

Ten protokół diagnostyczny został przyjęty przez Komitet ds. Standardów w imieniu Komisji ds. Środków Fitosanitarnych w sierpniu 2015.

Ten załącznik jest normatywną częścią ISPM 27.

ISPM 27

PROTOKOŁY DIAGNOSTYCZNE DLA ORGANIZMÓW PODLEGAJĄCYCH PRZEPISOM

DP 8: *Ditylenchus dipsaci* i *Ditylenchus destructor*

Przyjęto 2015; opublikowano 2016

Spis treści

1. Informacje nt. agrofagów	3
1.1 <i>Ditylenchus dipsaci</i>	3
1.2 <i>Ditylenchus destructor</i>	4
2. Informacje taksonomiczne.....	5
3. Wykrywanie.....	5
3.1 Żywiciele i objawy	6
3.1.1 <i>Ditylenchus dipsaci</i>	6
3.1.2 <i>Ditylenchus destructor</i>	11
3.2 Ekstrakcja nicieni.....	12
3.2.1 Ekstrakcja z cebul i czosnku	12
3.2.2 Ekstrakcja z gleby i materiału roślinnego	12

4. Identyfikacja	14
4.1 Identyfikacja na podstawie cech morfologicznych.....	15
4.1.1 Preparowanie osobników.....	15
4.1.2 Morfologiczne cechy diagnostyczne	16
4.2 Identyfikacja molekularna.....	21
4.2.1 <i>Ditylenchus dipsaci</i>	21
4.2.2 <i>Ditylenchus destructor</i>	22
4.2.3 Ekstrakcja DNA.....	22
4.2.4 Test ITS-rRNA PCR-RFLP dla <i>D. dipsaci</i> i <i>D. destructor</i>	22
4.2.5 Test SCAR PCR dla <i>D. dipsaci</i>	23
4.2.6 Test PCR specyficzny dla 18S i ITS1 dla <i>D. dipsaci</i>	24
4.2.7 Test PCR specyficzny dla 5.8S rDNA dla <i>D. dipsaci</i>	25
4.2.8 Test PCR specyficzny dla 5.8S rDNA i ITS dla <i>D. dipsaci</i>	26
4.2.9 Test SCAR PCR dla <i>D. dipsaci</i>	27
4.2.10 Kontrole w testach molekularnych.....	27
4.2.11 Interpretacja wyników konwencjonalnego PCR.....	28
5. Zapisy.....	28
6. Punkty kontaktowe do uzyskania dalszych informacji.....	28
7. Podziękowania	29
8. Materiały źródłowe.....	29
9. Ilustracje	36

1. Informacje nt. agrofagów

Gatunki z dużego rodzaju *Ditylenchus* Filipjev, 1936 występują na całym świecie, a większość gatunków to mikofagi. Jakkolwiek, rodzaj ten obejmuje kilka gatunków, które mają duże znaczenie jako szkodniki roślin wyższych (Sturhan i Brzeski, 1991). Należy przy tym nadmienić, że chociaż pewne rośliny (np. burak, lucerna, koniczyna) są porażane zarówno przez *Ditylenchus dipsaci* jak i *Ditylenchus destructor*, te dwa gatunki rzadko występują razem na tej samej roślinie (Andrássy i Farkas, 1988).

1.1 *Ditylenchus dipsaci*

D. dipsaci sensu lato (s.l.), lub niszczyk zjadliwy, poraża ponad 1 200 gatunków roślin dziko rosnących i uprawnych. Wiele gatunków chwastów i traw jest żywicielami tego nicienia i może odgrywać ważną rolę w jego przeżywaniu przy nieobecności roślin uprawnych. Analizy morfologiczne, biochemiczne, molekularne i kariologiczne różnych populacji i ras *D. dipsaci s.l.* wykazały, że gatunek ten stanowi kompleks przynajmniej 30 ras związanych z różnymi żywicielami, a zakres żywicieli poszczególnych ras jest ograniczony. Jeszke i in., (2013) podzielili ten kompleks na dwie grupy, z których pierwsza zawiera populacje diploidalne charakteryzujące się „normalną” wielkością i jest określana jako *D. dipsaci sensu stricto (s.s.)*. Ta grupa obejmuje większość znalezionych jak dotąd populacji nicienia. Druga grupa jest poliploidalna i obecnie obejmuje gatunki *Ditylenchus gigas* Vovlas et al., 2011 („rasa olbrzymia” *D. dipsaci* pasożytnicza na *Vicia faba* (bób, bobik), *D. weischeri* Chizhov et al., 2010 (pasożytniczy na *Cirsium arvense* (ostrożeń polny)) i trzy nieopisane *Ditylenchus* spp. zwane D, E i F, które występują odpowiednio na roślinach z rodzin *Fabaceae*, *Asteraceae* i *Plantaginaceae* (Jeszke i in., 2013). Spośród tych gatunków tylko *D. dipsaci s.s.* i jego morfologicznie dłuższa odmiana *D. gigas* są agrofagami o znaczeniu gospodarczym. Ten protokół, zawiera informacje nt. odróżnienia *D. dipsaci s.s.* i *D. gigas*.

D. dipsaci rozwija się głównie jako endopasożyt nadziemnych części roślin (łodygi, liście i kwiaty), lecz poraża też cebule, bulwy i kłącza. Ponadto nicienia tego spotyka się w nasionach *V. faba*, *Medicago sativa* (lucerna), *Allium cepa* (cebula), *Trifolium* spp. (koniczyna), *Dipsacus* spp. (szczęć) i *Cucumis melo* (melon) (Sousa i in., 2003; Sikora i in., 2005). Bardzo duże znaczenie ma fakt, że osobniki młodociane czwartego stadium mogą przetrwać wysychanie przez długi okres czasu, czasem 20 lat i więcej (Barker i Lucas, 1984). Nicienie w stadium przetrwalnikowym grupują się w postaci „waty z nicieni”, gdy tkanka roślinna zaczyna wysychać (rys. 1). Tę watę można często zauważyć na nasionach w silnie porażonych strąkach i suchych resztkach roślinnych (które pozostają na polu po zbiorach). Obecność w nasionach i suchym materiale roślinnym infekcyjnych osobników młodocianych czwartego stadium jest bardzo istotne w pasywnym przenoszeniu nicieni na dużą odległość. Nicienie w stanie wysuszonym mogą przetrwać przejście przez układ pokarmowy trzody chlewnej i bydła na lub w porażonych nasionach (Palmisano i in., 1971).

Chociaż *D. dipsaci* jest uważany za szkodnika roślin wyższych, Viglierchio (1971) odnotował, że kalifornijska populacja *D. dipsaci* z *Allium sativum* (czosnek) była w stanie rozwijać się na grzybach (*Verticillium* i *Cladosporium*) w warunkach laboratoryjnych.

D. dipsaci jest znany jako wektor przenoszący na zewnątrz ciała bakteryjne patogeny roślin (np. *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* (syn. *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosum*, *Corynebacterium insidiosum*), wywołujący więdnienie lucerny).

Według EPPO (2013a), *D. dipsaci* występuje w następujących regionach geograficznych (z wyłączeniem przechwyceń): Europa, Azja, Afryka, Ameryka Północna, Ameryka Środkowa i Karaiby, Ameryka Południowa i Oceania.

1.2 *Ditylenchus destructor*

D. destructor lub niszczyk ziemniaczak atakuje prawie wyłącznie podziemne części roślin (tj. bulwy, kłącza i podziemne części roślin przypominające łodygi). Jest on gatunkiem prawie kosmopolitycznym, powszechnie występującym w regionach o klimacie umiarkowanym i jest odpowiedzialny za poważne straty w produkcji ziemniaków i chmielu (EPPO, 2013a). Zakres żywicieli tego gatunku jest bardzo szeroki i obejmuje ponad 90 gatunków roślin, które obejmują rośliny ozdobne, uprawne i chwasty. Głównym żywicielem jest *Solanum tuberosum* (ziemniak), a na porażonych bulwach tej rośliny rozwija się mokra lub sucha zgnilizna, która rozprzestrzenia się na inne bulwy w przechowalni. W pewnych warunkach organizmy wywołujące mokrą zgniliznę mogą doprowadzić do intensywnego zniszczenia bulw, ale także zabicia nicieni. *D. destructor* może przeżyć tylko wtedy, gdy do bulwy przenikną tylko organizmy wywołujące suchą zgniliznę. Rojankovski i Ciurea (1986) wykryli 55 gatunków bakterii i grzybów związanych z występowaniem *D. destructor* w bulwach *S. tuberosum*, przy czym najczęściej notowane były *Fusarium* spp. innymi powszechnie notowanymi żywicielami są: *Ipomoea batatas* (bataty), irys cebulowy (mieszaniec i materiał wyselekcjonowany z *Iris xiphium* i *Iris xiphioides*), *Taraxacum officinale* (mniszek pospolity), *Humulus lupulus* (chmiel), *Tulipa* spp. (tulipan), *Leopoldia comosa* (szafirek miękkolistny), *Hyacinthus orientalis* (hiacynt), *Gladiolus* spp. (mieczyk), *Dahlia* spp. (dalia), *Coronilla varia* (cieciorka pstra), *Anthyllis vulneraria* (przelot pospolity), *Beta vulgaris* (burak cukrowy, pastewny i ćwikłowy), *Calendula officinalis* (nagietek lekarski), *Daucus carota* (marchew), *Petroselinum crispum* (pietruszką) oraz *Trifolium* spp. (koniczyna, biała, czerwona i białoróżowa) (Sturhan i Brzeski, 1991). Przy nieobecności roślin wyższych *D. destructor* z łatwością namnaża się na około 70 gatunków grzybów i stwierdzono niszczenie przez niego strzępek grzybów uprawnych (Sturhan i Brzeski, 1991). Gatunek ten jest w stanie przeżyć wysychanie i niskie temperatury, lecz nie tworzy „waty z nicieni”, tak jak *D. dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 1936. Jakkolwiek, wspomniany gatunek zimuje w stadium jaja i w konsekwencji jaja *D. destructor* charakteryzują się większą przeżywalnością niż jaja *D. dipsaci*. *D. destructor* w ziemniakach i cebulach kwiatowych jest organizmem podlegającym przepisom w wielu krajach (Sturhan i Brzeski, 1991). *D. destructor* został stwierdzony na *Arachis hypogaea* (orzech ziemny) w RPA, lecz obecnie uważa się, że przypadki te dotyczą występowania oddzielnego gatunku

Ditylenchus africanus Wendt, Swart, Vrain and Webster, 1995, który jest morfologicznie podobny do *D. destructor*.

Według EPPO (2013a), *D. destructor* występuje w następujących regionach geograficznych (z wyłączeniem przechwyceń): Europa, Azja, Afryka Południowa, Ameryka Północna, Ameryka Południowa i Oceania.

2. Informacje taksonomiczne

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

Synonimy: Synonimy typowego gatunku *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 1936 podane są przez Siddiqi (2000)

Stanowisko taksonomiczne: Nematoda, Secernentea, Diplogasteria, Tylenchida, Tylenchina, Tylenchoidea, Anguinidae

Nazwy zwyczajowe: Stem nematode, stem and bulb eelworm (angielskie) (Sturhan i Brzeski, 1991)

Uwaga: *D. dipsaci* jest obecnie uważany za gatunek złożony składający się z dużej liczby ras biologicznych i populacji różniących się głównie w zakresie preferencji żywicieli. W konsekwencji, łącznie 13 nominalnych gatunków zsynonimizowano z *D. dipsaci* i w oparciu o zakres żywicieli i wyróżniono do 30 ras biologicznych, których nazwy pochodzą od nazwy głównej rośliny żywicielskiej.

Nazwa: *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945

Synonimy: brak

Stanowisko taksonomiczne: Nematoda, Secernentea, Diplogasteria, Tylenchida, Tylenchina, Tylenchoidea, Anguinidae

Nazwy zwyczajowe: Tuber-rot eelworm, potato rot nematode (angielskie) (Sturhan i Brzeski, 1991)

De Ley i Blaxter (2003) opracowali najnowszy system klasyfikacji nicieni obejmujący obserwacje morfologiczne, wykrycia z użyciem analiz molekularnych i analizy kładystyczne.

3. Wykrywanie

D. dipsaci i *D. destructor* powodują następujące, wspólne objawy, które pozwalają na ich wykrycie: nabrzmiewanie, zniekształcenia, przebarwienia i zahamowanie wzrostu nadziemnych części roślin oraz nekrozę i gnicie cebul oraz bulw (Thorne, 1945).

Ditylenchus dipsaci

D. dipsaci wykazuje pasożytniczą adaptację do przenikania przez stałą tkankę miękiszu w wyniku rozkładu blaszek pektynowych lub środkowych między ścianami komórkowymi przylegających komórek, doprowadzając do oddzielenia się i zaokrąglenia tych komórek. Przyczynia się to do typowego błyszczącego wyglądu i mączystej struktury porażonych tkanek, przypominających tkanki przejrzałego jabłka (Southey, 1993).

Według Vovlas i in. (2011), w wyniku porażenia *V. faba* przez *D. gigas* (niszczyk olbrzymek) następuje nabrzmiwanie i deformacja łodygi lub powstają nekrozy, których zabarwienie jest czerwono-brązowe, a następnie czarne. Przy silnych stopniach porażenia nasiona ciemnieją, ulegają zniekształceniu, mają mniejszy rozmiar a na ich powierzchni pojawiają się plamy przypominające cętki. Oprócz *V. faba* żywicielami są: *Lamium purpureum*, *Lamium album*, *Lamium amplexicaule*, *Ranunculus arvensis*, *Convolvulus arvensis* i *Avena sterilis*.

Ditylenchus destructor

D. destructor powszechnie poraża podziemne części roślin (bulwy i stolony ziemniaka, kłącza mięty oraz korzenie chmielu i lilaka), powodując przebarwienia i zgnilizny tkanki roślinnej. Czasami są porażane także nadziemne części roślin, których łodygi ulegają karłowaceniu, skręcaniu, grubieniu i rozgałęziają się, a liście skręcaniu i przebarwieniu (np. u ziemniaków) (Sturhan i Brzeski, 1991). Znacznie częściej na nadziemnych częściach roślin brak objawów porażenia.

3.1 Żywiciele i objawy

3.1.1 *Ditylenchus dipsaci*

Zgodnie z publikacją Sturhana i Brzeskiego (1991), głównymi żywicielami są: Gramineae: *Avena sativa* (owies), *Secale cereale* (żyto), *Zea mays* (kukurydza), *Triticum aestivum* (pszenica); Liliaceae: *A. cepa*, *A. sativum*, *Tulipa* spp.; Leguminosae: *M. sativa*, *Vicia* spp., *Pisum sativum*, *Trifolium* spp.; Solanaceae: *S. tuberosum*, *Nicotiana* spp.; Cruciferae: *Brassica campestris* i Amarilidaceae: *Narcissus* spp. Do innych żywicieli zalicza się *D. carota*, *Fragaria* spp. (truskawka), *B. vulgaris*, *H. orientalis*, *Allium ampeloprasum* (por), *Phlox drummondii*, *Phlox paniculata*, *Dianthus* spp. (goździk), *Apium graveolens* (seler), *Hydrangea* spp., *Lens culinaris* (soczewica jadalna), *Brassica napus* (rzepak), *Petroselinum crispum* i *Helianthus annuus* (słonecznik).

Różne pokolenia *D. dipsaci* mogą być obecne na roślinie żywicielskiej w sezonie, następując jedno po drugim. Jeśli w wyniku porażenia przez agrofaga części roślin obumierają, nicienie opuszczają żywiciela nim obumrze on całkowicie. Przy braku żywicieli nicienie mogą do roślin nieżywicielskich i żerować tam przez pewien okres czasu, chociaż nie są one zdolne do rozmnażania się na roślinach nieżywicielskich (Andrássy i Farkas, 1988). Najpowszechniej spotykanymi objawami spowodowanymi przez *D. dipsaci* jest pojawianie się roślin

o zahamowanym wzroście i chlorotycznych; zgrubiałych, o zahamowanym wzroście, pokrytych przez wyrośla i zdeformowanych łodyg, ogonków liściowych i kwiatów, nekrotycznych zranień i gnicia cebul i kłaczy oraz często pojawianie się brązowych pierścieni widocznych po poprzecznym przekrojeniu cebul. *D. dipsaci* może porażać także nasiona, przykładowo *Phaseolus vulgaris* (fasola szparagowa), *V. faba*, *Allium* spp. i *M. sativa*. Na małych nasionach zwykle brak objawów porażenia, lecz większe nasiona mogą mieć pomarszczoną skórkę i mogą znajdować się na nich odbarwione plamy.

3.1.1.1 Objawy specyficzne dla Gramineae

Avena sativa i *Secale cereale* (McDonald i Nicol, 2005). Liście są zniekształcone, łodygi zgrubiałe, wytwarzana jest nadmierna liczba źdźbeł, rośliny są niewielkie, krzaczaste, a ich rozwój jest zahamowany. W uprawach *S. cereale*, *D. dipsaci* występuje głównie na lekkich glebach ubogich w próchnicę i naturalnie na obszarach, gdzie żyto jest regularnie uprawiane. Pierwsze objawy porażenia obserwowane są późną jesienią, lecz są najwyraźniej widoczne wiosną. Kilka plam na roślinach z zahamowanym wzrostem w uprawie żyta wskazuje na uszkodzenie przez agrofaga. Z uwagi na wolniejszy wzrost porażone rośliny *A. sativa* wyraźnie można zauważyć w żółknącej uprawie z uwagi na ich zielony kolor. Porażone rośliny *T. aestivum* mają takie same objawy porażenia jak inne zboża i są one atakowane przez *D. dipsaci* tylko w południowej i środkowej części Europy (Rivoal i Cook, 1993).

Zea mays jest słabym żywicielem *D. dipsaci*, lecz przeniknięcie nicieni do tkanek łodyg młodych roślin przyczynia się do powstawania nekroz tych tkanek i w konsekwencji do obumierania lub wylegania roślin kukurydzy przed zbiorami (Rivoal i Cook, 1993). Liście porażonych roślin są kruche oraz zwinięte w formie przypominającej korkociąg. Międzywęzła są skrócone a u nasady łodygi pojawiają się wydrążenia (otwory), podczas gdy większe rośliny ulegają złamaniu i wylegają.

3.1.1.2 Objawy specyficzne dla Liliaceae

Allium cepa, *Allium sativum* i *Allium cepa* var. *aggregatum* (szalotka). W przypadku większości *Allium* spp. jest to charakterystyczne, że liście i cebule porażone przez *D. dipsaci* są zdeformowane (ryc. 2, 3 i 4). Nasada młodej rośliny ulega nabrzmieniu, a liście są zniekształcone. Na starszych cebulach obserwuje się nabrzmiewanie (nadęcie) łusek z otwartymi spękaniem często występującymi na piętce cebuli, w miejscu wyrastania korzeni (Potter i Olthof, 1993). *A. cepa* porażona przez *D. dipsaci* posiada wygląd jakby była uszkodzona przez mróz, co jest spowodowane rozpadem komórek w wyniku żerowania nicienia (Ferris i Ferris, 1998). Podczas transportu cebul często mają one tendencję do gnicia (Bridge i Hunt, 1986). Wewnętrzne łuski cebuli są zwykle silniej porażone niż łuski zewnętrzne. Podczas sezonu cebule stają się miękkie i po ich przecięciu widoczne jest brązowienie łusek w formie koncentrycznych pierścieni. Natomiast w przypadku *A. sativum*, *D. dipsaci* przeciwnie nie wywołuje deformacji liści lub nabrzmień, lecz powoduje żółknięcie i śmierć liści (Netscher i Sikora, 1990). Mollov

i in. (2012) stwierdzili po raz pierwszy występowanie *D. dipsaci* na *A. sativum* w Minnesocie, Stany Zjednoczone. Objawami na nadziemnych częściach roślin było zahamowanie rozwoju i chlorozy, podczas gdy objawami na cebulach były nekrozy, niepełny rozwój i zniekształcenie. *Allium* spp. mogą posiadać pęcherze na liściach (tj. zgrubienia liści w formie bąbli). Nie zaobserwowano żadnych objawów na porażonych nasionach *Allium*.

***Tulipa* spp.** (Southey, 1993). Objawy porażenia przez *D. dipsaci* na tulipanach, zarówno na roślinach rosnących jak i cebulach, są całkiem odmienne od obserwowanych na *Narcissus* spp. W warunkach polowych porażenie najłatwiej wykryć podczas kwitnienia. Pierwszym objawem jest blade lub purpurowe zranienie (nekroza) na jednej stronie łodygi, bezpośrednio pod kwiatem, który wygina się w kierunku tego zranienia. Wielkość zranienia ulega zwiększeniu, skórka ulega zniszczeniu, a pod nią widoczna jest typowa luźna tkanka, a uszkodzenia rozprzestrzeniają się ku dołowi i często ku górze na płatkach kwiatów. W przypadku większego stopnia porażenia, podobne zranienia rozprzestrzeniają się w dół łodyg od pachwin liści i wzrost roślin może być zaburzony. Porażenie rozpoczyna się od piętki nowych cebul, które rozwijają się z bocznych pączków rozłogowych u nasady poprzednich łodyg. Objawy porażenia można zaobserwować i odczuć po usunięciu zewnętrznych brązowych łusek, w formie szarych lub brązowych plam na zewnętrznych łuskach mięsistych. Na porażonych cebulach nie są widoczne brązowe pierścienie, jak ma to miejsce w przypadku narcyzów i hiacyntów.

3.1.1.3 Objawy specyficzne dla *Leguminosae*

***Medicago sativa*.** *D. dipsaci* jest najważniejszym gatunkiem nicienia wywołującym szkody na *M. sativa*. Porażenie często występuje w glebach cięższych i podczas silnych deszczów lub na obszarach nawadnianych z użyciem opryskiwaczy. „Białe flagowanie” powstające w wyniku utraty chlorofilu przez liście jest częstym objawem w porażonych uprawach w warunkach stresu wilgotności (Griffin, 1985). Na porażonych polach często widoczne są nieregularne obszary, gdzie rzadko notuje się rosnące rośliny. Typowe objawy porażenia przez nicienie obejmuje nabrzmiwanie u nasady, karłowacenie i skręcanie łodyg i liści, skracanie międzywęźli, tworzenie się wielu dodatkowych pączków w pachwinach, tworzenie się nadmiernej liczby pędów, co daje roślinom krzaczasty wygląd (McDonald i Nicol, 2005). Porażone rośliny często nie uzyskują odpowiedniej wysokości, aby można było wykorzystać je do pozyskania siana (Ferris i Ferris, 1998) i często nie wytwarzają one pędów kwiatowych (McDonald i Nicol, 2005). *D. dipsaci* czyni lucernę podatną na porażenie przez *Phytophthora megasperma*. Uszkodzenia powodowane przez *D. dipsaci* stają się intensywniejsze w przypadku występowania innych, saprofitycznych nicieni (gatunki z rodzajów *Rhabditis*, *Cephalobus* i *Panagrolaimus*) na chorych, uszkodzonych roślinach, co także przyspiesza śmierć tych roślin (Andrássy i Farkas 1988). Nie zaobserwowano żadnych objawów na porażonych nasionach *Medicago*.

***Trifolium* spp.** (Cook i Yeates, 1993). Objawy są całkiem podobne do opisanych dla *M. sativa*, oprócz objawów na koniczynie czerwonej i białej. Agrofag poraża koniczynę czerwoną zwłaszcza przy chłodnej, deszczowej pogodzie. Na polu występują duże, okrągłe obszary występowania

chorych roślin, przy czym bardziej chore rośliny występują w bardziej środkowej części tego obszaru, a rośliny więdnięce w jego centrum. Nasady roślin są nabrzmięte jak cebule, natomiast liście są kruche, pomarszczone z silnie zgrubiałymi żyłkami. Zawiązki kwiatów są silnie nabrzmięte, przypominające galasy, a pojedynczy galas kwiatowy może zawierać do 5 000 nicieni (Courtney, 1962). Łodygi koniczyny białej porażonej przez *D. dipsaci* są krótkie i nabrzmięte, pąki są umieszczone w kępkach, a porażone części roślin brązowieją latem i jesienią. Liście są węższe niż zwykle, chociaż ich ogonki są grubsze i krótsze. Pąki kwiatowe są nabrzmięte u nasady (Andrássy i Farkas, 1988).

3.1.1.4 Objawy specyficzne dla Solanaceae

***Solanum tuberosum*.** *D. dipsaci* wytwarza zgnilizny w kształcie lejka, które rozprzestrzeniają się bardziej do wnętrza bulwy niż powierzchniowe zgnilizny wywołane przez *D. destructor*. Nicienie przenikają do łodyg i liści, co w konsekwencji doprowadza do typowego zahamowania wzrostu rośliny, któremu towarzyszy silne zniekształcenie łodyg i ogonków liściowych (Evans i Trudgill, 1992).

Nicotiana spp. (Johnson, 1998). Infekcyjne osobniki młodociane (czwartego stadium) przenikają do liści i łodyg siewek tytoniu podczas wilgotnej pogody i przyczyniają się do powstawania małych, żółtych zgrubień (wyrośli), które mogą sięgać na wysokość 40 cm lub więcej ponad powierzchnię gleby. Gdy liczba wyrosli wzrasta, rośliny rozpoczynają przedwcześnie obumierać. Dolne liście mogą opadać, a górne – żółknąć. Wyrośla ostatecznie ulegają rozkładowi gnilnemu, co hamuje rozwój porażonych roślin. Ostatecznie, zwłaszcza przy chłodnej, wilgotnej pogodzie i na glebach ciężkich, porażone łodygi ulegają złamaniu, a rośliny przewracają się.

3.1.1.5 Objawy specyficzne dla Cruciferae

Silne zgnilizny korony mogą rozwijać się na dojrzałych roślinach *B. campestris* porażonych przez *D. dipsaci*.

3.1.1.6 Objawy specyficzne dla Amarilidaceae

Narcissus spp. (Southey, 1993). Typowymi objawami jest występowanie bladeżółtych nabrzmień w postaci pęcherzy na liściach i koncentrycznych brązowych pierścieni, które można zauważyć, gdy cebule zostaną przecięte poprzecznie (ryc. 5 i 6). Gdy cebule są przecięte wzdłużnie, można zauważyć nekrozy rozpoczynające się od szyjki, rozprzestrzeniające się ku dołowi. Nabrzmienia są najlepiej widoczne przed kwitnieniem, gdy liście są w stadium aktywnego wzrostu. Przy słabszym porażeniu, nabrzmienia te mogą być lepiej wyczute między palcem i kciukiem niż zobaczone. Porażenie przez *D. dipsaci* może być wykryte w suchych cebulach, przy minimalnym uszkodzeniu cebuli, poprzez przecięcie cebuli tuż poniżej szyjki. W czasie starannej analizy wczesnych stadiów porażenia dostrzega się błyszczące, gąbczaste obszary w miejscu rozdzielenia się komórek. Wkrótce po tym pojawiają się brązowe nekrozy.

3.1.1.7 Objawy specyficzne dla innych żywicieli

Fragaria spp. *D. dipsaci* jest jedynym gatunkiem z rodzaju *Ditylenchus* uważanym za patogena truskawki (Brown i in., 1993). Uszkodzenia występują w postaci małych, zdeformowanych liści i krótkich, grubych i skręconych ogonków liściowych.

Rodzina Asparagaceae, podrodzina Sciloideae (hiacynty) i inne cebulowe rośliny ozdobne (Southey, 1993). Objawy na cebulach są takie same jak u *Narcissus* spp., lecz zwykle na liściach roślin nie są widoczne wyraźne nabrzmienia roślin. Na liściach mogą znajdować się żółte smugi, deformacje i często lekkie nabrzmienia. Na cebulach innych roślin z rodziny liliowatych generalnie obserwuje się takie same objawy jak w przypadku hiacyntów. Objawy porażenia roślin z rodziny Amarylliaceae są podobne jak w przypadku *Narcissus* spp.; Przykładowo *Galanthus* spp. i *Nerine* spp. wykazują obecność nabrzmień na liściach i koncentrycznych, brązowych pierścieni na cebulach.

Beta vulgaris i Daucus carota (Cooke, 1993). W wyniku żerowania *D. dipsaci* następuje śmierć wierzchołka wzrostu siewek (doprowadzając do tworzenia się wielokrotnych koron), liścienie i liście mogą ulegać skręcaniu, nabrzmiewaniu i deformacji, a wyrosła mogą rozwijać się na liściach lub ogonkach liściowych starszych roślin. W późniejszym okresie sezonu, żerowanie na koronie może spowodować zgniliznę znaną jako rak korony, zgnilizna korony lub zgnilizna szyjki korzeniowej. Jest ona po raz pierwszy widoczna jako wznoszące się szarawe pryszcze (naroślą), zwykle między bliznami liściowymi. Rozkład gnilny następnie rozwija się na zewnątrz i do wnętrza, rozprzestrzeniając się przez boczne części roślin, w konsekwencji po pociągnięciu korona ulega oderwaniu. U *D. carota*, dodatkowe objawy mogą obejmować bezładne układanie się liści oraz odbarwienie się głowy głównego korzenia. Objawy głównie występują na korzeniu i łodydze rośliny na głębokości 2–4 cm pod powierzchnią gruntu. Silne porażenie obejmuje obumieranie liści i zgniliznę korzenia, zwłaszcza na jesieni (ryc. 7).

Phlox paniculata i inne rośliny ozdobne (Southey, 1993). Na porażonych floksach pędy wykazują typowe zgrubienia i łamliwość oraz skracanie się międzywęźli, które wykazują tendencję do rozłupywania się. Charakterystyczne i wyjątkowe dla tego żywiciela jest marszczenie się górnych liści i zmniejszenie się liczby ich nerwów, których większość może być zredukowana do cienkich nici. Przykładami roślin odnotowanych jako żywicieli, przy wywoływaniu przez nicienia deformacji odrośli, nabrzmiewania, itd., są gatunki i odmiany *Anemone*, *Calceolaria*, *Cheiranthus*, *Gypsophila*, *Helenium*, *Heuchera*, *Lychnis*, *Lysimachia* i *Penstemon* (Roberts, 1981). Edwards (1937) odnotował zahamowanie rozwoju, deformację liści, zgniliznę i brak kwitnienia u *Primula* spp. Rośliny zdrewniałe nie są często atakowane, lecz *Hydrangea* może być porażana przez *D. dipsaci*, wywołując deformację pędów nie zdrewniałych, nabrzmiewanie ogonków liściowych i głównych nerwów oraz wyraźne marszczenie się blaszki liściowej. Pomarszczone liście zwykle są pierwszą oznaką infekcji. Inne rośliny zdrewniałe, *Yucca smaliana*, charakteryzują się deformacją liści i nabrzmiewaniem w postaci pęcherzy.

3.1.2 *Ditylenchus destructor*

Zgodnie z publikacją Sturhana i Brzeskiego (1991), *D. destructor* pasożytuje głównie na bulwach (np. ziemniaka i dalii), cebulach (np. irysa cebulowego, tulipana i mieczyka) i uprawnych roślin korzeniowych (np. buraka cukrowego i marchwi). Jest on w stanie zniszczyć grzybnię *Agaricus hortensis* (pieczarki uprawnej). Do innych żywicieli zalicza się *I. batatas*, *A. sativum*, *P. vulgaris*, *Angelica sinensis*. („dong quai” albo „żeński żeńszeń”), *Panax ginseng* (żeńszeń), *Taraxacum officinale*, *Begonia* spp. i cebule *Erytronium denscanis* (pszaząb).

***Solanum tuberosum* i *Dahlia* spp.** Brak widocznych objawów w czasie sezonu wegetacyjnego. Nicienie przenikają do bulw zwykle przez stolony. Większość nicieni znajduje się na granicy części brązowiejących i nieuszkodzonych. Jeśli z tej części bulwy zostanie pobrana mała próbka, którą umieści się w wodzie, masa niewielkich nicieni jest wyraźnie widoczna, nawet przy pomocy prostej lupy ręcznej. Najwcześniejszym objawem występowania *D. destructor* są niewielkie, białe, kredowe, lub jasnej barwy planki, które można zobaczyć tuż pod skórką bulwy (Brodie, 1998). Te plamki stają się większe i stopniowo ciemnieją (poprzez barwę szarą, ciemno brązową i czarną) i nabierają struktury gąbczastej (ryc. 8). Ma to miejsce w większości w wyniku wtórnej inwazji bakterii, grzybów i nicieni saprofitycznych (Brodie, 1998). Na silnie porażonych bulwach znajdują się typowe lekko wklęsłe obszary pokryte spękaną, pomarszczoną, papierowatą skórką. Skórka nie jest atakowana i staje się cienka oraz pęka, gdy leżące pod nią porażone tkanki wysychają i kurczą się (Brodie, 1998). Ostatecznie może nastąpić mumifikacja całych bulw. Takie całkowicie zniszczone bulwy pływają we wodzie (ryc. 9). W przeciwieństwie, skórka bulw *S. tuberosum* porażonych przez *D. dipsaci* zwykle nie pęka. Nicienie kontynuują swoje rozmnażanie w bulwach po zbiorach i mogą uzyskać znaczną liczebność. Objawy mogą być lepiej widoczne po składowaniu bulw. W porażonych bulwach generalnie ma miejsce wtórna infekcja przez grzyby, bakterie i nicienie wolno żyjące.

***Beta vulgaris*.** W wyniku porażenia ma miejsce pojawianie się ciemnych, nekrotycznych zranień na korzeniach i kłęczach. Dallimore i Thorne (1951) odnotowali objawy podobne do raka korony. Na buraku oprócz strat w plonach notuje się także zmniejszenie zawartości cukru.

***Daucus carota*.** W wyniku porażenia pojawiają się poprzeczne spękania skórki korzenia marchwi z białymi płatami tkanki kory. Wtórne porażenie tych miejsc przez grzyby i bakterie może także doprowadzić do rozkładu gnilnego. Uszkodzenie to można łatwo zauważyć po poprzecznym przecięciu marchwi. Nicienie kontynuują uszkodzanie roślin podczas składowania marchwi w czasie zimy i w konsekwencji marchew nie nadaje się do konsumpcji.

***Iris* spp. i *Tulipa* spp.** (Southey, 1993). W wyniku porażenia powstają szare, liniowe nekrozy, które rozprzestrzeniają się od nasady cebul ku górze, po mięsistych zewnętrznych łuskach cebul. W miarę zwiększenia się stopnia porażenia, następuje intensyfikacja uszkodzeń tkanki, a cebula ulega wtórnemu zasychaniu i włóknistemu gniciu, co w konsekwencji doprowadza do jej całkowitego zniszczenia. Brązowe plamy w formie pierścienia są wyraźnie widoczne po

poprzecznym przecięciu porażonej cebuli. Żółknięcie i obumieranie liści są wtórnymi objawami spowodowanymi przez zniszczenie cebuli i ostatecznie przerwanie funkcjonowania korzenia.

Porażenie przez *D. destructor* bulwocebul ozdobnej rośliny *Liatris spicata* („Gayflower”, „Blazing Star” i „Button Snakeroot”), podczas ich przechowywania w niskiej temperaturze w RPA, powodowało czarniawe zgnilizny przy występowaniu żywych nicieni różnych stadiów w tkance przylegającej do zniszczonych obszarów (Van der Vegte i Daiber, 1983).

3.2 Ekstrakcja nicieni

3.2.1 Ekstrakcja z cebul i czosnku

W celu wyekstrahowania nicieni, porażone łuski cebul (głównie łuski wewnętrzne) lub główki czosnku tnie się na małe kawałki i umieszcza w naczyniu (np. na szalce Petriego) wypełnionym wodą bieżącą, w temperaturze pokojowej. W celu uzyskania czystej zawiesiny, powyższe kawałki mogą być umieszczone na sicie o średnicy oczek 200–250 μm , wyłożonym filtrem, które stanowi podstawkę do próbek (metoda naczynia Oostenbrinka). Po upływie 1 godziny lub więcej nicienie można zaobserwować przy użyciu mikroskopu stereoskopowego (powiększenie minimum 40 \times).

3.2.2 Ekstrakcja z gleby i materiału roślinnego

Metoda lejków Baermanna jest referencyjną techniką ekstrakcji nicieni z materiału roślinnego (cebul, korzeni, ściniek bulw ziemniaka i nasion). Lejek zaopatrzony jest w kawałek wężyka gumowego umieszczonego na jego nóżce, zamkniętego przy użyciu zacisku sprężynowego lub śrubowego. Lejek jest umieszczony na statywie i prawie w całości wypełniony wodą bieżącą. Gleba lub materiał roślinny pocięty na drobne kawałki umieszcza się w muślinie lub na bibułce, których brzegi są zawinięte, aby objąć cały materiał, a następnie delikatnie zanurza się je w wodzie na lejku. Nicienie aktywne przechodzą przez materiał i gromadzą się w dolnej części nóżki lejka. Po kilku godzinach zostaje pozyskana niewielka ilość wody zawierająca nicienie, którą przegląda się pod mikroskopem (Flegg i Hooper, 1970).

W zmodyfikowanej technice lejek zostaje zastąpiony przez płaskie naczynie. Grudy gleby zostają rozdrobnione, a kamienie i resztki roślinne zostają usunięte. Gleba (50 ml) zostaje równomiernie rozprowadzona na jednowarstwowym ręczniku papierowym, którym wyłożony jest plastikowy kosz o dużej średnicy oczek, umieszczony w plastikowym naczyniu. Woda jest dodawana do naczynia do chwili, gdy podsiąknie na przez całą warstwę gleby, która jednak nie pozostaje zanurzona. Naczynie zostaje przykryte przez górną część dużej szalki Petriego, w celu zmniejszenia parowania wody. Tak przygotowany zestaw pozostawia się przynajmniej przez 24 godziny, a po tym okresie gleba zostaje wyrzucona, a zawiesina zawierająca nicienie zostanie przelana z naczynia ekstrakcyjnego na szalkę w celu analizy przy użyciu mikroskopu stereoskopowego. Gleba może być zastąpiona delikatnie rozdrobnionym materiałem roślinnym (Kleynhans, 1997).

Technika zagławiarki Seinhorsta dla cebul i korzeni różni się od metody lejków Baermanna tym, że sok roślin i toksyczne produkty rozkładu zostają wymyte. Metoda ta ma pierwszeństwo użycia przed metodą lejki Baermanna w przypadku analizy takich roślin jak *Narcissus* spp. W tej metodzie lejek Baermanna lub naczynie Oostenbrinka umieszczone są w mgiełce lub mgle utworzonej z kropel wody, co pozwala uniknąć niedoboru tlenu. Mgiełka jest wytwarzana przez dysze rozpylające znajdujące się nad materiałem roślinnym lub dysze wytwarzające strumień skierowany ku górze, stąd kropelki delikatnie opadają na materiał roślinny. Żywe nicienie opuszczają tkankę roślinną i zostają zmyte na lejek lub naczynie, gdzie się osadzają. Nicienie są zbierane co każde od 24 do 48 h do szklanej zlewki poprzez otwarcie zacisku śrubowego na nóżce lejka, lub zbierane na sitach o średnicy oczek 20–25 µm. Ekstrakcja może być kontynuowana przez okres do czterech tygodni. Ta technika została opisana przez Hoopera (1986).

Inna metoda ekstrakcji *Ditylenchus* spp. z materiału roślinnego została opracowana na podstawie opisu, który opracował Oliveira i in. (2013). Materiał roślinny zostaje pocięty na kawałki o długości 1 cm, które zostają umieszczone w słoikach o objętości 500 ml wypełnionych wodą bieżącą. W zakrętkach słoików zostaną wbite dwa otwory, jeden pozwalający na wprowadzenie rurki od pompki stosowanej w akwariach, a drugi spełniający rolę otworu odpływowego dla powietrza. Materiał jest przetrzymywany przez 72 h przy ciągłym napowietrzaniu przy użyciu pompki. Uzyskana zawiesina zostaje przecedzona przez sito o średnicy oczek 1 000 µm w celu usunięcia resztek roślinnych, a następnie przez sito o średnicy oczek 38 µm w celu wyizolowania nicieni z zawiesiny. Stosowana metoda napowietrzania zawiesiny zapobiega rozkładowi gnilnemu materiału roślinnego tak, że następuje tylko minimalny wzrost liczebności organizmów bakteryjnych i grzybowych i wiele spośród nicieni pozostaje żywe. Poruszanie się zawiesiny zawierającej materiał roślinny podczas napowietrzania skutkuje uwolnieniem z tkanki korzeni większej liczby nicieni, co skutkuje znacznie bardziej dokładną oceną porażenia materiału roślinnego.

Nicienie mogą być wyekstrahowane z materiału roślinnego także przy użyciu metody Coolena i D'Herde (1972). Materiał roślinny zostaje opłukany, pocięty na kawałki długości około 0,5 cm, a porcje tego materiału o wadze 5 g są macerowane w 50 ml wody bieżącej w mikserze do użytku domowego przy najniższej prędkości miksowania, przez 1 min. Ujemną stroną tej metody jest to, że osobniki nicieni dużych, takie jak osobniki dorosłe *D. dipsaci*, mogą być w mikserze ulec pocięciu na kawałki. Zawiesina zawierająca nicienie i fragmenty tkanki roślinnej zostaje przecedzona przez sito o średnicy oczek 750 µm umieszczone na sicie o średnicy oczek 45 µm. Materiał osadzony na sicie o średnicy 45 µm zostaje zebrany i przelany do dwóch probówek wirówkowych o objętości 50 ml. Do każdej probówki zostaje dodane około 1 ml kaolinu, uzyskana mieszanina zostaje dokładnie wymieszana i odwirowana przy 3 000 obr. min⁻¹ przez 5 min. Supernatant zostaje zdekantowany, a do probówek zostaje dodany roztwór sacharozy (o ciężarze właściwym 1,13 g/cm³). Mieszanina zostaje dokładnie wymieszana i odwirowana przy 1 750 obr. min⁻¹ przez 1 min. Supernatant zostaje przemyty przez sito o średnicy oczek 45 µm, osad zostaje zebrany, a nicienie poddane analizie.

Badanie suchych nasion roślin motylkowatych, wyłączając te uprawiane tylko na suche ziarno, na obecność *D. dipsaci* przeprowadzane jest zgodnie procedurą obejmującą dwa kroki (1) pozostawienie pewnej ilości nasion zanurzonych w napowietrzanej wodzie na noc i (2) poddanie części nasion ekstrakcji z wykorzystaniem mgiełki przez trzy dni. Obecność nicieni w wodzie, gdzie były zanurzone nasiona i w materiale wyekstrahowanym z wykorzystaniem mgiełki, polega na przesianiu wodnych frakcji pozyskanych podczas obu kroków, a następnie na obserwacjach mikroskopowych w celu identyfikacji. Cały proces trwa około siedmiu dni, lecz może być skrócony do trzech dni, jeśli zostanie wyeliminowany krok (2) (tj. ekstrakcja z wykorzystaniem mgiełki). Zmodyfikowana procedura obejmuje zanurzenie nasion na noc w napowietrzanej wodzie, a następnie przesiewanie i obserwacje mikroskopowe w celu identyfikacji.

Do ekstrakcji nicieni z gleby może być użyta następująca metoda (według Kleynhansa, 1997). Gleba (250 ml) jest przemywana przez sito o dużej średnicy oczek (2 mm) do 5 litrowego wiadra. Woda bieżąca zostaje dodana w celu zwiększenia objętości do 5 litrów. Zawiesina zostaje wymieszana, a następnie pozostawiona na okres 30 s celem sedymentacji, przed przecedzeniem przez sito o średnicy oczek 45 μm . Ta procedura zostaje powtórzona dla gleby znajdującej się we wiadrze dwukrotnie, lecz czasy osiadania się materiału zostają skrócone do 20 s, a następnie 10 s. Osad po przecedzeniu przez sito o średnicy oczek 45 μm zostaje przeniesiony do probówek wirówkowych o objętości 50 ml. Jeśli zawartość probówek jest bardzo piaszczysta, można dodać do probówek po 5 ml kaolinu (po czym ich zawartość dokładnie wymieszać) w celu wspomoczenia osiadania się nicieni. Probówki poddaje się wirowaniu odwirowana przy 1 750 obr. min^{-1} przez 7 min. Supernatant z każdej probówki zostaje zdekantowany i odrzucony. Roztwór cukru (450 g/litr wody) zostaje dodany do probówek, a uzyskana mieszanina cukru i gleby zostaje dokładnie wstrząśnięta przed odwirowaniem przy 1 750 obr. min^{-1} przez 3 min. Supernatant zostaje przecedzony przez sito o średnicy oczek 45 μm , a osad zawierający nicienie zostaje zebrany w zlewce do dalszych badań. Jest to podstawowa technika i w zależności od doświadczenia personelu technicznego i typu gleby, utraconych może być do 40% nicieni. Inne metody, które mogą być użyte do ekstrakcji nicieni z gleby obejmują dokonaną przez Flegga modyfikację metody Cobba i metodę z zastosowaniem aparatu Oostenbrinka (EPPO, 2013c). Hooper i in. (2005) opisuje różne metody ekstrakcji opracowane z uwzględnieniem rozmiarów, zagęszczenia i ruchliwości nicieni.

4. Identyfikacja

Identyfikacja *Ditylenchus* spp. na podstawie cech morfologicznych jest możliwa tylko w przypadku osobników dorosłych i najlepiej jest, jeśli zarówno samice jak i samce są poddawane analizie pod dużym powiększeniem mikroskopu. Na preparatach mikroskopowych dobrej jakości, możliwe jest przeprowadzenie identyfikacji do gatunków *D. dipsaci* i *D. destructor* tylko w oparciu o analizę cech morfologicznych. Identyfikacja osobników młodocianych nicieni z rodzaju *Ditylenchus* w danej próbce powinna być stosowana tylko do potwierdzenia obecności danego gatunku w tej próbce. Z uwagi na częste zasiedlanie przez mikofagiczne *Ditylenchus* spp.

rozkładającego się materiału roślinnego, identyfikacja osobników nicieni stwierdzanych zarówno w próbkach materiału roślinnego jak i gleby powinna być przeprowadzana z dużą starannością.

4.1 Identyfikacja na podstawie cech morfologicznych

Identyfikacja *D. dipsaci* i *D. destructor* powinna opierać się przede wszystkim na podstawie cech morfologicznych. Metody molekularne opracowane w celu identyfikacji tych gatunków mogą być użyte w przypadku niskiego stopnia porażenia, oraz gdy notuje się tylko występowanie osobników młodocianych. Metody molekularne mogą być stosowane do identyfikacji uszkodzonych i nietypowych osobników dorosłych, oraz wszystkich stadiów rozwojowych, wliczając w to osobniki młodociane, których identyfikacja do gatunku na podstawie cech morfologicznych nie jest możliwa.

4.1.1 Preparowanie osobników

Nietrwałe preparaty mikroskopowe przeznaczone do szybkiej identyfikacji lub analizy cech najlepiej dostrzegalnych na osobnikach nieutrwalonych, powinny być przygotowane w następujący sposób (Kleynhans, 1997):

- Żywe osobniki zostają przeniesione do kropli wody na szkiełku mikroskopowym podstawowym.
- Szkiełko z nicieniami zostaje przez krótki okres czasu podgrzane w płomieniu palnika spirytusowego, a następnie z wielokrotnie sprawdza się, czy nicienie nadal się ruszają. Podgrzewanie zostaje zakończone, gdy nicienie przestaną wykonywać ruchy.
- Preparat zamyka się szkiełkiem mikroskopowym nakrywkowym, którego brzegi zabezpiecza się lakierem do paznokci. Gdy lakier wyschnie, preparat z osobnikami jest gotowy do analizy.

W celu analizy z wykorzystaniem mikroskopii świetlnej, żywe nicienie zostaną wyekstrahowane z gleby lub materiału roślinnego, uśmiercone przez delikatne ogrzanie (65–70 °C), utrwalone w FAA (35% wody destylowanej, 10% formaliny o stężeniu 40%, 5% kwasu octowego lodowatego, 50% alkoholu o stężeniu 95%) (Andrássy, 1984), przeniesione do gliceryny (Hooper i in., 2005) i zamknięte w glicerynie bezwodnej na szkiełku mikroskopowym podstawowym po przykryciu szkiełkiem nakrywkowym, tak jak opisali to Seinhorst (1959) i Goodey (1963).

Zalecane jest przeprowadzanie identyfikacji przy użyciu mikroskopu pod powiększeniem od 500× do 1 000× (obiektywy immersyjne) w połączeniu z różnicującym kontrastem fazowym.

4.1.2 Morfologiczne cechy diagnostyczne

Klucze do diagnostyki nicieni z rodzaju *Ditylenchus* można znaleźć w pracach Viscardi i Brzeskiego (1993) oraz Brzeskiego (1998). Klucz pozwalający na odróżnienie *Ditylenchus* spp. od innych nicieni z rzędów Tylenchida i Aphelenchida jest przedstawiony w Tabeli 1, poniżej.

Tabela 1. Klucz pozwalający na odróżnienie *Ditylenchus* spp. od innych nicieni z rzędów Tylenchida i Aphelenchida.

1	Ujście grzbietowego gruczołu przełyku w pobliżu nasady sztyletu, środkowe rozszerzenie przełyku zaokrąglone, owalne lub nie występuje.	Tylenchida - 2
	Ujście grzbietowego gruczołu przełyku w środkowym rozszerzeniu przełyku; środkowe rozszerzenie przełyku silnie rozwinięte, zwykle podłużne.	Aphelenchida
2	Przednia część przełyku (procorpus) i środkowe rozszerzenie przełyku nigdy nie tworzą jednej całości; sztylet nigdy nie jest szczególnie długi.	3
	Procorpus stopniowo rozszerza się i jest zespolony ze środkowym rozszerzeniem przełyku; sztylet bardzo długi, a jego podstawa często znajduje się przedniej części środkowego rozszerzenia przełyku.	Inne rodzaje
3	Dorosłe samice robakowate	4
	Dorosłe samice są osiadłymi pasożytami korzeni, kształtu woreczkowatego lub gruszkowatego.	Inne rodzaje
4	Środkowe rozszerzenie przełyku z zastawkami.	5
	Środkowe rozszerzenie przełyku bez zastawek. ¹	Inne rodzaje
5	Gruczoły przełyku znajdują się w obrębie tylnego rozszerzenia przełyku i nie obejmują jelita lub nieznacznie go obejmują; rusztowanie głowy rzadko wyraźnie rozwinięty; sztylet od słabo rozwiniętego do umiarkowanie silnie rozwiniętego.	6
	Gruczoły przełyku w formie płatów obejmujących jelito; rusztowanie głowy silnie rozwinięte; sztylet masywny.	Inne rodzaje
6	Pojedynczy, prodelficzny jajnik; wulwa umieszczona w tylnej części ciała.	7
	Dwa jajniki, amfidelficzne; wulwa nieco poza środkiem ciała.	Inne rodzaje

¹ Kilka nie pasożytniczych gatunków z rodzaju *Ditylenchus* posiada środkowe rozszerzenie przełyku bez zastawek.

7	Samice nie zgrubiałe; crustaformeria u samicy w formie quadrikollumelli z czterema rzędami po cztery komórki każdy; torebka kopulacyjna (bursa) u samców obejmuje dwie trzecie długości ogona lub więcej.	<i>Ditylenchus</i>
	Samice zgrubiałe; crustaformeria obejmuje więcej niż 20 komórek.	Inne rodzaje

Źródło: Przyjęto z Heynsa (1971) i Siddiqi (2000).

D. africanus, *D. destructor*, *D. dipsaci*, *D. gigas* i *D. myceliophagus* są podobne morfologicznie i morfometrycznie, lecz mogą być odróżnione od siebie na podstawie poniższych cech morfologicznych (Tabela 2), pod warunkiem, że możliwe jest zmierzenie i poddanie analizom zarówno samców jak i samic.

4.1.2.1 Opis *Ditylenchus dipsaci*

Na podstawie Sturhana i Brzeskiego (1991), Wendta i in. (1995) i Brzeskiego (1998). Szczegóły i wygląd nicienia przedstawiono na ryc.10.

Wymiary (kryteria w EPPO (2013b)). (Ex Owies, *Avena sativa* L., według Blake, 1962, w Hooper, 1972.) (n = 48♀♀): L = 1,3 mm ± 0,009; a = 62 ± 5,6; b = 15 ± 1,4; c = 14 ± 2,1; V = 80 ± 1,5. (n = 23♂♂): L = 1,3 mm ± 0,017; a = 63 ± 11,3; b = 15 ± 1,7; c = 14 ± 2,1; T = 72.

Ogólna morfologia. Ciało u nicieni uśmierconych wyprostowane lub prawie wyprostowane. Pola boczne z czterema liniami. Głowa zachowuje ciągłość z resztą ciała (ryc. 10 B). Sztylet długości 10–13 µm u samic, 10–12 µm u samców. Długość części stożkowej sztyletu wynosi około połowy długości sztyletu, guziki sztyletu okrągłe i dobrze rozwinięte. Środkowe rozszerzenie przełyku umięśnione, a zgrubienia ścianek jego światła mają długość 4–5 µm (ryc. 10 A). Tylne rozszerzenie przełyku nie zachodzi na jelito, lub obejmuje jelito na długości kilku mikrometrów. Otworek wydalniczy naprzeciwko tylnej części isthmus lub gruczołowego rozszerzenia przełyku. Długość woreczka zapochwowego ma około połowy lub nieco więcej odległości między wulwą a odbytem (ryc. 10 D). Bursa u samców obejmuje trzy czwarte długości ogona. Spikule długości 23–28 µm. Ogony u obu płci stożkowate, zaostrome na końcu.

Morfologiczne cechy diagnostyczne. Liczba linii bocznych (cztery) (ryc. 10 F), stosunkowo długi sztylet, długość woreczka zapochwowego i ogon zaostromy na końcu (ryc. 10 D) są cechami pozwalającymi na identyfikację tego gatunku (Andrássy, 2007). *D. dipsaci* może być odróżniony od *D. gigas* na podstawie mniejszej długości samicy (1,0–1,7 mm w przeciwieństwie do 1,6–2,2 mm) i większej odległości między wulwą i odbytem (202–266 µm w przeciwieństwie do 132–188 µm) (Vovlas i in., 2011). Gdy nicienie obserwowane są z boku, spikule u *D. dipsaci* są bardziej łukowato zgięte niż u *D. destructor* (ryc. 10 C). Patrz Karssen i Willemsen (2010) w celu zdobycia dodatkowych informacji na temat spikul i ich wykorzystania do identyfikacji

D. dipsaci i *D. destructor*. Należy zauważyć, że *V. faba* zawiera głównie larwy czwartego stadium nicienia.

4.1.2.2 Opis *Ditylenchus destructor*

Według Sturhana and Brzeskiego (1991) oraz Brzeskiego (1998). Szczegóły i wygląd nicienia przedstawiono na ryc.11.

Wymiary (według Goodeya, 1952, z różnych żywicieli - roślin wyższych). (n = 237♀♀): L = 1,07 (0,69–1,89) mm; a = 32 (18–49); b = 7 (4–12); c = 17 (9–30); V = 80 (73–90). (n = 231♂♂): L = 0,96 (0,76–1,35) mm; a = 35 (24–50); b = 7 (4–11); c = 14 (11–21); T = 65 (40–84).

Ogólna morfologia. Osobniki dorosłe *D. destructor* są niewielkimi, robakowatymi zwierzętami, długości 0,8–1,4 mm, szerokości 23–47 µm, lekko łukowato zgięte po stronie brzusznej. Występuje zmienność morfometryczna osobników dorosłych w zależności od żywiciela i wieku. Ogólny wygląd samców i samic jest podobny. Na polach bocznych znajduje się sześć linii (ryc. 11 F), ograniczonych do dwóch w okolicy szyi i ogona. Pierścieniowanie kutikuli i głowy delikatne, głowa często węższa od sąsiadującą z nią resztą ciała, a można na niej rozróżnić, z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego skaningowego, około czterech pierścieni (Wendt i in., 1995). Sztylet długości 10–12 µm, a czasami opisywano osobniki o sztyletach mających długość 14 µm. Część stożkowa sztyletu stanowi 45–50% długości sztyletu, guziki sztyletu wyraźne, zaokrąglone lub skierowane ku tyłowi. Środkowe rozszerzenie przełyku umięśnione, a zgrubienia ścianek jego światła (lub zastawki) mają długość około 3 µm. Tylne rozszerzenie przełyku obejmuje jelito na niewielkiej długości po grzbietowej stronie ciała, chociaż niekiedy obserwuje się osobniki, u których tylne rozszerzenie przełyku nie zachodzi na jelito (ryc. 11 A). Otworek wydalniczy na wysokości gruczołów przełyku. Długość woreczka zapochwowego wynosi około trzech czwartych odległości między wulwą a odbytem (ryc. 11 E). Długość jaja dwukrotnie większa od jego szerokości. Długość woreczka zapochwowego wynosi około połowy lub nieco więcej odległości między wulwą a odbytem (Andrássy, 2007). Wargi wulwalne grube, uwypuklone (ryc. 11 B). Przedni jajnik wyprostowany, niekiedy osiąga rejon przełyku. Długość woreczka zapochwowego wynosi 40–98% odległości między wulwą a odbytem i nie funkcjonuje on jako spermateka (ryc. 11 E). Bursa u samców obejmuje 50–90% długości ogona. Spikule długości 24–27 µm. Kształt spikul *D. dipsaci* różni się od kształtu spikul *D. destructor* w zakresie występowania wybrzuszenia po brzusznej stronie obszaru calomus (ryc. 12) (Karssen i Willemsen, 2010). Jądro jest wyprostowane i osiąga nasadę przełyku. Ogon u obu płci stożkowaty, a jego długość jest od trzech do pięciu razy większa od szerokości ciała na wysokości odbytu, zwykle zgięty na stronę brzuszną, zaokrąglony na końcu.

Morfologiczne cechy diagnostyczne. *D. destructor* jest podobny do *D. dipsaci*, lecz różni się od tego gatunku posiadaniem sześciu linii na polach bocznych (ryc. 11 F), dłuższym woreczkiem zapochwowym i delikatnie zaokrąglonym zakończeniem ogona (ryc. 11 D). Morfologicznie *D. destructor* różni się od *D. africanus* głównie pod względem długości sztyletu, której wartości nieco zachodzą na siebie, oraz długością spikul, w związku z tym populacji muszą być obecne samce. Technika reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) jest wystarczająco czuła do wykazania różnic między blisko spokrewnionymi rodzajami, stąd Wendt i in. (1995) wykorzystali polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) do odróżnienia *D. destructor* od *D. africanus*. Gdy nicienie obserwowane są z boku, spikule u *D. dipsaci* są bardziej łukowato zgięte niż u *D. destructor* (ryc. 11C)².

Uwagi. Powyższe cechy mogą wykazywać zmienność i jest prawie niemożliwe dokonać identyfikacji do gatunku pojedynczego osobnika. Zaleca się poddanie analizom przynajmniej jednego samca i jednej samicy. Przykładowo liczba linii bocznych u samców może ulec zmniejszeniu do czterech w okolicy ogona, przyjmując układ podobny jak u *D. dipsaci*.

²W oryginalnym tekście podano „Gdy nicienie obserwowane są z boku, spikule u *D. dipsaci* są mniej łukowato zgięte niż u *D. destructor*”, co jest błędnym zapisem zważywszy na tekst w punkcie 4.1.2.1 i rys.11 C. Tekst poprawiono na właściwy (przyp. tłum).

Tabela 2. Porównanie cech diagnostycznych *Ditylenchus africanus*, *Ditylenchus destructor*, *Ditylenchus dipsaci*, *Ditylenchus gigas* i *Ditylenchus myceliophagus*.

Cecha	<i>D. destructor</i> (według Hooper, 1973)	<i>D. africanus</i> (według Wendt i in., 1995)	<i>D. myceliophagus</i> (według Hesling, 1974)	<i>D. gigas</i> (według Vovlas i in., 2011)	<i>D. dipsaci</i> (według Hooper, 1972)
Długość ciała samicy (mm)	0,8–1,9	0,7–1,1	0,6–1,4	1,6–2,2	1,0–1,7
Liczba linii bocznych	6	6–15	6	4	4
Kształt zakończenia ogona	Zaokrąglone	Zaokrąglone	Zaokrąglone	Od zaostzonego po delikatnie zaokrąglone	Zaostrzone
c (długość ciała/długość ogona) u samicy	14–20	8,8–1,9	8,2–17	15,7–27,6	11–20
Tylne rozszerzenie przełyku	Krótkie, po stronie grzbietowej obejmuje jelito	Krótkie, po stronie grzbietowej obejmuje jelito	Krótkie, po stronie grzbietowej obejmuje jelito	Nieznacznie obejmuje jelito	Nie obejmuje jelita
Długość sztyletu (µm) samicy	10–14	8–10	7–8	10,5–13,0	10–12
PUS/odległość między wulwą a odbytem (%) ³	53–90	37–85	30–69	Okolo 50 % ⁴	40–70
Długość spikul (µm)	24–27	17–21	15–20	23,5–28	23–28
Długość torebki kopulacyjnej (jako % długości ogona)	50–70	48–66	20–55	72–76	40–70
Preferencja pokarmowa ⁵	Rośliny wyższe i grzybnia grzybów	Orzeszki ziemne i grzyby	Grzybnia grzybów	Rośliny wyższe	Rośliny wyższe i grzyby

³PUS, postwulwalna część woreczka zapochwowego.⁴ Obliczone na podstawie opisu gatunku.⁵ Pomocnicze w przypadku niejednoznacznych kryteriów morfologicznych.

4.2 Identyfikacja molekularna

Gdy zaistnieje taka konieczność, możliwe jest przeprowadzenie identyfikacji molekularnej gatunków *D. dipsaci* lub *D. destructor*, szczególnie jeśli możemy mieć do czynienia z gatunkami podobnymi (np. *D. myceliophagus*, *D. africanus* lub *D. gigas*) i ostatecznie nie można rozróżnić morfologicznie czy jest to gatunek docelowy.

W takim przypadku, roztwór zawierający osobniki nicieni najkorzystniej przechowywać jest w niskiej temperaturze (to jest w lodówce) przez okres nie dłuższy niż kilka dni przed procesem ekstrakcji DNA.

W niniejszym protokole diagnostycznym, metody (włączając w to odniesienia do marek) opisane są tak jak je opublikowano, ponieważ określa to oryginalny poziom uzyskanej czułości, specyficzności i/lub odtwarzalności. Użycie w niniejszych protokołach diagnostycznych nazw handlowych odczynników chemicznych i marek sprzętu nie pociąga za sobą wykluczenia zastosowania innych odczynników i sprzętu, które także mogą być właściwe. Procedury laboratoryjne przedstawione w protokołach mogą być dostosowane do standardów poszczególnych laboratoriów, pod warunkiem, że są one odpowiednio zwalidowane.

4.2.1 *Ditylenchus dipsaci*

W celu umożliwienia identyfikacji *D. dipsaci* zostały opracowane różnorodne metody molekularne.

Hybrydyzacja Southerna (Wendt i in., 1993) oraz elektroforeza (Tenente i Evans, 1997; Palazova i Baicheva, 2002) zostały wykorzystane do zbadania koncepcji istnienia ras w obrębie gatunku *D. dipsaci* oraz genetycznej różnorodności pośród gatunków *Ditylenchus*.

Metody molekularne zostały dokładnie przebadane również na potrzeby szczegółowej identyfikacji, głównie poprzez PCR lub PCR-RFLP, a także w celu wykrywania zróżnicowania w obrębie populacji poprzez zastosowanie analizy sekwencyjnej (Leal-Bertioli i in., 2000; Zouhar i in., 2002).

Zostało opublikowanych sześć testów molekularnych (PCR, PCR-RFLP), które mogą być wykorzystane w identyfikacji *D. dipsaci*; są one opisane w sekcjach od 4.2.4 do 4.2.9. Specyficzność każdego testu zawarta jest w opisie, jak i rodzaj i gatunki nicieni w stosunku do których każdy test został sprawdzony.

Molekularna analiza sekwencji z różnych rejonów rybosomalnego (r)DNA (rejon wewnętrznej sekwencji transkrybowanej; ang. internal transcribed spacer, (ITS)1-5.8S-ITS2, fragment D2–D3 genu *s8S*⁶, małej podjednostki 18S, części mitochondrialnego genu kodującego I podjednostkę

⁶ W dokumencie źródłowym istnieje zapis o fragmencie D2-D3 genu 28S (przyp. tłum.)

oksydazy cytochromowej (mitochondrialne (mt)DNA)) i sekwencji genu *hsp90* (jądrowe (n)DNA)), wyraźnie różnicuje *D. gigas* od *D. dipsaci* s.s. (Vovlas i in., 2011).

4.2.2 *Ditylenchus destructor*

Diagnostyka molekularna dla *D. destructor* oparta jest na PCR-RFLP lub sekwencjonowaniu rejonu ITS (internal transcribed spacer) genu rRNA.

Wendt i in. (1993) wykazali, że przeprowadzenie PCR-RFLP dla rejonu ITS, umożliwia odróżnienie *D. destructor* posożyającego na ziemniaku od dwóch ras *D. dipsaci* oraz od *D. myceliophagus*. Opublikowali oni profile diagnostyczne RFLP dla tych trzech gatunków. *D. africanus* można odróżnić od *D. destructor* poprzez następującą kombinację: RFLP rejonu ITS rDNA wygenerowany przy zastosowaniu siedmiu enzymów restrykcyjnych.

Ji i in. (2006) uzyskali profile RFLP dla kilku populacji *D. destructor* z batatów i ujawnili pewne różnice w ich profilach RFLP.

Powers i in. (2001) jako pierwsi zsekwencjonowali region ITS1 dla *D. dipsaci*, ale w chwili obecnej w bazie danych GenBank dostępnych jest już ponad 50 sekwencji fragmentów rRNA uzyskanych z *D. destructor*, pozyskanych z różnych lokalizacji i roślin żywicielskich.

4.2.3 Ekstrakcja DNA

Ekstrakcja DNA przeprowadzana jest z kilku osobników młodocianych lub dorosłych umieszczonych w mikroprobówce. Proces ekstrakcji DNA opisany został przez Webstera i in. (1990).

4.2.4 Test ITS-rRNA PCR-RFLP dla *D. dipsaci* i *D. destructor*

Test ten opracowany został przez Wendta i in. (1993).

Metodologia

Uniwersalne startery ITS rRNA (jak opisał to Vrain i in. (1992)) stosowane w tym teście to:

18S: 5'-TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT-3'

26S: 5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3'

Amplikony mają wielkość 900 par zasad (base pairs) (bp) zarówno dla *D. dipsaci* jak i *D. myceliophagus*, oraz 1 200 bp dla *D. destructor*.

Amplifikację przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta zestawów do PCR zawierających polimerazę Taq DNA, nukleotydy oraz bufor reakcyjny.

Parametry reakcji PCR⁷ to pierwszy cykl 1,5 min. w 96 °C, 30 s w 50 °C i 4 min. w 72 °C; 40 cykli po 45 s w 96 °C, 30 s w 50 °C i 4 min. w 72 °C; i końcowy cykl 45 s w 96 °C, 30 s w 50 °C i 10 min. w 72 °C. Po amplifikacji DNA, 2–5 µl produktu rozdzielane jest w 1% żelu agarozowym. Pozostała część jest przechowywana w temperaturze -20°C i używana do RFLP. Do rozróżnienia *D. destructor* i *D. dipsaci* od innych gatunków *Ditylenchus* przydatnych jest kilka enzymów restrykcyjnych; na przykład, *HaeIII*, *HpaII*, *HinfI* oraz *RsaI* (Wendt i in., 1993). Długości fragmentów restrykcyjnych generowanych przy użyciu tych enzymów diagnostycznych podano w Tabeli 3.

Tabela 3. Przybliżona długość (bp) fragmentów RFLP ITS-rRNA dla gatunków *Ditylenchus* uzyskana przy zastosowaniu czterech enzymów restrykcyjnych.

Enzym	<i>D. destructor</i>	<i>D. myceliophagus</i>	<i>D. dipsaci</i>	<i>D. gigas</i> ¹	<i>D. africanus</i>
Produkt PCR nie poddany cięciu	1 200	900	900	900	1 000
<i>HaeIII</i>	450, 170	450, 200	900	800, 200	650, 540
<i>HpaII</i>	1 000	900	320, 200, 180	600, 200	950
<i>HinfI</i>	780, 180	630, 310	440, 350, 150	350, 150	450, 340, 150, 130, 100
<i>RsaI</i>	600, 250, 170	900	450, 250, 140	490, 450	690, 450

Źródło: Wendt i in. (1993, 1995).

bp, pary zasad; ITS, wewnętrzna sekwencja transkrybowana; PCR, łańcuchowa reakcja polimerazy; RFLP, polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych; rRNA, rybosomalny RNA.

¹ W oryginalnym dokumencie nazywany *D. dipsaci* rasa olbrzymia.

4.2.5 Test SCAR PCR dla *D. dipsaci*

Ten oparty na sekwencyjnie charakteryzowanym regionie amplifikowanym (SCAR) PCR test (ang. sequence characterized amplified region), opracowany przez Esquibet i in. (2003), zaprojektowany został jako gatunkowo-specyficzny test dla *D. dipsaci* z możliwością zróżnicowania pomiędzy rasami normalną i olbrzymią. Był on sprawdzony w stosunku do

⁷ Parametry reakcji PCR to te, opisane w oryginalnym artykule (Wendt i in., 1993). Rozwój termocyklorów oraz odczynników używanych do reakcji PCR może prowadzić do konieczności zmiany tych parametrów.

D. myceliophagus (jedna populacja), *D. dipsaci* rasa normalna (11 populacji z różnych żywicieli oraz lokalizacji) oraz *D. dipsaci* rasa olbrzymia, opisana jako *D. gigas* przez Vovlas i in. (2011) (11 populacji z różnych lokalizacji wyizolowanych z *V. faba*).

Metodologia

Zastosowane startery specyficzne dla *D. dipsaci*, to:

D. dipsaci (rasa normalna):

H05: 5'-TCA AGG TAA TCT TTT TCC CCA CT-3'

H06: 5'-CAA CTG CTA ATG CGT GCT CT-3'

D. dipsaci (rasa olbrzymia, opisana jako *D. gigas* przez Vovlas i in. (2011)):

D09: 5'-CAA AGT GTT TGA TCG ACT GGA-3'

D10: 5'-CAT CCC AAA ACA AAG AAA GG-3'

Amplikon ma wielkość około 242 bp dla *D. dipsaci* (rasa normalna) i 198 bp dla *D. dipsaci* (rasa olbrzymia). Dla obu zestawów starterów nie obserwuje się amplifikacji w przypadku gatunków i ras innych niż docelowe (Esquibet i in., 2003).

Skład 10 µl mieszaniny PCR to: 1,5 mM MgCl₂, 250 µM każdego dNTP, 690 nM każdego startera dla duplex PCR (H05-H06) lub (D09-D10) albo 500 nM każdego startera dla reakcji multiplex PCR (H05-H06-D09-D10) i 0,5 U Taq DNA polimerazy. Parametry reakcji to: wstępna denaturacja 3 min w 94 °C; 30 cykli po 1 min., w 94 °C, 1 min. w 59 °C i 1 min. w 72 °C; i końcowa elongacja 10 min. w 72 °C. Produkty PCR analizuje się metodą elektroforezy w żelu agarozowym.

4.2.6 Test PCR specyficzny dla 18S i ITS1 dla *D. dipsaci*

Test ten, opracowany przez Subbotina i in. (2005), zaprojektowany został jako specyficzny dla gatunku test dla *D. dipsaci* s.s. (tylko rasa normalna). Był on sprawdzony w stosunku do *D. destructor* (jedna populacja), *D. dipsaci* rasa normalna (18 populacji z różnych żywicieli oraz lokalizacji) oraz *Ditylenchus* sp. (12 populacji z różnych żywicieli oraz lokalizacji).

Metodologia

Zastosowane startery specyficzne dla *D. dipsaci*, to:

rDNA2: 5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3' (Vrain i in., 1992)

DitNF1: 5'-TTA TGA CAA ATT CAT GGC GG-3'

Amplikon ma wielkość około 263 bp dla *D. dipsaci* s.s. (rasa olbrzymia, później nazwana *D. gigas* została nieuwzględniona). Nie obserwuje się amplifikacji dla gatunków innych niż docelowy.

Skład 25 µl mieszaniny PCR to: 1× bufor PCR uzyskany z 10×buforu zawierającego 15 mM MgCl₂, 0,2 mM każdego dNTP, 60 nM każdego startera i 1 U Taq DNA polimerazy. PCR prowadzony jest w 96-dołkowej termocyklerze wyposażonym w moduł Peltiera (PTC100, MJ Research⁸) przy następujących parametrach: początkowo 4 min. w 94 °C; 35 cykli po 15 s w 94 °C, 30 s w 57 °C i 30 s w 72 °C; i końcowa elongacja 10 min. w 72 °C. Produkty PCR analizuje się metodą elektroforezy w żelu agarozowym.

4.2.7 Test PCR specyficzny dla 5.8S rDNA dla *D. dipsaci*

Test ten, opracowany przez Marek i in. (2005), zaprojektowany został jako specyficzny dla gatunku test dla *D. dipsaci*. Był on sprawdzony w stosunku do *D. dipsaci* (trzy europejskie populacje z różnych żywicieli) oraz w stosunku do populacji rodzajów niedocelowych (*Globodera pallida*, *Bursaphelenchus xylophilus*, *Rhabditis* spp.).

Metodologia

W celu identyfikacji *D. dipsaci* zostały opracowane dwa specyficzne zestawy starterów, ale najbardziej czuły (wykrycie 10 pg docelowego DNA) jest:

PF1: 5'-AAC GGC TCT GTT GGC TTC TAT-3'

PR1: 5'-ATT TAC GAC CCT GAG CCA GAT-3'

Amplikon powstały z zastosowaniem tego zestawu starterów ma w przybliżeniu wielkość 327 bp dla *D. dipsaci*.

Skład 25 µl mieszaniny PCR to: 1× bufor Taq, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM każdego dNTP, 10 pmol każdego startera (zestaw starterów PF1-PR1) i 1,5 U Taq DNA polimerazy (Fermentas⁸). Test PCR prowadzony był w 96-dołkowej termocyklerze wyposażonym w moduł Peltiera (PTC200, MJ Resarch⁸), przy następujących parametrach: 3 min w 94 °C; 30 cykli po 2 min. w 94 °C, 30 s w 62 °C i 2 min. w 72 °C; i końcowa elongacja 10 min. w 72 °C. Produkty PCR analizuje się metodą elektroforezy w żelu agarozowym.

4.2.8 Test PCR specyficzny dla 5.8S rDNA i ITS dla *D. dipsaci*

Test ten, opracowany przez Kerkoud i in. (2007), zaprojektowany został jako specyficzny dla gatunku test dla *D. dipsaci*. Był on sprawdzony w stosunku do *D. dipsaci* (dziesięć populacji

⁸ W niniejszym protokole diagnostycznym, metody (włączając w to odniesienia do marek) opisane są tak jak je opublikowano, ponieważ określa to oryginalny poziom uzyskanej czułości, specyficzności i/lub odtwarzalności. Użycie w niniejszych protokołach diagnostycznych nazw handlowych odczynników chemicznych i marek sprzętu nie pociąga za sobą wykluczenia zastosowania innych odczynników i sprzętu, które także mogą być właściwe. Procedury laboratoryjne przedstawione w protokołach mogą być dostosowane do standardów poszczególnych laboratoriów, pod warunkiem, że są one odpowiednio zwalidowane

z różnych żywicieli oraz lokalizacji), *D. africanus*, *D. destructor*, *D. myceliophagus*, *Aphelenchoides ritzemabosi* (po jednej populacji dla każdego gatunku) oraz *Ditylenchus* sp. (zgodnie z opracowaniem teraz opisywany jako *D. gigas*) (dziesięć populacji z różnych lokalizacji wyizolowanych z *V. faba*).

Metodologia

Używane są dwa zestawy specyficznych starterów, jeden do identyfikacji tylko *D. dipsaci*, a drugi do identyfikacji *D. gigas* i *D. dipsaci*. Zastosowanie obu zestawów starterów umożliwia oddzielenie *D. gigas* od *D. dipsaci*. Startery:

Pierwszy zestaw starterów:

DdpS1: 5'-TGG CTG CGT TGA AGA GAA CT-3'

rDNA2: 5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3' (Vrain i in., 1992)

Amplikon ma wielkość około 517 bp dla *D. dipsaci*. Nie obserwuje się amplifikacji w przypadku gatunków innych niż docelowe, włącznie z *D. gigas*.

Drugi zestaw starterów:

DdpS2: 5'-CGA TCA ACC AAA ACA CTA GGA ATT-3'

rDNA2: 5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3' (Vrain i in., 1992)

Amplikon ma wielkość około 707 bp dla *D. dipsaci* i *D. gigas*.

Skład 20 µl mieszaniny PCR to: 1,5 mM bufor do amplifikacji o końcowym stężeniu MgCl₂ 5 mM, 200 µM każdego dNTP, 0,5 µM każdego startera (w reakcji simplex PCR z DdpS1-rDNA2 lub DdpS2-rDNA2; w duplex PCR, końcowe stężenie startera DdpS1 wynosi 0,5 µM podczas gdy dla starterów DdpS2 i rDNA2 jest ono 1 µM) i 1 U Taq DNA polimerazy (MP Biomedicals⁸). Test PCR prowadzony był w 96-dołkowym termocyklerze wyposażonym w moduł Peltiera (GeneAmp 9600 PCR System, Perkin Elmer⁸), przy następujących parametrach: 1 min. w 94 °C; 40 cykli po 30 s w 94 °C, 30 s w 60 °C i 45 s w 72 °C; i końcowa elongacja 10 min. w 72 °C. Produkty PCR analizuje się metodą elektroforezy w żelu agarozowym.

4.2.9 Test SCAR PCR dla *D. dipsaci*

Ten SCAR PCR opracowany przez Zouhara i in. (2007), zaprojektowany został jako specyficzny dla gatunku test dla *D. dipsaci*. Był on sprawdzony tylko w stosunku do *D. dipsaci* (dziesięć europejskich populacji z różnych żywicieli).

Metodologia

Dla identyfikacji *D. dipsaci* zaprojektowane zostały dwa specyficzne zestawy starterów:

Pierwszy zestaw starterów:

DIT_2 forward: 5'-GCA ATG CAC AGG TGG ATA AAG-3'

DIT_2 reverse: 5'-CTG TCT GTG ATT TCA CGG TAG AC-3'

Amplikon powstały z zastosowaniem tego zestawu starterów ma w przybliżeniu wielkość 325 bp dla *D. dipsaci*.

Drugi zestaw starterów:

DIT_5 forward: 5'-GAA AAC CAA AGA GGC CGT AAC-3'

DIT_5 reverse: 5'-ACC TGA TTC TGT ACG GTG CAA-3'

Amplikon powstały z zastosowaniem tego zestawu starterów ma w przybliżeniu wielkość 245 bp dla *D. dipsaci*.

Skład 25 µl mieszaniny PCR to: 1× PCR bufor (Fermentas[®]), 1,5 mM MgCl₂, 200 µM każdego dNTP, 10 pmol każdego ze starterów (albo z zestawu starterów DIT_2 lub z zestawu DIT_5), 1,5 U Taq DNA polimerazy (Fermentas[®]) oraz 50 ng DNA jako matrycy. PCR prowadzony jest w 96-dołkowej termocyklerze wyposażonym w moduł Peltiera (PTC200, MJ Research[®]), przy zastosowaniu następujących parametrów: 3 min. w 94 °C; 30 cykli po 1 min. w 94 °C, 30 s w 60 °C i 1 min. w 72 °C; i końcowa elongacja 10 min. w 72 °C. Produkty PCR analizuje się metodą elektroforezy w żelu agarozowym.

4.2.10 Kontrole w testach molekularnych

Aby wynik testu można było uznać za wiarygodny - zależnie od rodzaju przeprowadzanego testu oraz od wymaganego poziomu pewności - należy rozważyć użycie właściwych kontroli dla każdej serii izolacji kwasu nukleinowego i amplifikacji kwasu nukleinowego, czy to z docelowego agrofaga czy też docelowego kwasu nukleinowego. Minimalnymi kontrolami, jakie powinny być zastosowane w badaniu są: kontrola pozytywna kwasu nukleinowego, negatywna kontrola amplifikacji oraz negatywna kontrola ekstrakcji.

Kontrola pozytywna kwasu nukleinowego. Kontrola ta używana jest w celu monitorowania wydajności amplifikacji (poza procesem ekstrakcji). W tym celu można wykorzystać wstępnie przygotowany (przechowywany) kwas nukleinowy docelowego nicienia.

Negatywna kontrola amplifikacji (kontrola pozbawiona matrycy). Podczas wykonywania konwencjonalnego PCR kontrola ta niezbędna jest w celu wykluczenia wyników fałszywie pozytywnych będących skutkiem kontaminacji powstałej podczas procesu przygotowywania

mieszaniny reakcyjnej. Na etapie amplifikacji dodawana jest woda o czystości molekularnej, której użyto do przygotowania mieszaniny reakcyjnej.

Negatywna kontrola ekstrakcji. Kontrola ta stosowana jest w celu monitorowania kontaminacji podczas procesu ekstrakcji kwasów nukleinowych. Kontrola ta obejmuje ekstrakcję kwasu nukleinowego i późniejszą amplifikację jedynie z buforu ekstrakcyjnego. W przypadku, gdy spodziewana jest duża liczba próbek pozytywnych zaleca się zastosowanie w badaniu kontroli wielokrotnych.

4.2.11 Interpretacja wyników konwencjonalnego PCR

Specyficzny względem patogenu PCR uznany zostanie za ważny, tylko wtedy, gdy spełnione zostaną oba poniższe kryteria:

- kontrola pozytywna generuje amplikon o wielkości właściwej dla docelowego gatunku nicieni,
- w negatywnej kontroli ekstrakcji oraz w negatywnej kontroli amplifikacji brak jest amplikonów o wielkości właściwej dla docelowych gatunków nicieni,

5. Zapisy

Należy zachować zapisy i materiał dowodowy, tak jak opisano to w ISPM 27 (*Protokoły diagnostyczne dla organizmów podlegających przepisom*).

W przypadku gdy wynik diagnozy może być niepomyślny dla innych umawiających się stron, zapisy i dowody (zwłaszcza utrwalone lub spreparowane osobniki, fotografie istotnych cech diagnostycznych, wyizolowane DNA, fotografie żelu, o ile ma to zastosowanie), powinny być zachowane przynajmniej przez rok.

6. Punkty kontaktowe do uzyskania dalszych informacji

Dalsze informacje na temat tego protokołu mogą być uzyskane od:

Biosystematics Division, ARC-PPRI, Private Bag X134, Queenswood, 0121 Republika Południowej Afryki (Antoinette Swart; e-mail: SwartA@arc.agric.za).

Plant Pest Diagnostic Center, California Department of Food and Agriculture, 3294 Meadowview Road, Sacramento, CA 95832-1448, United States (Sergei Subbotin; e-mail: subbotin@ucr.edu).

Charlottetown Laboratory – Potato Diseases, Canadian Food Inspection Agency, 93 Mount Edward Rd, Charlottetown PEI, C1A 5T1, Kanada (Harvinder Bennypaul; e-mail: bennypaulhs@inspection.gc.ca).

Prośba o rewizję protokołu diagnostycznego może być przedłożona przez krajową organizację ochrony roślin (NPPO), regionalną organizację ochrony roślin (RPPO) lub pomocnicze gremia Komisji ds. Środków Fitosanitarnych (CPM) poprzez Sekretariat IPPC (ippc@fao.org), który skieruje ją do Panelu Technicznego ws. Protokołów Diagnostycznych (TPDP).

7. Podziękowania

Projekt tego protokołu przygotowali Antoinette Swart (Nematology Unit, Biosystematics Division, ARC-PPRI, Republika Południowej Afryki), Eliseo Jorge Chaves (INTA-Estación Experimental de Balcarce, Laboratorio de Nematología, Argentyna) i Renata C.V. Tenente (EMBRAPA, Recursos Genéticos e Biotecnología, Brazylia).

Opis metod molekularnych przygotował Sergei Subbotin (Plant Pest Diagnostic Center, California Department of Food and Agriculture, 3294 Meadowview Road, Sacramento, CA 95832-1448, Stany Zjednoczone).

Następujący nematolodzy udoskonalili niniejszy protokół przekazując swoje komentarze:

- Harvinder Bennypaul (Canadian Food Inspection Agency, Kanada),
- Johannes Hallmann (Julius Kühn-Institut, Niemcy),
- Mikhail Pridannikov (Center of Parasitology, A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Rosja),
- P. Castillo (Instituto Agricultura Sostenible, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Hiszpania).

8. Materiały źródłowe

Andrássy, I. 1984. Klasse Nematoda (Ordnungen *Monhysterida*, *Desmoscolecida*, *Araeolaimida*, *Chromadorida*, *Rhabditida*). W *Bestimmungsbücher zur Bodenfauna Europas*, pp. 24–25. Stuttgart, Germany, Gustav Fischer Verlag. 509 pp.

Andrássy, I. 2007. Free-living nematodes of Hungary (Nematoda Errantia) II. W *Pedazoologica Hungarica* No. 4, pp. 145–154. Budapest, Hungarian Natural History Museum and Systematic Zoology Research Group of the Hungarian Academy of Sciences. 496 pp.

Andrássy, I., Farkas, K. 1988. *Kertészeti növények fonálféreg kártevői*. Budapest, Mezőgazdasági Kiadó. pp. 181–198. 418 pp.

Barker, J.R., Lucas, G.B. 1984. Nematode parasites of tobacco. W W.R. Nickle, ed. *Plant and insect nematodes*, pp. 213–242. New York, Marcel Dekker Inc. 925 pp.

- Bridge, J., Hunt, D.** 1986. Nematodes. W *Pest control in tropical onions*, pp. 65–77. London, Tropical Development and Research Institute and Office of Overseas Development Administration, Tropical Development and Research Institute. 109 pp.
- Brodie, B.B.** 1998. Potato. W K.R. Barker, G.A. Pederson & G.L. Windham, eds. *Plant and nematode interactions*, pp. 567–594. Madison, WI, American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc. and Soil Science Society of America, Inc. 772 pp.
- Brown, D.J.F., Dalmasso, A., Trudgill, D.L.** 1993. Nematode pests of soft fruits and vines. W K. Evans, D.L. Trudgill & J.M. Webster, eds. *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*, pp. 427–462. Wallingford, UK, CABI. 656 pp.
- Brzeski, M.W.** 1998. *Nematodes of Tylenchina in Poland and temperate Europe*. Warsaw, Museum and Institute of Zoology, Polish Academy of Sciences. 397 pp.
- Chizhov, V.N., Borisov, B.A., Subbotin, S.A.** 2010. A new stem nematode, *Ditylenchus weischeri* sp.n. (Nematoda: Tylenchida), a parasite of *Cirsium arvense* (L) Scop. in the Central Region of the Non-Chernozem Zone of Russia. *Russian Journal of Nematology*, 18: 95–102.
- Cook, R., Yeates, G.W.** 1993. Nematode pests of grassland and forage crops. W K. Evans, D.L. Trudgill and J.M. Webster, eds. *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*, pp. 305–350. Wallingford, UK, CABI. 656 pp.
- Cooke, D.** 1993. Nematode parasites of sugarbeet. W K. Evans, D.L. Trudgill and J.M. Webster, eds. *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*, pp. 133–169. Wallingford, UK, CABI. 656 pp.
- Coolen, W.A., D’Herde, C.J.** 1972. *A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue*. Ghent, Belgium, Ministry of Agriculture, State Agricultural Research Centre. 77 pp.
- Courtney, W.D.** 1962. Stem nematode of red clover in the Pacific Northwest. *Bulletin of the Washington State Agricultural Experiment Station*, 640: 1–17.
- Dallimore, C.E., Thorne, G.** 1951. Infection of sugar beets by *Ditylenchus destructor* Thorne, the potato rot nematode. *Phytopathology*, 41: 872–874.
- De Ley, P., Blaxter, M.** 2003. A new system for Nematoda: Combining morphological characters with molecular trees, and translating clades into ranks and taxa. *Nematological Monographs and Perspectives*, 2: 1–21.
- Edwards, E.E.** 1937. On the eelworm disease of primulas caused by *Anguillula dipsaci*, Kühn. *Journal of Helminthology*, 15: 221–232.

- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization).** 2013a. PQR: EPPO Plant Quarantine Data Retrieval System. Dostępny w <http://www.eppo.org/DATABASES/pqr/pqr.htm>
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization).** 2013b. Diagnostic protocols for regulated pests: *Pictorial glossary of morphological terms in nematology*. EPPO Technical Document No. 1056 (Rev. 4). Dostępny w http://www.eppo.int/QUARANTINE/diag_activities/EPPO_TD_1056_Glossary.pdf.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization).** 2013c. *Nematode extraction*. EPPO Standard PM 7/119(1). EPPO Bulletin, 43: 471–485.
- Esquibet, M., Grenier, E., Plantard, O., Andaloussi, F.A., Caubel, G.** 2003. DNA polymorphism in the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*: Development of diagnostic markers for normal and giant races. *Genome*, 46: 1077–1083.
- Evans, K., Trudgill, D.L.** 1992. Pest aspects of potato production Part 1. The nematode pests of potato. W P.M. Harris, ed. *The potato crop*, 2nd edn, pp. 438–475. London, Chapman and Hall. 909 pp.
- Ferris, J.M., Ferris, V.R.** 1998. Biology of plant parasitic nematodes. W K.R. Barker, G.A. Pederson & G.L. Windham, eds. *Plant and nematode interactions*, pp. 21–36. Madison, WI, American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc. and Soil Science Society of America, Inc. 772 pp.
- Filipjev, I.N.** 1936. On the classification of the Tylenchinae. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 3: 80–82.
- Flegg, J.J.M., Hooper, D.J.** 1970. Extraction of free-living stages from soil. W J.F. Southey, ed. *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*, Technical Bulletin 2, pp. 5–22. London, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. 148 pp.
- Goodey, J.B.** 1952. The influence of the host on the dimensions of the plant parasitic nematode, *Ditylenchus destructor*. *Annals of Applied Biology*, 30: 468–474.
- Goodey, J.B.** 1963. *Soil and freshwater nematodes*. Harpenden, UK, Nematology Department, Rothamsted Experimental Station, and London, Methuen & Co. Ltd. 544 pp.
- Griffin, G.D.** 1985. Nematode parasites of alfalfa, cereals and grasses. W W.R. Nickle, ed. *Plant and insect nematodes*, pp. 243–322. New York, Marcel Dekker Inc. 925 pp.
- Hesling, J.J.** 1974. *Ditylenchus myceliophagus*. CIH descriptions of plant-parasitic nematodes, Set 3, No. 36. St Albans, UK, Commonwealth Institute of Helminthology (CIH). 4 pp.

- Heyns, J.** 1971. *A guide to the plant and soil nematodes of South Africa*. Cape Town, A.A. Balkema. 233 pp.
- Hooper, D.J.** 1972. *Ditylenchus dipsaci*. CIH descriptions of plant-parasitic nematodes, Set 1, No. 14. St Albans, UK, Commonwealth Institute of Helminthology (CIH) 4 pp.
- Hooper, D.J.** 1973. *Ditylenchus destructor*. CIH descriptions of plant-parasitic nematodes, Set 2, No. 21. St Albans, UK, Commonwealth Institute of Helminthology (CIH) 4 pp.
- Hooper, D.J.** 1986. Extraction of nematodes from plant tissue. W J.F. Southey, ed. *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*, Reference Book 402, 6th edn, pp. 51–58. London, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. 202 pp.
- Hooper, D.J., Hallmann, J., Subbotin, S.A.** 2005. Methods for extraction, processing and detection of plant and soil nematodes. W M. Luc, R.A. Sikora & J. Bridge, eds. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*, 2nd edn, pp. 53–86. Wallingford, UK, CABI. 871 pp.
- Jeszke, A., Budziszewska, M., Dobosz, R., Stachowiak, A., Protasewicz, D., Wieczorek, P., Obreńska-Stęplowska, A.** 2013. A comparative and phylogenetic study of *Ditylenchus dipsaci*, *Ditylenchus destructor* and *Ditylenchus gigas* populations occurring in Poland. (Short Communication.) *Journal of Phytopathology*, 162: 61–67.
- Ji, L., Wang, J.C., Yang, X.L., Huang, G.M., Lin, M.S.** 2006. [PCR-RFLP patterns for differentiation of three *Ditylenchus* species.] *Journal of Nanjing Agricultural University*, 29: 39–43 (po Chińsku).
- Johnson, C.S.** 1998. Tobacco. W K.R. Barker, G.A. Pederson, G.L. Windham, eds. *Plant and nematode interactions*, pp. 487–522. Madison, WI, American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc. and Soil Science Society of America, Inc. 772 pp.
- Karssen, G., Willemsen, N.M.** 2010. The spiculum: An additional useful character for the identification of *Ditylenchus dipsaci* and *D. destructor* (Nematoda: Anguinidae). *EPPO Bulletin*, 40: 211–212.
- Kerkoud, M., Esquibet, M., Plantard, O.** 2007. Identification of *Ditylenchus* species associated with Fabaceae seeds based on a specific polymerase chain reaction of ribosomal DNA-ITS regions. *European Journal of Plant Pathology*, 118: 323–332.
- Kleynhans, K.P.N.** 1997. *Collecting and preserving nematodes*. A manual for a practical course in nematology by SAFRINET, the southern African (SADC) LOOP of BioNET-INTERNATIONAL, ARC. Pretoria, Plant Protection Research Institute. 52 pp.
- Kühn, J.** 1857. Über das Vorkommen von Anguillulen in erkrankten Blütenköpfen von *Dipsacus fullonum* L. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, 9: 129–137.

Leal-Bertioli, S.C.M., Tenente, R.C.V., Bertioli, D.J. 2000. ITS sequence of populations of the plant-parasitic nematode *Ditylenchus dipsaci*. *Nematologia Brasileira*, 24: 83–85.

Marek, M., Zouhar, M., Rysanek, P., Havranek, P. 2005. Analysis of ITS sequences of nuclear rDNA and development of a PCR-based assay for the rapid identification of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* (Nematoda: Anguinidae) in plant tissues. *Helminthologia*, 42: 49–56.

McDonald, A.H., Nicol, J.M. 2005. Nematode parasites of cereals. W M. Luc, R.A. Sikora & J. Bridge, eds. *Plant parasitic nematodes on subtropical and tropical agriculture*, 2nd edn, pp. 131–192. Wallingford, UK, CABI. 896 pp.

Mollov, D.S., Subbotin, S.A., Rosen, C. 2012. First report of *Ditylenchus dipsaci* on garlic in Minnesota. *Plant Disease*, 96: 1707.

Nemapix. 1999. J.D. Eisenback, U. Zunke, eds. *A journal of nematological images*, Vol. 2. Blacksburg, VA, Mactode Publications.

Nemapix. 2000. J.D. Eisenback & U. Zunke, eds. *A journal of nematological images*, Vol. 1, 2nd edn. Blacksburg, VA, Mactode Publications.

Nemapix. 2002. J.D. Eisenback & U. Zunke, eds. *A journal of nematological images*, Vol. 3. Blacksburg, VA, Mactode Publications.

Netscher, C., Sikora, J.W. 1990. Nematodes in vegetables. W M. Luc, R.A. Sikora & J. Bridge, eds. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*, 2nd edn, pp. 237–283, Wallingford, UK, CABI. 896 pp.

Oliveira, R.D.L., Santin, Â.M., Seni, D.J., Dietrich, A., Salazar, L.A., Subbotin, S.A., Mundo-Ocampo, M., Goldenberg, R., Barreto, R.W. 2013. *Ditylenchus gallaeformans* sp.n. (Tylenchida: Anguinidae): A neotropical nematode with biocontrol potential against weedy Melastomataceae. *Nematology*, 15: 179–196.

Palazova, G., Baicheva, O. 2002. Electrophoretic studies of *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn, 1857) Filipjev, 1936 from two hosts: *Allium sativum* and *Allium cepa*. *Experimental Pathology and Parasitology*, 5: 39–40.

Palmisano, A.M., Tacconi, R., Trotti, G.C. 1971. Sopravvivenza di *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev Nematoda: tylenchidae) al processo digestive nei suini, equini e bovini. *Redia*, 52: 725–737.

Potter, J.W., Olthof, T.H.A. 1993. Nematode pests of vegetable crops. W K. Evans, D.L. Trudgill & J.M. Webster, eds. *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*, pp. 171–208. Wallingford, UK, CABI. 656 pp.

- Powers, T.O., Szalanski, A.L., Mullin, P.G., Harris, T.S., Bertozzi, T., Griesbach, J.A.** 2001. Identification of seed gall nematodes of agronomic and regulatory concern with PCR-RFLP of ITS1. *Journal of Nematology*, 33: 191–194.
- Rivoal, R., Cook, R.** 1993. Nematode pests of cereals. W K. Evans, D.L. Trudgill & J.M. Webster, eds. *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*, pp. 259–304. Wallingford, UK, CABI. 656 pp.
- Roberts, H.** 1981. New or unusual host-plant records for plant-parasitic nematodes, 1977–80. *Plant Pathology*, 30: 182.
- Rojankovski, E., Ciurea, A.** 1986. Contributions to the study of interactions between the potato rot nematode, *Ditylenchus destructor* Thorne, and fungi in the potato disease complex. *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz*, 22: 101–106.
- Seinhorst, J.W.** 1959. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica*, 4: 67–69.
- Siddiqi, M.R.** 2000. *Tylenchida parasites of plants and insects*, 2nd edn. Wallingford, UK, CABI. 864 pp.
- Sikora, R.A., Greco, N., Silva, J.F.V.** 2005. Nematode parasites of food legumes. W M. Luc, R.A. Sikora & J. Bridge, eds. *Plant parasitic nematodes on subtropical and tropical agriculture*, 2nd edn, pp. 259–318. Wallingford, UK, CABI. 896 pp.
- Sousa, A.I., Gomes, V.F., Tenente, R.C.V.** 2003. Tratamento físico aplicado as sementes de melao (*Cucumis melo* L.), importadas da Holanda, na erradicação de *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn, 1857) Filipjev, 1936. *Nematologia Brasileira*, 27: 223–225.
- Southey, J.F.** 1993. Nematodes of ornamental and bulb crops. W K. Evans, D.L. Trudgill & J.M. Webster, eds. *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*, pp. 463–500. Wallingford, UK, CABI. 656 pp.
- Sturhan, D., Brzeski, M.W.** 1991. Stem and bulb nematodes, *Ditylenchus* spp. W W.R. Nickle, ed. *Manual of Agricultural Nematology*, pp. 423–464. New York, Marcel Decker Inc. 1064 pp.
- Subbotin, S.A., Madani, M., Krall, E., Sturhan, D., Moens, M.** 2005. Molecular diagnostics, taxonomy and phylogeny of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* species complex based on the sequences of the ITS-rDNA. *Phytopathology*, 95: 1308–1315.
- Tenente, R.C.V., Evans, A.A.F.** 1997. Electrophoresis of proteins from several races of *Ditylenchus dipsaci* recovered from dried infested courgette tissue. *Nematologia Brasileira*, 21: 84–91.

Thorne, G. 1945. *Ditylenchus destructor*, n. sp., the potato rot nematode, and *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn, 1857) Filipjev, 1936, the teasel nematode (Nematoda: Tylenchidae). *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 12: 27–33.

Van der Vegte, F.A., Daiber, K.C. 1983. A preliminary report on the occurrence of *Ditylenchus destructor* on the ornamental *Liatris spicata* and efforts to eradicate the former. *Proceedings of the 6th Symposium and General Meeting of the Nematological Society of Southern Africa*.

Viglierchio, D.R. 1971. Race genesis in *Ditylenchus dipsaci*. *Nematologica*, 17: 386–392.

Viscardi, T., Brzeski, M.W. 1993. DITYL: Computerized key for species identification of *Ditylenchus* (Nematoda: Anguinidae). *Fundamental and Applied Nematology*, 16: 389–392.

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

Vrain, T.C., Wakarchuk, A.C., Levesque, A.C., Hamilton, R.I. 1992. Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. *Fundamental and Applied Nematology*, 15: 563–573.

Webster, J.M., Anderson, R.V., Baillie, D.L., Beckenbach, K., Curran, J., Rutherford, T. 1990. DNA probes for differentiating isolates of the pinewood nematode species complex. *Revue de Nématologie*, 13: 255–263.

Wendt, K.R., Swart, A., Vrain, T.C., Webster, J.M. 1995. *Ditylenchus africanus* sp.n. from South Africa: A morphological and molecular characterization. *Fundamental and Applied Nematology*, 18: 241–250.

Wendt, K.R., Vrain, T.C., Webster, J.M. 1993. Separation of three species of *Ditylenchus* and some host races of *D. dipsaci* by restriction fragment length polymorphism. *Journal of Nematology*, 25: 555–563.

Zouhar, M., Marek, M., Douda, O., Mazáková, J., Ryšánek, P. 2007. Conversion of sequence-characterized amplified region (SCAR) bands into high-throughput DNA markers based on RAPD technique for detection of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* in crucial plant hosts. *Plant Soil and Environment*, 53: 97–104.

Zouhar, M., Marek, M., Licinio, J., Ryšánek, P. 2002. Using point mutations in rDNA for differentiation of biotypes of *Ditylenchus dipsaci* from the Czech Republic. *Plant Protection Science*, 38 (Special 2): 358–360.

9. Ilustracje



Ryc.1. Nasiono *Vicia faba* porażone przez *Ditylenchus dipsaci* (z widoczną wełną z nicieni).
Fotografia dzięki życzliwości G. Caubel, Nemapix (1999).



Ryc. 2. *Allium sativum* porażony przez *Ditylenchus dipsaci*.
Fotografia dzięki życzliwości G. Caubel, Nemapix (1999).



Ryc. 3. Młode rośliny *Allium cepa* porażone przez *Ditylenchus dipsaci*.
Fotografia dzięki życzliwości E. Hennig, Państwowa Inspekcja Ochrony Roślin i Nasiennictwa,
Toruń, Polska.



Ryc. 4. Czosnek porażony przez *Ditylenchus dipsaci*.
Fotografia dzięki życzliwości G. Caubel, Nemapix (2002).



Ryc. 5. *Narcissus* spp. Porażony przez *Ditylenchus dipsaci*.
Fotografia dzięki życzliwości G. Caubel, Nemapix (1999).



Ryc. 6. Przekrój poprzeczny przez cebulę *Narcissus* sp. porażoną przez *Ditylenchus dipsaci*. Fotografia dzięki życzliwości C.W. Laughlin, *Nemapix* (2002).

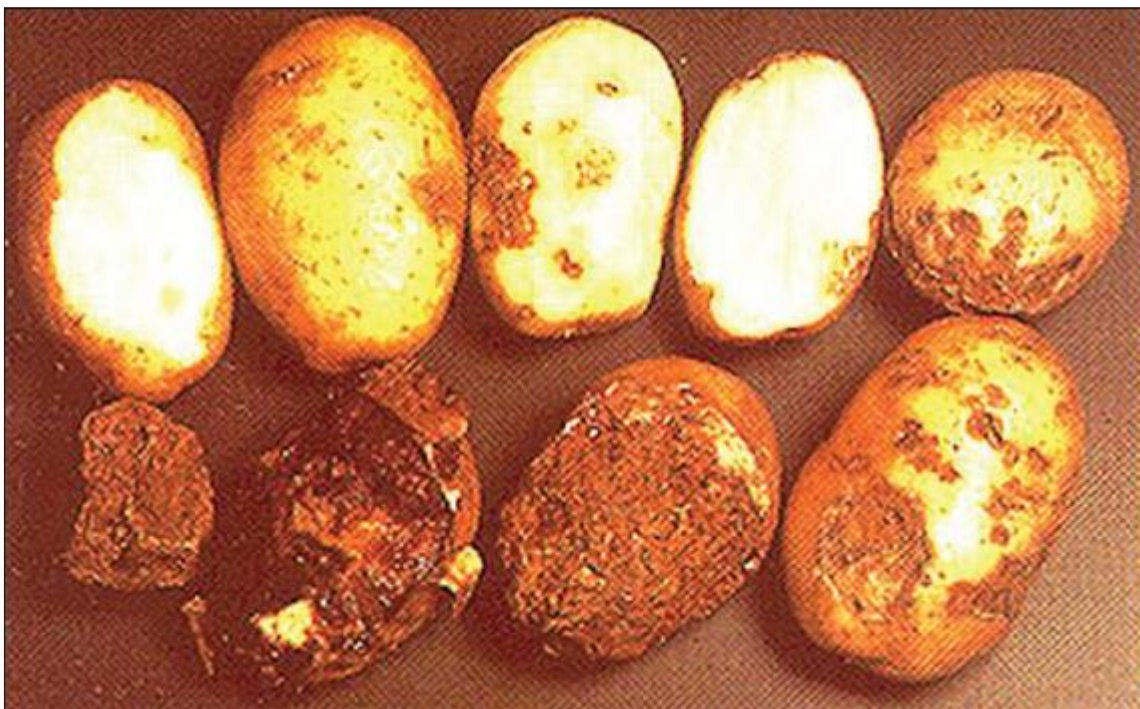


Ryc. 7. Przekrój poprzeczny buraka cukrowego. porażonego przez *Ditylenchus dipsaci*. Fotografia dzięki życzliwości C. Hogger, *Nemapix* (1999).



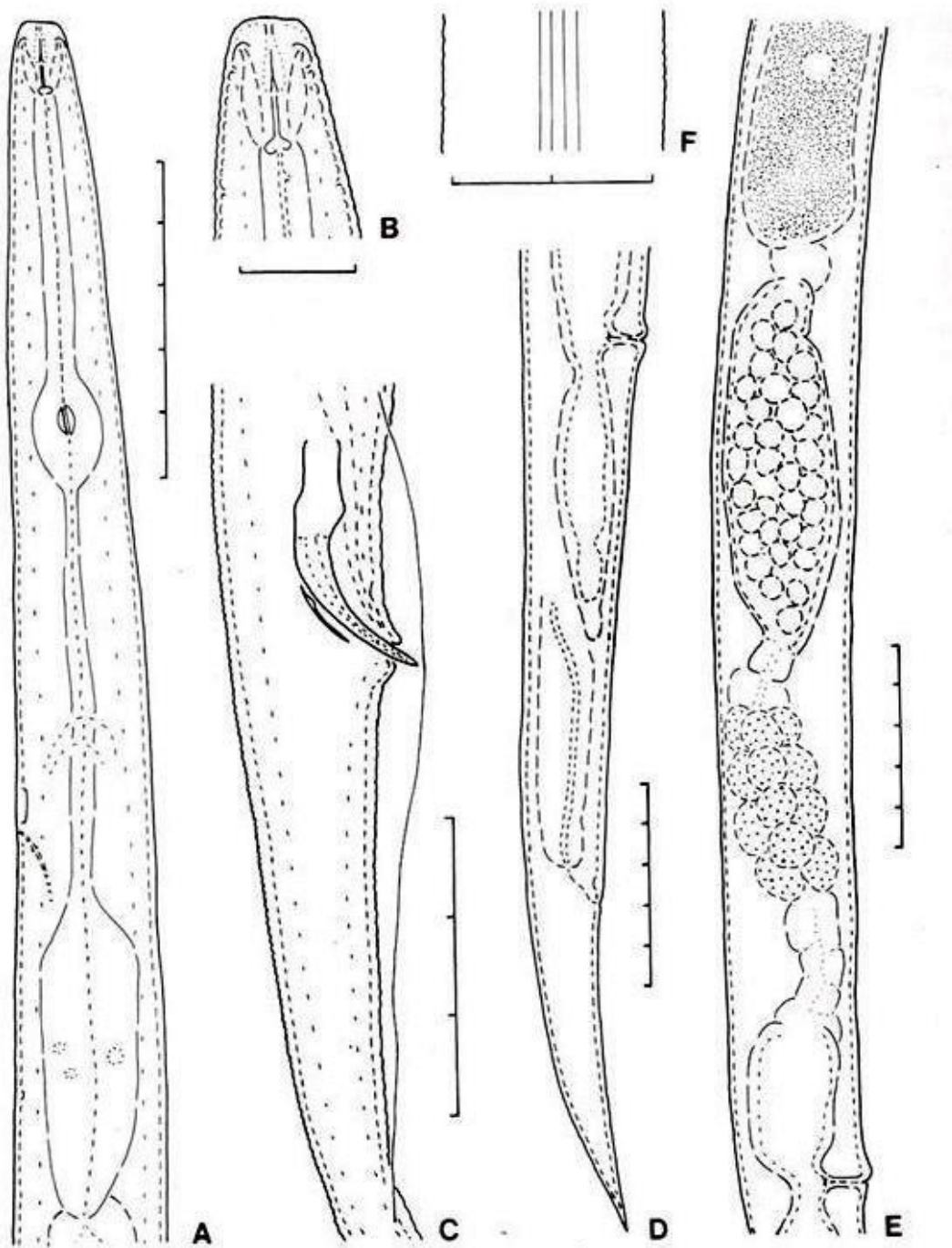
Ryc. 8. Poprzeczny przekrój przez ziemniak porażony przez *Ditylenchus destructor* w porównaniu z ziemniakiem nieporażonym

Fotografia dzięki życzliwości S. Ayoub, Nemapix (2000).

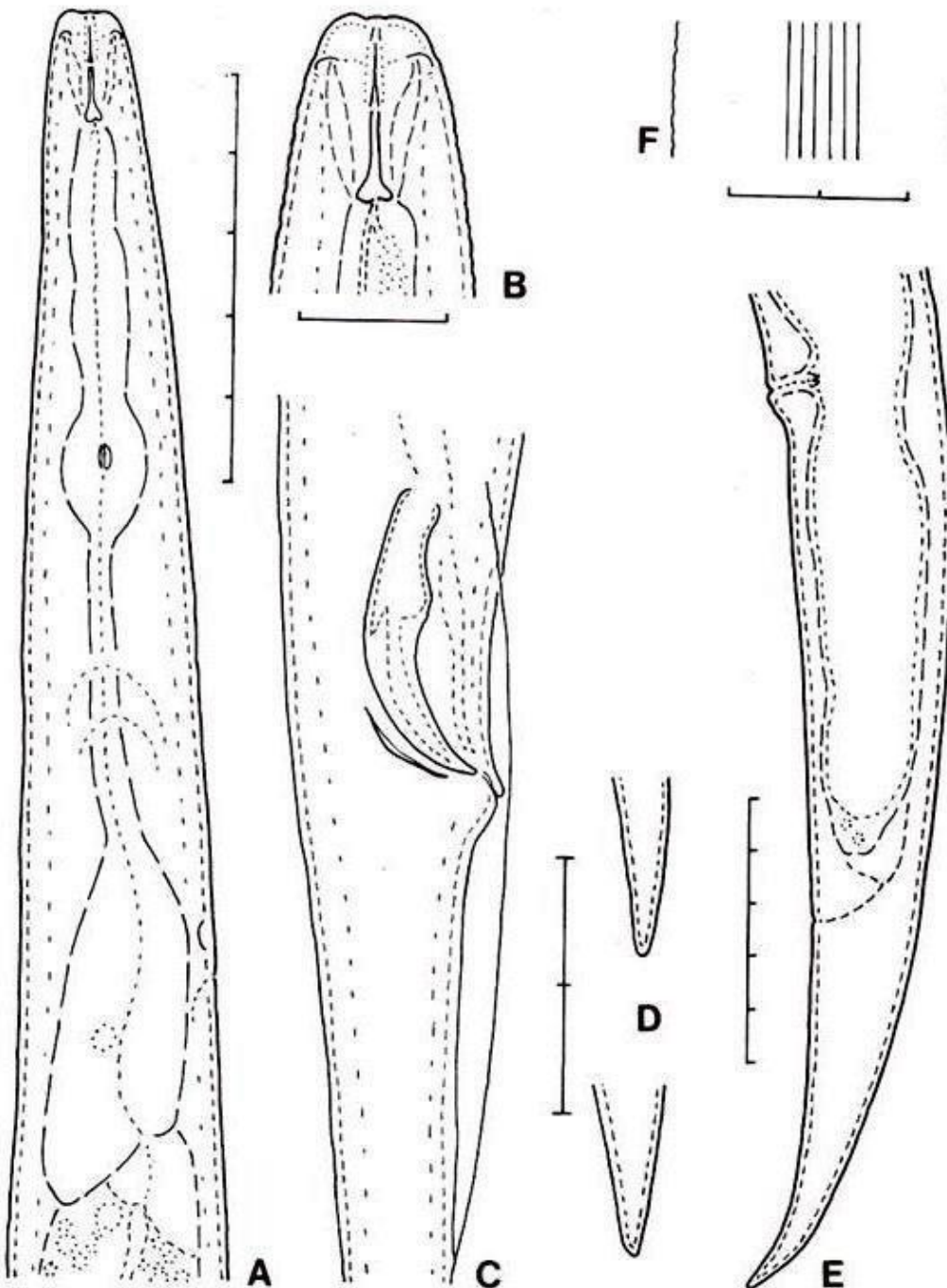


Ryc. 9. Ziemniaki o różnym stopniu porażenia przez *Ditylenchus destructor*.

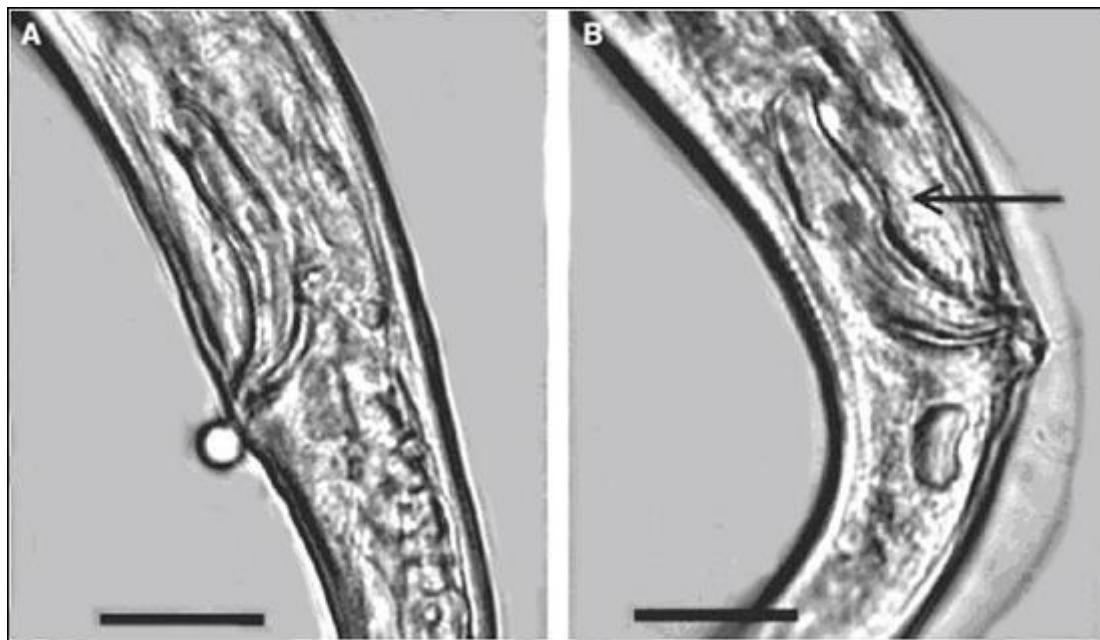
Fotografia dzięki życzliwości H. Andersen.



Ryc. 10 *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 1936 (według Sturhana i Brzeskiego, 1991). (A) samica, okolice przetyku; (B) głowa samicy; (C) samiec, okolica występowania spikul; (D) samica, tylna część ciała; (E) część układu rozrodczego samicy; i (F) pole boczne w środkowej części ciała. Każda jednostka na skali wielkości = 10 μm .



Ryc. 11. *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945 (według Sturhana and Brzeskiego, 1991). (A) samica, okolice przetyku; (B) głowa samicy; (C) samiec, okolica występowania spikul; (D) zakończenie ogona dwóch samic; (E) część układu rozrodczego samicy; i (F) pole boczne w środkowej części ciała. Każda jednostka na skali wielkości = 10 μm .



Ryc. 12. Spikule u nicieni z rodzaju *Ditylenchus*: (A) *D. dipsaci* i (B) *D. destructor*.
Strzałka = wybrzuszenie. Skala wielkości = 12 μ m
Fotografia dzięki życzliwości Karssen i Willemsen (2010).

Historia publikacji

To nie jest oficjalna część standardu

2006-04 CPM-1 (2006) dodała temat do programu roboczego (Nicienie, 2006-008).

2004-11 Stały Komitet (SC) dodał temat: *Ditylenchus destructor* / *D. dipsaci* (2004-017).

2010-07 Projekt przedstawiony na spotkaniu TPDP.

2013-04 Konsultacja przez ekspertów.

2013-06 Projekt przedstawiony na spotkaniu TPDP.

2014-05 SC zatwierdził do konsultacji przez członków (2014_eSC_May_11).

2014-07 Konsultacja przez członków.

2015-04 TPDP zatwierdził projekt dla SC (2015_eTPDP_Apr_03).

2015-06 SC zatwierdził okres notyfikacji dla Protokołu Diagnostycznego (2015_eSC_Nov_02).

2015-08 SC przyjął Protokół Diagnostyczny w imieniu CPM (nie otrzymano formalnego sprzeciwu).

ISPM 27. Załącznik 8. *Ditylenchus dipsaci* and *Ditylenchus destructor* (2015). Rzym, IPPC, FAO.
Historia publikacji po raz ostatni zmodyfikowana: 2015-12

Tłumaczenie z jęz. angielskiego: Witold Karnkowski (GIORiN CL), 31.10.2016.