) potwierdza skuteczność izolacji DNA.
- Negatywna kontrola amplifikacji (z ang. NAC) aby wykluczyć fałszywie pozytywne wyniki ze względu na kontaminację podczas przygotowywania mixu: Do przygotowania mieszaniny reakcyjnej zaleca się używanie wody do biologii molekularnej.

- Pozytywna kontrola amplifikacji (z ang. PAC) w celu monitorowania prawidłowego przebiegu amplifikacji: Amplifikacja kwasu nukleinowego docelowego organizm. Ta kontrola może zawierać DNA wyizolowane z docelowo badanego organizmu, cały genom amplifikowanego DNA, albo syntetyczną kontrolę (na przykład wklonowany produkt PCR).

### 3.2. Interpretacja wyników

Cykl na podstawie którego ustalono wartość odcięcia (cut off value) dla *Bursaphelenchus xylophilus* przypada na 25 i został ustawiony na podstawie analizy przeprowadzonej za pomocą sprzętu/ materiałów i odczynników opisanych w tym rozdziale. Kiedy jest konieczność to punkt Ct wartości odcięcia powinien być wyznaczony przez wymaganą kontrolę wewnętrzną. Punkt Ct odcięcia powinien być zweryfikowany w każdym laboratorium przy wdrażaniu testu po raz pierwszy.

Weryfikacja kontroli:

- NIC i NAC powinny dać wynik negatywny (Ct > od wartości odcięcia).
- Krzywe PIC i PAC powinny być wykładnicze.
- PIC i PAC powinny mieć Ct poniżej wartości odcięcia.

Gdy te warunki są spełnione:

- Badanie będzie uważane za pozytywne, jeżeli powstanie wyraźna krzywa wykładnicza amplifikacji z punktem Ct poniżej < 25 dla *B. xylophilus* przy zastosowaniu starterów i sondy.
- Badanie będzie uważane za negatywne, jeżeli produkt będzie miał punkt Ct będzie równy 25 lub więcej dla *B. xylophilus* i wartość Ct <30 dla wewnętrznej kontroli/ 18S z uniwersalnymi primerami i sondą.
- Badanie powinno się powtórzyć, jeżeli pojawią się jakiegokolwiek sprzeczności lub niejasności.

## 4. Dostępne parametry walidacyjne metody

Następujące wyniki zostały przedstawione w przez Anses – Plant Health Laboratory (Francja), w maj 2011.

### 4.1. Czułość metody

Jeden nicien (bez względu na etap rozwoju)

### 4.2. Specyficzność metody

Siedem populacji docelowych oraz 15 populacji innych niż docelowe (patrz tabela 5) były analizowane i nie zauważono reakcji krzyżowych. Ponadto przebadano około 500 rutynowych próbek drewna (certyfikowanych, wolnych od docelowo badanego nicienia) i nie uzyskano fałszywie dodatnich wyników.

### 4.3. Powtarzalność metody

100 % na 1 organizm.

### 4.4. Odtwarzalność metody

100 % na 1 organizm.