

МЕЖДУНАРОДНЫЕ СТАНДАРТЫ ПО ФИТОСАНИТАРНЫМ МЕРАМ

МСФМ 27 ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПРОТОКОЛЫ

ДП 8: *Ditylenchus dipsaci* и *Ditylenchus destructor*

Принят в 2015 году; опубликован в 2015 году

Содержание

1.	Информация о вредном организме	3
1.1	<i>Ditylenchus dipsaci</i>	3
1.2	<i>Ditylenchus destructor</i>	4
2.	Таксономическая информация	4
3.	Выявление	5
3.1	Хозяева и признаки заражения	5
3.1.1	<i>Ditylenchus dipsaci</i>	5
3.1.2	<i>Ditylenchus destructor</i>	9
3.2	Извлечение нематод	10
3.2.1	Извлечение из луковиц и зубков чеснока	10
3.2.2	Извлечение из почвы и растительного материала	10
4.	Идентификация	11
4.1	Морфологическая идентификация	12
4.1.1	Подготовка образцов	12
4.1.2	Морфологические диагностические признаки	12
4.2	Молекулярная идентификация	15
4.2.1	<i>Ditylenchus dipsaci</i>	16
4.2.2	<i>Ditylenchus destructor</i>	16
4.2.3	Выделение ДНК	16
4.2.4	Анализ ПЦР-ПДРФ для идентификации <i>D. dipsaci</i> и <i>D. destructor</i> , основанный на рНК ITS-области	17
4.2.5	ПЦР с использованием SCAR-праймеров для идентификации <i>D. dipsaci</i>	17
4.2.6	18S и ITS1-специфичный ПЦР-анализ для идентификации <i>D. dipsaci</i>	18

4.2.7	5.8S рДНК-специфичный ПЦР-анализ для идентификации <i>D. dipsaci</i>	19
4.2.8	5.8S рДНК и ITS-специфичный ПЦР-анализ для идентификации <i>D. dipsaci</i>	19
4.2.9	ПЦР с использованием SCAR-праймеров для <i>D. dipsaci</i>	20
4.2.10	Контроли молекулярных анализов	20
4.2.11	Интерпретация результатов традиционной ПЦР	21
5.	Данные	21
6.	Контактные адреса для получения дополнительной информации	21
7.	Благодарности	21
8.	Справочные материалы	22
9.	Рисунки	27

1. Информация о вредном организме

Входящие в большой род *Ditylenchus* Filipjev, 1936 виды нематод распространены во всем мире, и большинство видов являются грибоядными. Однако данный род включает несколько видов, имеющих большое экономическое значение как вредители высших растений (Sturhan and Brzeski, 1991). Необходимо отметить, что, хотя есть несколько растений (например, свекла, люцерна, клевер), которые поражаются как *Ditylenchus dipsaci*, так и *Ditylenchus destructor*, два этих вида редко встречаются вместе на одном растении (Andrássy and Farkas, 1988).

1.1 *Ditylenchus dipsaci*

D. dipsaci sensu lato (s.l.), или стеблевая нематода, поражает свыше 1200 видов дикорастущих и культивируемых растений. Многие сорные растения и злаковые травы являются для данной нематоды хозяевами и могут играть важную роль в ее выживании в отсутствие культивируемых растений. Морфологический, биохимический, молекулярный и кариологический анализы различных популяций и рас *D. dipsaci* s.l. указывают, что это комплекс по меньшей мере 30 специфичных по хозяину рас, с ограниченными ареалами хозяев. Jeszke *et al.* (2013) разделили этот комплекс на две группы, в первую из которых входят диплоидные популяции, характеризующиеся "нормальным" размером и названные *D. dipsaci sensu stricto* (s.s.). В эту группу входит большинство описанных к настоящему времени популяций. Во вторую группу входят полиплоидные популяции. На сегодняшний день эта группа включает *Ditylenchus gigas* Vovlas *et al.*, 2011 ("гигантская раса" *D. dipsaci*, паразитирующая на *Vicia faba* (конский боб)); *D. weischeri* Chizhov *et al.*, 2010 (паразитирующая на *Cirsium arvense* (бодяк полевой)) и три неописанных *Ditylenchus* spp., обозначаемых D, E и F, которые ассоциируются с видами растений семейств Fabaceae (бобовые), Asteraceae (астровые) и Plantaginaceae (подорожниковые) соответственно (Jeszke *et al.*, 2013). Из всех этих видов только *D. dipsaci* s.s. и его морфологически более крупный вариант *D. gigas* являются экономически значимыми вредителями растений. Настоящий протокол включает информацию по дифференциации *D. dipsaci* s.s. и *D. gigas*.

D. dipsaci живет главным образом как эндопаразит в надземных частях растений (стебли, листья и цветы), но поражает также луковицы, клубни и корневища. Эта нематода передается с семенами *V. faba*, *Medicago sativa* (люцерна), *Allium cepa* (лук), *Trifolium* spp. (клевер), *Dipsacus* spp. (ворсянка) и *Cucumis melo* (дыня) (Sousa *et al.*, 2003; Sikora *et al.*, 2005). Крайне важен тот факт, что ювенильные нематоды IV возраста могут долгое время переносить обезвоживание, порой до 20 лет или более (Barker and Lucas, 1984). Когда растительная ткань начинает высыхать, такие нематоды собираются в клубок, впадая в криптобиотическое состояние и образуя так называемый "нематодный войлок" (рис. 1). Нематодный войлок часто можно видеть на семенах в сильно зараженных стручках и на сухих растительных остатках (например, остающихся на поле после уборки урожая). Присутствие инвазионных ювенильных нематод IV возраста в семенах и на сухом растительном материале играет важную роль в пассивном расселении нематод на большие расстояния. Нематода в обезвоженном состоянии может пережить прохождение через ЖКТ свиней и крупного рогатого скота на поверхности или в толще зараженных семян (Palmisano *et al.*, 1971).

Хотя *D. dipsaci* считается вредителем высших растений, Viglierchio (1971) сообщает, что калифорнийская популяция *D. dipsaci* из *Allium sativum* (чеснок) в лабораторных условиях могла размножаться на почвенных грибах (*Verticillium* и *Cladosporium*).

Известно, что *D. dipsaci* переносит патогены высших растений (*Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* (син. *Clavibacter michiganensis* подвид *insidiosus*, *Corynebacterium insidiosum*), вызывающих бактериальное увядание люцерны).

По данным ЕОКЗР (2013а), *D. dipsaci* встречается в следующих регионах (данные о перехвате в импортированных товарах не учитываются): Европа, Азия, Африка, Северная Америка, Центральная Америка и Карибский бассейн, Южная Америка и Океания.

1.2 *Ditylenchus destructor*

D. destructor, или стеблевая нематода картофеля, поражает почти исключительно подземные части растений (т.е. клубни, корневища и стеблеобразные подземные части). Вид плурирегиональный, распространенный в регионах с умеренным климатом, наносящий серьезный ущерб производству картофеля и хмеля (ЕОКЗР, 2013а). Спектр хозяев данной нематоды широк и охватывает свыше 90 видов растений, в числе которых декоративные растения, сельскохозяйственные культуры и сорняки. Основным хозяином является *Solanum tuberosum* (картофель). На пораженных клубнях развивается мокрая или сухая гниль, распространяющаяся на другие клубни в хранилище. В определенных условиях организмы, вызывающие мокрую гниль, могут глубоко поражать клубни и при этом также убивать нематод. *D. destructor* может сохранить жизнеспособность только в случаях заражения клубня организмами, вызывающими сухую гниль. Rojankovski and Ciurea (1986) обнаружили 55 видов бактерий и грибов, ассоциированных с *D. destructor* в клубнях *S. tuberosum*, с *Fusarium* spp. как наиболее часто встречающимися.

Другими типичными хозяевами являются *Ipomoea batatas* (батат), клубневый ирис (гибриды и сорта, выведенные из *Iris xiphium* и *Iris xiphioides*), *Taraxacum officinale* (одуванчик), *Humulus lupulus* (хмель), *Tulipa* spp. (тюльпан), *Leopoldia comosa* (мышиный гиацинт), *Hyacinthus orientalis* (гиацинт), *Gladiolus* spp. (гладиолус), *Dahlia* spp. (георгин), *Coronilla varia* и *Anthyllis vulneraria* (вика), *Beta vulgaris* (сахарная свекла, кормовая свекла и красная свекла), *Calendula officinalis* (календула), *Daucus carota* (морковь), *Petroselinum crispum* (петрушка) и *Trifolium* spp. (красный, белый и розовый клевер) (Sturhan and Brzeski, 1991). В отсутствие высших растений *D. destructor* легко размножается на мицелии примерно 70 видов грибов и, по имеющимся данным, разрушает гифы культивируемых грибов (Sturhan and Brzeski, 1991). Данный вид может сохранять жизнеспособность при высушивании и при низких температурах, но не образует нематодного войлока, как *D. dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 1936. Однако данный вид зимует в виде яиц, в связи с чем жизнеспособность яиц у *D. destructor* выше, чем у *D. dipsaci*. *D. destructor* в семенах картофеля и цветочных луковицах является регулируемым вредным организмом во многих странах (Sturhan and Brzeski, 1991). Сообщалось о *D. destructor* в *Arachis hypogaea* (арахис) в Южной Африке, однако сейчас считается, что в этих сообщениях речь шла об отдельном виде, *Ditylenchus africanus* Wendt, Swart, Vrain and Webster, 1995, который морфологически и морфометрически близок к *D. destructor*.

По данным ЕОКЗР (2013а), *D. destructor* встречается в следующих регионах (данные о перехвате в импортированных товарах не учитываются): Европа, Азия, Южная Африка, Северная Америка, Южная Америка и Океания.

2. Таксономическая информация

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

Синонимы: синонимы типового вида *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 1936 приводятся в Siddiqi (2000)

Таксономическая позиция: Nematoda, Secernentea, Diplogasteria, Tylenchida, Tylenchina, Tylenchoidea, Anguinidae

Обычные названия: стеблевая нематода, stem and bulb eelworm (английский язык) (Sturhan and Brzeski, 1991)

Примечание: в настоящее время *D. dipsaci* считается комплексом видов, состоящим из значительного числа биологических рас и популяций, различающихся главным образом по предпочитаемым хозяевам. В связи с этим в общей сложности 13 номинальных видов было синонимизировано с *D. dipsaci* и до 30 биологических рас дифференцировано по группам хозяев, с отличием, проведенным главным образом по группе хозяев, и в целом получивших название по основному растению-хозяину.

Название: *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945

Синонимы: нет

Таксономическая позиция: Nematoda, Secernentea, Diplogasteria, Tylenchida, Tylenchina, Tylenchoidea, Anguinidae

Обычные названия: стеблевая нематода картофеля, tuber-rot eelworm (английский язык) (Sturhan and Brzeski, 1991)

De Ley and Blaxter (2003) создали последнюю на сегодняшний день систему классификации, объединив морфологические наблюдения, данные молекулярных исследований и кладистический анализ.

3. Выявление

Следующие признаки, являющиеся общими для *D. dipsaci* и *D. destructor*, позволяют их выявление: утолщение, деформация, изменение цвета и карликовость надземных частей растения и некроз или гниение луковиц и клубней (Thorne, 1945).

Ditylenchus dipsaci

D. dipsaci демонстрирует присущую паразитам адаптивность своей способностью проникать в плотную паренхиматозную ткань после ферментативного разрушения пектинсодержащих срединных пластинок межклеточных стенок, приводящего к разделению и увеличению клеток. Этот процесс приводит к характерному глянцевитому блеску или придает инфицированным тканям мучнистую консистенцию, напоминающую мякоть перезрелого яблока (Southey, 1993).

По данным Vovlas *et al.* (2011), инфицирование *D. gigas* (гигантская стеблевая и луковичная нематода) *V. faba* вызывает утолщение и деформацию стебля или очаговые поражения, которые становятся красновато-бурыми, а затем чернеют. При тяжелых заражениях семена темные, деформированные, меньше размером, чем неинфицированные семена, их поверхность покрыта мелкими пятнышками. Спектр хозяев, помимо *V. faba*, включает *Lamium purpureum*, *Lamium album*, *Lamium amplexicaule*, *Ranunculus arvensis*, *Convolvulus arvensis* и *Avena sterilis*.

Ditylenchus destructor

D. destructor главным образом заражает подземные части растений (клубни и столоны картофеля, корневища мяты и корни хмеля и сирени), вызывая изменение цвета и гниение тканей растения. Иногда заражаются также надземные части, что ведет к карликовости, утолщению и ветвлению стебля и недоразвитости и скручиванию листьев и изменению их цвета (например, у картофеля) (Sturhan and Brzeski, 1991). Однако чаще признаков инфицирования на наземных частях растения не обнаруживается.

3.1 Хозяева и признаки заражения

3.1.1 *Ditylenchus dipsaci*

По данным Sturhan and Brzeski (1991), основными хозяевами *D. dipsaci* являются растения семейств Gramineae (злаки): *Avena sativa* (овес), *Secale cereale* (рожь), *Zea mays* (кукуруза), *Triticum aestivum* (пшеница); Liliaceae (лилейные): *A. cepa*, *A. sativum*, *Tulipa* spp.; Leguminosae (бобовые): *M. sativa*, *Vicia* spp., *Pisum sativum*, *Trifolium* spp.; Solanaceae (пасленовые): *S. tuberosum*, *Nicotiana* spp.; Cruciferae (крестоцветные): *Brassica campestris*; и Amarilidaceae (амариллисовые): *Narcissus* spp. Другие хозяева включают *D. carota*, *Fragaria* spp. (земляника), *B. vulgaris*, *H. orientalis*, *Allium ampeloprasum* (лук-порей), *Phlox drummondii*, *Phlox paniculata*, *Dianthus* spp. (гвоздика), *Apium graveolens* (сельдерей), *Hydrangea* spp., *Lens culinaris* (чечевица), *Brassica napus* (рапс), *Petroselinum crispum* и *Helianthus annuus* (подсолнечник).

В течение одного сезона на растении-хозяине могут быть представлены разные поколения *D. dipsaci*, сменяющие друг друга. Если в результате нанесенных нематодами повреждений пораженные части растения отмирают, нематоды покидают хозяина до того, как он окончательно погибнет. При отсутствии растений-хозяев нематоды могут инфицировать растения, не являющиеся хозяевами, и питаться на них некоторое время, хотя размножаться в растениях, не являющихся для них хозяевами, они не способны (Andrássy and Farkas, 1988). Наиболее распространенными признаками заражения *D. dipsaci* являются низкорослые, с хлоротическими пятнами растения; утолщенные и укороченные, деформированные черешки, цветы и стебли с галлами; некротические поражения лукович и корневищ и гниль, часто проявляющаяся на разрезе лукович в виде бурых колец. *D. dipsaci* может также инфицировать семена, например, семена *Phaseolus vulgaris* (фасоль обыкновенная), *V. faba*, *Allium* spp. и *M. sativa*. Маленькие семена, как правило, не несут видимых признаков инфицирования, но у более крупных семян может быть сморщенная оболочка с обесцвеченными пятнами.

3.1.1.1 Признаки, специфические для Gramineae (злаков)

Avena sativa и *Secale cereale* (McDonald and Nicol, 2005). Листья становятся деформированными, стебли утолщаются, растение выбрасывает ненормальное количество побегов, выглядит низкорослым и кустистым. При возделывании *S. cereale* *D. dipsaci* встречается главным образом на легких, бедных гумусом почвах и, что закономерно, в районах постоянного выращивания ржи. Первые признаки заражения можно заметить поздней осенью, но наиболее очевидны эти признаки весной. Пятна на растениях с замедленным ростом на поле ржи свидетельствуют о повреждении вредителем. Поскольку зараженные растения *A. sativa* растут медленнее, они выделяются на желтеющем поле своим зеленым цветом. У пораженных нематодами *T. aestivum* признаки те же, что у других злаков, и *D. dipsaci* инфицирует их только в Центральной и Восточной Европе (Rivoal and Cook, 1993).

Zea mays – плохой хозяин для *D. dipsaci*, но заражение стеблевых тканей молодых растений вызывает некроз этих тканей и приводит к тому, что растения гибнут или полегают до сбора урожая (Rivoal and Cook, 1993). Листья зараженных растений кукурузы высыхают и скручиваются. Междоузлия укорочены, стебель у основания становится полым, более высокие растения ломаются и полегают.

3.1.1.2 Признаки, специфические для Liliaceae (лилейных)

Allium cepa, *Allium sativum* и *Allium cepa* var. *aggregatum* (шалот). Для большинства *Allium* spp. характерным признаком заражения *D. dipsaci* является деформация листьев и лукович (рис. 2, 3 и 4). Стебли молодых растений у основания образуют вздутия, листья деформируются. У лукович взрослых растений чешуи утолщаются (набухают) и часто лопаются у донца (Potter and Olthof, 1993). В результате лизиса клеток, вызванного питанием нематод, луковичы *A. cepa*, пораженного *D. dipsaci*, выглядят подмороженными (Ferris and Ferris, 1998). Зараженные луковичы в овощехранилище быстро начинают гнить (Bridge and Hunt, 1986). Внутренние чешуи луковичы, как правило, поражаются сильнее, чем внешние. С приближением сезона уборки луковичы становятся мягкими и на поперечном разрезе можно видеть бурые кольца. Что касается *A. sativum*, то *D. dipsaci* не вызывает деформации листьев или вздутия зубков, но вызывает пожелтение листьев и гибель растения (Netscher and Sikora, 1990). Mollov *et al.* (2012) впервые описывают заражение нематодой *D. dipsaci* *A. sativum* в Миннесоте, США. Признаками заражения являются: для надземных частей растения – отставание в росте и хлороз, для лукович – некроз, недоразвитие и деформация. На листьях *Allium* spp. могут появляться характерные т.н. "крапинки" – мелкие узелковидные утолщения. Признаков заражения на инфицированных семенах *Allium* не наблюдается.

Tulipa spp. (Southey, 1993). Признаки заражения *D. dipsaci* тюльпанов, как наземных частей, так и лукович, существенно отличаются от таких признаков у *Narcissus* spp. В полевых условиях заражение лучше всего заметно в период цветения. Первым признаком является бледный либо синеватый пораженный участок на боку стебля непосредственно под цветком, который склоняется по направлению к пораженному участку. Пораженный участок

увеличивается в размерах, эпидермис лопается, обнажая типичную рыхлую ткань, и повреждение распространяется вниз по стеблю и зачастую вверх по лепесткам. В случае более сильного заражения аналогичные повреждения тянутся вниз по стеблю от пазух листьев, листья могут деформироваться. Заражение начинается у основания новых луковиц и после удаления покровных коричневых чешуй выглядит как серые или коричневые мягкие участки на внутренних мясистых чешуях. На зараженных луковицах отсутствуют бурые кольца, в отличие от зараженных луковиц нарциссов и гиацинтов.

3.1.1.3 Признаки, специфические для *Leguminosae* (бобовых)

***Medicago sativa*.** *D. dipsaci* является наиболее значимым нематодным вредителем *M. sativa*. Заражение чаще происходит на тяжелых почвах в периоды сильных дождей или на участках с дождевальным орошением. Побеление стеблей и листьев, связанное с утратой хлорофилла, часто является характерным признаком заражения в условиях водного стресса (Griffin, 1985). На зараженных полях часто можно видеть участки неправильной формы со скудной вегетацией. Типичные признаки поражения нематодами включают прикорневое вздутие стебля, карликовость и скручивание стеблей и листьев, укороченные междоузлия и образование многочисленных пазушных почек, дающих ненормальное количество побегов, от чего растение приобретает кустистый вид (McDonald and Nicol, 2005). Иногда зараженные растения не набирают достаточного для скашивания роста (Ferris and Ferris, 1998) и часто не образуют цветоносов (McDonald and Nicol, 2005). *D. dipsaci* ослабляет защитные свойства люцерны, и она поражается *Phytophthora megasperma*. Вред от *D. dipsaci* усугубляется появлением других, сапрофитных нематод (виды *Rhabditis*, *Cephalobus* и *Panagrolaimus*) на больных, поврежденных растениях, что также ускоряет гибель растений (Andrássy and Farkas 1988). На зараженных семенах *Medicago* никаких признаков заражения не отмечается.

Trifolium spp. (Cook and Yeates, 1993). Признаки схожи с описанными для *M. sativa*, за исключением красного и белого клевера. Заражению нематодами красного клевера благоприятствует прохладная, дождливая погода. На поле заметны большие круглые участки с пораженными растениями; чем ближе к центру такого участка, тем сильнее поражены растения, и в центре зачастую находятся уже увядшие растения. У основания растений напоминающие луковицы вздутия, листья сухие, сморщенные, с заметно утолщенными жилками. Цветочные головки вздуты как галлы; одна такая головка может содержать 5000 нематод (Courtney, 1962). Стебли пораженного *D. dipsaci* белого клевера короткие и вздутые, почки растут пучками, зараженные части летом или осенью буреют. Листья уже, чем обычно, при этом их черешки толще и короче. Бутоны у основания вздуты (Andrássy and Farkas, 1988).

3.1.1.4 Признаки, специфические для *Solanaceae* (пасленовых)

***Solanum tuberosum*.** *D. dipsaci* вызывает конусообразное разрушение ткани, проникающее в клубень на большую глубину, чем поверхностная гниль, вызванная *D. destructor*. Нематоды поражают стебли и листья, что приводит к типичному недоразвитию растения, сопровождающемуся значительной деформацией стеблей и черешков листьев (Evans and Trudgill, 1992).

Nicotiana spp. (Johnson, 1998). Ювенильные нематоды (IV возраст) проникают в листья и стебли всходов табака в дождливую погоду и вызывают маленькие желтые вздутия (галлы), которые могут обнаруживаться на стебле на высоте в 40 см или более над поверхностью почвы. По мере увеличения количества галлов растительная ткань начинает преждевременно отмирать. Нижние листья могут опадать, верхние – желтеть. Со временем галлы начинают гнить, останавливая рост инфицированных растений. В конечном счете, особенно в холодную, сырую погоду и на тяжелых почвах, пораженные стебли ломаются и растения полегают.

3.1.1.5 Признаки, специфические для *Cruciferae* (крестоцветных)

У зрелых растений *B. campestris* заражение *D. dipsaci* может приводить к массивному поражению кочанов гнилью.

3.1.1.6 Признаки, специфические для *Amarilidaceae* (амариллисовых)

Narcissus spp. (Southey, 1993). Типичными признаками является наличие бледно-желтоватых узелковидных вздутий ("крапинок") на листьях и концентрических бурых колец, видимых на поперечном разрезе луковицы (рис. 5 и 6). При продольном разрезе луковиц видно, что некроз начинается у шейки луковицы и распространяется вниз. Вздутия хорошо видны перед цветением, в период активного роста листьев. При умеренном заражении вздутия легче определить на ощупь, пропустив лист между большим и указательным пальцами, чем увидеть. Заражение *D. dipsaci* на сухих луковицах можно определить с минимальным повреждением луковицы, сделав срез сразу под шейкой. Тщательное обследование на ранних стадиях заражения позволяет обнаружить блестящие, губчатые участки, где клетки были разделены вследствие питания нематод. За этой стадией быстро следует побурение и некроз.

3.1.1.7 Признаки, специфические для других хозяев

Fragaria spp. *D. dipsaci* является единственным из видов *Ditylenchus*, который считается патогеном земляники (Brown *et al.*, 1993). У пораженных растений маленькие, деформированные листья и короткие, толстые и скрученные черешки.

Семейство Asparagaceae (спаржевые), подсемейство Scilloideae (пролесковые) (гиацинты) и другие луковичные (Southey, 1993). Признаки поражения луковиц такие же, как у *Narcissus* spp., но на листьях, как правило, отчетливых вздутий не наблюдается. На листьях могут быть бледно-желтые полосы, деформации и часто легкие вздутия. Луковицы других лилейных в большинстве случаев демонстрируют такие же признаки заражения, как луковицы гиацинтов. Признаки заражения у амариллисовых сходны с описанными для *Narcissus* spp.; например, *Galanthus* spp. и *Nerine* spp. демонстрируют вздутия на листьях и концентрические бурые кольца на луковицах в разрезе.

Beta vulgaris и *Daucus carota* (Cooke, 1993). Питаясь, *D. dipsaci* приводит к гибели точки роста всходов (в результате растение формирует множество головок); семядоли и листья могут разбухать, скручиваться и деформироваться; на листьях и черенках листьев более взрослых растений могут образовываться галлы. Позднее нематоды, питаясь головкой корнеплода, могут вызвать гниение верхушки. Сначала верхушечная гниль выглядит как приподнятые над поверхностью сероватые пустулы, обычно среди листовых рубцов. Затем гниль распространяется вверх и вниз и поражает шейку, которая легко отрывается при уборке. У *D. carota* дополнительные признаки могут включать поникание листьев и обесцвечивание верхушки главного (стержневого) корня. Признаки поражения появляются главным образом на корне и стебле растения, захватывая 2–4 см над и под поверхностью почвы. Сильное заражение вызывает гибель листьев и гниль головки корнеплода, особенно осенью (рис. 7).

Phlox paniculata и другие декоративные культуры (Southey, 1993). Зараженные побеги флокса демонстрируют характерные утолщение и хрупкость стеблей и укорачивание междоузлий, которые часто растрескиваются. Характерным и уникальным для этого хозяина признаком является сморщивание и редукция листовых пластинок верхних листьев, при этом самые верхние листья могут редуцироваться до усиков. В число растений, описанных как хозяева, с такими признаками заражения, как деформация побегов, вздутие и пр., входят виды и сорта *Anemone*, *Calceolaria*, *Cheiranthus*, *Gypsophila*, *Helenium*, *Heuchera*, *Lychnis*, *Lysimachia* и *Penstemon* (Roberts, 1981). Edwards (1937) описывает замедление роста, деформацию листьев, гниль и отсутствие цветения у *Primula* spp. Древесные растения редко поражаются, но *D. dipsaci* может заражать *Hydrangea*, что приводит к деформации неодревесневших побегов, образованию вздутий на черенках и главных жилках листьев, а также к выраженному сморщиванию листовых пластин. Первым признаком инфицирования обычно является

сморщивание листьев. Другое древесное растение, *Yucca smaliana*, при инфицировании демонстрирует деформацию листьев и похожие на пузырьки вздутия.

3.1.2 *Ditylenchus destructor*

Согласно Sturhan and Brzeski (1991), *D. destructor* паразитирует главным образом в клубнях (например, картофель и георгины), луковицах (например, луковичные ирисы, тюльпаны и гладиолусы) и корнеплодах (например, сахарная свекла и морковь). Он способен разрушать гифы *Agaricus hortensis* (культивируемые грибы рода шампиньонов). В числе других хозяев *I. batatas*, *A. sativum*, *P. vulgaris*, *Angelica sinensis* (дудник китайский, т.н. "женский женьшень"), *Panax ginseng* (женьшень), *Taraxacum officinale*, *Begonia* spp. и луковицы *Erytronium denscanis* (кандык европейский).

***Solanum tuberosum* и *Dahlia* spp.** В период роста видимых признаков заражения нет. Нематоды проникают в клубни картофеля, как правило, через столоны. Нематод в больших количествах можно найти на границе здоровой и пораженной, бурящей ткани. Если небольшую пробу из такой части клубня поместить в воду, большое количество мелких нематод можно увидеть с помощью простого увеличительного стекла. Первыми признаками заражения *D. destructor* являются небольшие белые или светлоокрашенные пятна, которые можно увидеть сразу под кожей клубня (Brodie, 1998). В дальнейшем пятна становятся больше и постепенно темнеют (становятся сначала серыми, затем темно-коричневыми и черными) и приобретают губчатую структуру (рис. 8). Это результат главным образом вторичного заражения бактериями, грибами и сапрофитными нематодами (Brodie, 1998). При тяжелом поражении на клубнях можно видеть слабо вдавленные участки с потрескавшейся, сморщенной, похожей на пергамент кожей. Кожа не поражена нематодами, но истончается и трескается по мере того, как лежащие под ней зараженные ткани высыхают и съеживаются (Brodie, 1998). В конечном счете весь клубень может мумифицироваться. Такие полностью поврежденные клубни не тонут в воде (рис. 9). Напротив, кожа клубней *S. tuberosum*, зараженных *D. dipsaci*, обычно не растрескивается. Нематоды продолжают размножаться в клубнях после сбора урожая и могут достигать больших количеств. Признаки инфицирования после хранения могут стать более заметными. Зараженные клубни, как правило, легко поражаются грибами, бактериями и свободноживущими нематодами (вторичное заражение).

***Beta vulgaris*.** Заражение ведет к появлению темных, некротизированных участков на корнях и корневищах. Dallimore and Thorne (1951) сообщают о признаках, сходных с верхушечной гнилью. У сахарной свеклы, помимо снижения урожайности, снижается содержание сахара в корнеплодах.

***Daucus carota*.** Заражение ведет к появлению поперечных трещин в коже корнеплода и белых участков в мякоти. Вторичное заражение грибами и бактериями также может вызывать гниль на этих участках. Такие повреждения легко заметить на поперечном разрезе моркови. Во время зимнего хранения нематоды продолжают свою разрушительную деятельность, и морковь становится непригодной к потреблению.

***Iris* spp. и *Tulipa* spp.** (Southey, 1993). Заражение ведет к появлению сероватых, узких и длинных пятен, которые тянутся вверх от основания внешних мясистых чешуй. По мере развития заражения повреждение распространяется на всю луковицу и приводит к вторичной сухой, фиброзной гнили, заканчиваясь коллапсом луковицы. На поперечном разрезе пораженной луковицы видны бурые кольца. Пожелтение и отмирание листьев являются вторичными признаками, вызванными повреждением луковицы и прекращением функционирования корней.

Описано заражение *D. destructor* клубнелуковиц декоративного растения *Liatris spicata* (лиатрис колосистая) в условиях холодного хранилища в Южной Африке, продемонстрировавшее черную гниль с живыми нематодами на разных стадиях развития в ткани, прилегающей к пораженным гнилью участкам (Van der Vegte and Daiber, 1983).

3.2 Извлечение нематод

3.2.1 Извлечение из луковиц и зубков чеснока

Для извлечения нематод пораженные чешуи луковиц (главным образом внутренние чешуи) или зубки чеснока режут на мелкие части и помещают в сосуд (например, чашку Петри) с водопроводной водой комнатной температуры. Чтобы получить прозрачную суспензию, части можно поместить на сетчатый фильтр с диаметром ячеек 200–250 мкм, покрытый фильтровальной бумагой (чашка Остенбринка). Через 1 час или более нематод можно наблюдать под стереомикроскопом (требуется минимум 40-кратное увеличение).

3.2.2 Извлечение из почвы и растительного материала

Вороночный метод Бермана является эталонным методом извлечения нематод из почвы и растительного материала (луковицы, корни, картофельные очистки и семена). Закрепленная в штативе воронка имеет на выходе резиновый шланг, закрытый пружинным или винтовым зажимом. Воронку почти доверху наполняют водопроводной водой. Почву или мелко нарезанный растительный материал помещают на мельничный газ или фильтровальную бумагу, сложенные так, чтобы покрыть материал, и аккуратно погружают в воду в воронке. Активные нематоды проходят через ткань и собираются в трубке воронки. Через несколько часов или утром следующего дня небольшое количество воды, содержащей нематод, сливают и наблюдают под микроскопом (Flegg and Hooper, 1970).

В одной из модификаций данного метода воронку заменяют экстракционной чашкой ("чашка Остенбринка"). Комья земли измельчают, камни и остатки растений удаляют. Почву (50 мл) равномерно распределяют на кружке из однослойного бумажного полотенца и помещают в крупноячеистое пластиковое сито, стоящее в сосуде. В сосуд добавляют воду, пока почва не будет полностью смочена, но не покрыта водой. Сосуд накрывают крышкой от большой чашки Петри, чтобы уменьшить испарение воды, и оставляют минимум на 24 часа, после чего землю удаляют, а суспензию с нематодами выливают из сосуда в чашку Петри для изучения с помощью стереомикроскопа. Вместо почвы можно использовать измельченную растительную ткань (Kleynhans, 1997).

Метод опрыскивания Сейнхорста для извлечения нематод из луковиц и корней отличается от вороночного метода Бермана тем, что при его применении удаляются сок растений и токсичные продукты распада. В случае с такими растениями, как *Narcissus* spp., этот метод следует предпочесть методам Бермана или Остенбринка. Воронку Бермана или чашку Остенбринка помещают в условия мелкокапельного орошения, или тумана, чтобы избежать кислородного обеднения воды. Растительный материал постоянно увлажняют с помощью распылителей, установленных сверху либо снизу таким образом, чтобы капли мягко падали на растительный материал. Живые нематоды покидают растительные ткани и смываются в воронку или чашку, где оседают. Через каждые 24–48 часов нематод собирают в мензурку, открыв зажим воронки либо собрав образцы на сито с ячейками в 20–25 мкм. Выделение нематод может продолжаться до четырех недель. Этот метод описан Хупером (1986).

Еще один метод извлечения *Ditylenchus* spp. из растительного материала был адаптирован на основе описания Оливейры с соавторами (2013). Растительный материал режется на части в 1 см и помещается в стеклянные банки емкостью 500 мл, наполненные водопроводной водой. В крышках банок проделывают два отверстия: одно для трубки аквариумного аэратора, другое – для поступления воздуха. Растительный материал в течение 72 часов держат в условиях постоянной аэрации. Образовавшуюся суспензию процеживают через сито с ячейками в 1000 мкм, чтобы удалить растительные остатки, а затем через сито с ячейками в 38 мкм, чтобы отделить нематод. Аэрирование суспензии предотвращает загнивание растительного материала, поэтому рост бактерий и грибов минимален, и многие нематоды остаются живыми. Аэрационное перемешивание суспензии, содержащей растительный материал, позволяет отделить больше нематод из корневой ткани и, следовательно, гораздо точнее оценить зараженность растительного материала.

Также можно извлекать нематод из растительного материала, используя метод Кулена и Д'Эрде (1972). Растительный материал промывают, режут на кусочки примерно 0,5 см и порциями по 5 г измельчают с добавлением 50 мл водопроводной воды в течение 1 минуты в бытовом блендере при минимальной скорости. Недостатком данного метода является то, что крупные экземпляры нематод, таких как взрослые особи *D. dipsaci*, могут быть разрезаны блендером на куски. Суспензию нематод и фрагментов растительной ткани промывают через набор из двух сит с размером ячеек 750 мкм и 45 мкм. Осадок с сита с размером ячеек 45 мкм собирают и сливают в две центрифужные пробирки объемом 50 мл. В каждую пробирку добавляют около 1 мл каолина, смесь тщательно взбалтывают и затем в течение 5 мин центрифугируют при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают и в пробирки добавляют раствор сахарозы (плотность 1,13 г/см³). Смесь тщательно взбалтывают и центрифугируют в течение 1 мин при 1750 об/мин. Надосадочную жидкость пропускают через сито с размером ячеек 45 мкм, остаток собирают и нематод исследуют.

Анализ сухой чечевицы и других зернобобовых культур на наличие *D. dipsaci* состоит из двух этапов: 1) замачивание на ночь семян в аэрированной воде и 2) извлечение нематод из замоченных семян в условиях мелкокапельного орошения (тумана) в течение трех дней. Наличие нематод в воде для замачивания и воде для мелкокапельного орошения определяется процеживанием водных фракций на каждом из этапов и последующим исследованием под микроскопом. Процесс занимает около семи дней, но может быть сокращен до трех дней исключением этапа 2). Модифицированный метод состоит из замачивания зернобобовых на ночь в аэрируемой воде, последующего процеживания и исследования под микроскопом.

Для извлечения нематод из почвы может использоваться следующий метод (по Клейнхансу, 1997): почву (250 мл) промывают через крупноячеистое сито (размер ячеек 2 мм) над 5-литровым ведром. Полученный объем доводится до 5 л водопроводной водой. Суспензию взбалтывают, дают отстояться в течение 30 секунд и процеживают через сито с размером ячеек 45 мкм. Эту процедуру повторяют с почвой в ведре еще два раза, сокращая время отстаивания до 20 и 10 секунд соответственно. Остаток после процеживания через сито с размером ячеек 45 мкм помещают в центрифужные пробирки емкостью 50 мл. Если раствор в пробирках содержит много песка, в пробирки можно добавить 5 мл каолина (тщательно взболтать), что содействует оседанию нематод. Пробирки центрифугируют при 1750 об/мин в течение 7 минут. Надосадочную жидкость из каждой пробирки сливают и удаляют. Раствор сахара (450 г/л воды) добавляют в пробирки и тщательно взбалтывают полученную смесь, после чего снова центрифугируют при 1750 об/мин в течение трех минут. Надосадочную жидкость процеживают через сито с размером ячеек 45 мкм, осадок с нематодами собирают в мензурку для исследования. Данный метод является базовым, и, в зависимости от навыков лаборанта и типа почвы, до 40% нематод может быть утеряно. Другие методы, которые можно использовать для извлечения нематод из почвы, включают модифицированный Флеггом метод Кобба и метод отмучивания Остенбринка (ЕОЗР, 2013с). Hooper *et al.* (2005) описывают различные методы извлечения нематод, адаптированные с учетом размера, количества и подвижности нематод.

4. Идентификация

Идентификация *Ditylenchus* spp. морфологическими средствами ограничивается взрослыми образцами. Нематоды, предпочтительно и самцы, и самки, изучаются под микроскопом с большим увеличением. Хорошо изготовленные препараты должны позволить уверенную идентификацию взрослых *D. dipsaci* и *D. destructor* только средствами морфологического изучения. Морфологическое изучение незрелых особей *Ditylenchus* в пробе следует использовать только для того, чтобы подтвердить присутствие видов в пробе. Поскольку гнивающий растительный материал часто бывает загрязнен грибоподобными *Ditylenchus* spp., следует внимательно проводить идентификацию образцов как в растительных, так и в почвенных пробах.

4.1 Морфологическая идентификация

Идентификацию *D. dipsaci* и *D. destructor* предпочтительно основывать на морфологических методах. Молекулярные методы, разработанные для идентификации этих видов, можно использовать в тех случаях, когда уровни заражения низки либо когда в пробах присутствуют только ювенильные особи. Молекулярные методы могут применяться для идентификации поврежденных и атипичных взрослых особей, а также нематод всех возрастов, включая ювенильных особей, для которых морфологическое определение вида невозможно.

4.1.1 Подготовка образцов

Временные препараты для быстрой идентификации либо исследования признаков, которые лучше всего различимы у нефиксированных экземпляров, готовятся следующим образом (Kleynhans, 1997):

- живых нематод помещают в небольшое количество воды на предметном стекле;
- предметное стекло быстро нагревают над пламенем спиртовки, часто проверяя движение нематод. Как только нематоды прекращают двигаться, нагревание прекращают;
- Предметное стекло накрывают покровным стеклом и запечатывают по краям лаком для ногтей. Когда лак высохнет, препарат готов для исследования.

Для оптической микроскопии живых нематод извлекают из почвы или растительного материала, умерщвляют нагреванием до 65–70 °С, фиксируют в фиксирующем растворе FAA (35% дистиллированной воды, 10% 40%-ного формалина, 5% ледяной уксусной кислоты, 50% 95%-ного спирта) (Andrássy, 1984), переносят в глицерин (Hooper *et al.*, 2005) и монтируют в безводном глицерине между покровными стеклами, как описано у Seinhorst (1959) и Goodey (1963).

Для идентификации с помощью оптической микроскопии рекомендуется увеличение от 500× до 1 000× (иммерсионный объектив) в сочетании с дифференциальной интерференционной контрастной микроскопией.

4.1.2 Морфологические диагностические признаки

С определительными таблицами для видов *Ditylenchus* можно ознакомиться в: Viscardi and Brzeski (1993) и Brzeski (1998). Ключ для дифференцирования *Ditylenchus* spp. от других нематод родов отрядов Tylenchida (тиленхида) и Aphelenchida (афеленхида) представлен в таблице 1.

Таблица 1. Основные признаки отличия *Ditylenchus* spp. от других нематод родов отрядов Tylenchida и Aphelenchida

1	Проток дорсальной пищеводной железы рядом с основанием стилета; средний бульбус округлый, яйцеобразный или отсутствует	Tylenchida – 2
	Проток дорсальной пищеводной железы в средний бульбус; средний бульбус сильно выражен, обычно продолговатый	Aphelenchida
2	Передняя часть пищевода (прокорпус) и средний бульбус не слиты; стилет никогда не бывает очень длинным	3
	Прокорпус постепенно расширяется и сливается со средним бульбусом; стилет очень длинный, его основание часто находится в верхней части среднего бульбуса	Другие роды
3	Форма тела половозрелой самки червеобразная	4

	Форма тела половозрелой самки мешкообразная или грушевидная, самка прикреплена к корням растения	Другие роды
4	Средний бульбус с клапаном	5
	Средний бульбус без клапана ¹	Другие роды
5	Железы пищевода находятся в базальном бульбусе, не охватывают либо слегка охватывают кишку; головной скелет редко четкий; стилет от слабого до умеренно развитого	6
	Железы пищевода лопастеобразные, охватывают кишку; головной скелет выраженный, сильный; стилет мощный	Другие роды
6	Яичник один, продольный; вульва расположена близко к заднему концу тела	7
	Яичники парные, амфидельфные; вульва слегка постэкваториальная	Другие роды
7	Форма тела половозрелой самки не вздутая; крустаформерия (скорлуповая железа) у самки в форме квадриколюмеллы с 4 рядами по 4 клетки в каждом; бурса самца охватывает одну треть или более хвоста	<i>Ditylenchus</i>
	Форма тела половозрелой самки вздутая; крустаформерия из более чем 20 клеток	Другие роды

Источник: использованы материалы Heyns (1971) и Siddiqi (2000).

¹ У нескольких не являющихся фитопаразитами видов *Ditylenchus* вальвулярный средний бульбус отсутствует.

D. africanus, *D. destructor*, *D. dipsaci*, *D. gigas* и *D. myceliophagus* морфологически и морфометрически сходны, но могут быть дифференцированы с помощью приведенной ниже таблицы 2 при условии, что измерить и исследовать можно и самок, и самцов.

4.1.2.1 Описание *Ditylenchus dipsaci*

По Sturhan and Brzeski (1991), Wendt *et al.* (1995) и Brzeski (1998). Подробности см. на рис. 10.

Размеры (критерии описаны в: ЕОКЗР (2013b)). (выделен из овса, *Avena sativa* L., по Blake, 1962, в: Ноорер, 1972.) ($n = 48 \text{♀}$): $L = 1,3 \text{ мм} \pm 0,009$; $a = 62 \pm 5,6$; $b = 15 \pm 1,4$; $c = 14 \pm 2,1$; $V = 80 \pm 1,5$. ($n = 23 \text{♂}$): $L = 1,3 \text{ мм} \pm 0,017$; $a = 63 \pm 11,3$; $b = 15 \pm 1,7$; $c = 14 \pm 2,1$; $T = 72$.

Общая морфология. Тело прямое или почти прямое в расслабленном состоянии. Боковое поле с 4 линиями (инцизурами). Голова является продолжением тела (рис. 10B). Стилел 10–13 мкм длиной у самок, 10–12 мкм длиной у самцов. Конус стилета составляет примерно половину длины стилета, узлы закругленные и хорошо развитые. Средний бульбус мускулистый, с утолщениями стенок полости 4–5 мкм длиной (рис. 10A). Базальный бульбус несоосный или перекрывает кишечник на несколько мкм. Экскреторная пора напротив задней части истмуса или железистого бульбуса. Поствувальварная часть маточного мешка занимает около половины или немного более половины расстояния вульва–анус (рис. 10D). Бурса у самцов охватывает $\frac{3}{4}$ хвоста. Спиккулы 23–28 мкм длиной. Хвосты у самцов и самок конические, с заостренным кончиком.

Морфологические диагностические признаки. Число боковых инцизур (четыре) (рис. 10F), сравнительно длинный стилет, длина поствувлярного мешка и заостренный хвост (рис. 10D) являются отличительными признаками этого вида (Andrássy, 2007). *D. dipsaci* можно отличить от *D. gigas* по более короткому телу у самок (1,0–1,7 мм vs 1,6–2,2 мм) и большему расстоянию вульва–анус (202–266 мкм vs 132–188 мкм) (Vovlas *et al.*, 2011). В боковой проекции спикулы у *D. dipsaci* более выгнуты, чем у *D. destructor* (рис. 10C). Более подробную информацию о спикулах и их использовании для идентификации *D. dipsaci* и *D. destructor* см. в Karssen and Willemsen (2010). Необходимо отметить, что семена *V. faba* содержат главным образом личинок IV стадии.

4.1.2.2 Описание *Ditylenchus destructor*

По Sturhan and Brzeski (1991) и Brzeski (1998). Подробности см. на рис. 11.

Размеры (по Goodey, 1952, с разных высших растений – хозяев). ($n = 237 \text{♀♀}$): L = 1,07 (0,69–1,89) мм; a = 32 (18–49); b = 7 (4–12); c = 17 (9–30); V = 80 (73–90). ($n = 231 \text{♂♂}$): L = 0,96 (0,76–1,35) мм; a = 35 (24–50); b = 7 (4–11); c = 14 (11–21); T = 65 (40–84).

Общая морфология. Взрослые особи *D. destructor* – крохотные, червеобразные, 0,8–1,4 мм длиной, 23–47 мкм шириной, вентрально слегка дуговидно изогнуты. У взрослых особей морфометрические характеристики существенно варьируют в зависимости от их хозяина и возраста. Самцы и самки по общему виду схожи. Боковое поле с шестью инцизурами (рис. 11F), число которых уменьшается до двух возле головы и на хвосте. Кутикулярные кольца и кольца головы тонкие, голова часто уже, чем прилегающее тело, растровая электронная микроскопия позволяет различить около четырех колец головы (Wendt *et al.*, 1995). Стиллет 10–12 мкм длиной, известны описания экземпляров со стилетами длиной 14 мкм. Конус стилета составляет 45–50% длины стилета, узлы выраженные, округлые и скошены кзади. Средний бульбус мускулистый, с утолщениями стенок полости (или вальвы) около 3 мкм длиной. Передний бульбус слегка находит на кишку с дорсальной стороны, хотя время от времени описываются экземпляры со смещенным железистым бульбусом (рис. 11A). Экскреторная пора расположена напротив желез пищевода. Поствувлярный мешок простирается примерно на $\frac{3}{4}$ расстояния вульва–анус (рис. 11E). Длина яиц в два раза больше ширины (Andrássy, 2007). Губы вульвы толстые, приподнятые (рис. 11B). Передний яичник вытянутый, иногда достигает области пищевода. Поствувлярная часть маточного мешка составляет 40–98% расстояния вульва–анус, не функционирует как сперматека (рис. 11E). Бурса самца охватывает 50–90% длины хвоста. Спикулы 24–27 мкм длиной. У *D. dipsaci* форма спикулы отличается от *D. destructor* наличием вентрального бугорка в области каломуса (рукоятки спикулы) (рис. 12) (Karssen and Willemsen, 2010). Семенник вытянутый, достигает основания пищевода. Хвосты у обоих полов конические, длиной 3–5 ширины тела в области ануса, обычно вентрально изогнуты, кончик хвоста закругленный.

Морфологические диагностические признаки. *D. destructor* схож с *D. dipsaci*, но отличается от этого вида 6 инцизурами на боковом поле (рис. 11F), более длинным поствувлярным мешком и слабо закругленным кончиком хвоста (рис. 11D). Морфологически *D. destructor* отличается от *D. africanus* главным образом длиной стилета, который может несколько выдаваться наружу, и длиной спикулы (что означает, что в анализируемой выборке должны присутствовать самцы). Поскольку метод ПЦР (полимеразная цепная реакция) достаточно чувствителен для выявления различий между близкородственными родами, Wendt *et al.* (1995) использовали анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) для отличия *D. destructor* от *D. africanus*. При наблюдении в боковой проекции заметно, что спикула у *D. dipsaci* менее выгнута, чем у *D. destructor* (рис. 11C).

Замечания. Описанные выше признаки могут варьировать, и практически невозможно идентифицировать единичный экземпляр до уровня вида. Рекомендуется изучение как минимум одного самца и одной самки. Так, например, число боковых инцизур у самца может иногда редуцироваться до четырех у хвоста, образуя узор, характерный для *D. dipsaci*.

Таблица 2. Сравнительные диагностические признаки *Ditylenchus africanus*, *Ditylenchus destructor*, *Ditylenchus dipsaci*, *Ditylenchus gigas* и *Ditylenchus myceliophagus*

Признаки	<i>D. destructor</i> (по Hooper, 1973)	<i>D. africanus</i> (по Wendt et al., 1995)	<i>D. myceliophagus</i> (по Hesling, 1974)	<i>D. gigas</i> (по Vovlas et al., 2011)	<i>D. dipsaci</i> (по Hooper, 1972)
Длина тела самки (мм)	0,8–1,9	0,7–1,1	0,6–1,4	1,6–2,2	1,0–1,7
Число боковых инцизур	6	6–15	6	4	4
Форма кончика хвоста	Закругленный	Закругленный	Закругленный	От заостренного до слабо закругленного	Заостренный
с (длина тела/длина хвоста) самки	14–20	8,8–16,9	8,2–17	15,7–27,6	11–20
Задний бульбус	Короткий, перекрывает кишку с дорсальной стороны	Короткий, перекрывает кишку с дорсальной стороны	Короткий, перекрывает кишку с дорсальной стороны	Слегка перекрывает кишку	Не перекрывает кишку
Длина стилета (мкм) самки	10–14	8–10	7–8	10,5–13,0	10–12
PUS/расстояние вульва–анус (%) ¹	53–90	37–85	30–69	Около 50 ²	40–70
Длина спикеры (мкм)	24–27	17–21	15–20	23,5–28	23–28
Длина бурсы (в % от длины хвоста)	50–70	48–66	20–55	72–76	40–70
Предпочитаемые хозяева ³	Высшие растения и мицелий грибов	Бобы арахиса и грибы	Мицелий грибов	Высшие растения	Высшие растения и грибы

¹ PUS – поствульварная часть маточного мешка.² Рассчитано по описанию видов.³ Полезно в тех случаях, когда морфологические критерии могут ввести в заблуждение.

4.2 Молекулярная идентификация

При необходимости можно провести молекулярную идентификацию вида *D. dipsaci* или *D. destructor*, особенно в тех случаях, когда может встретиться сходный до смешения вид (например, *D. myceliophagus*, *D. africanus* или *D. gigas*), который нельзя убедительно отличить от вида-мишени морфологически.

В этом случае раствор, содержащий нематод, до извлечения ДНК следует хранить при низкой температуре (т.е. в холодильнике) не более нескольких дней.

В настоящем диагностическом протоколе методы (включая ссылки на названия торговых марок) описаны так, как они опубликованы, поскольку по ним определяется первоначально достигнутый уровень чувствительности, специфичности и/или воспроизводимости. Использование названий реагентов, химикатов или оборудования в данных диагностических протоколах не подразумевает их предпочтение и исключение других, которые также могут быть подходящими. Представленные в протоколах лабораторные процедуры могут быть адаптированы к стандартам отдельных лабораторий при условии, что они должным образом прошли процедуру валидации.

4.2.1 *Ditylenchus dipsaci*

Для идентификации *D. dipsaci* разработаны различные методы молекулярной диагностики.

Для анализа концепции рас внутри вида *D. dipsaci* и генетического разнообразия среди видов *Ditylenchus* использовались Саузерн-гибридизация (Wendt *et al.*, 1993) и электрофорез (Tenente and Evans, 1997; Palazova and Baicheva, 2002).

Пригодность молекулярных методов для специфической идентификации была тщательно изучена, главным образом для ПЦР или ПЦР-ПДРФ и для выявления популяционных вариаций методом секвенирования (Leal-Bertioli *et al.*, 2000; Zouhar *et al.*, 2002).

Опубликовано шесть молекулярных анализов (ПЦР, ПЦР-ПДРФ), которые могут использоваться для идентификации *D. dipsaci*; они описываются в разделах 4.2.4–4.2.9. В описаниях указаны специфичность каждого анализа, а также род и виды нематод, на которых он был апробирован.

Молекулярный анализ последовательностей нуклеотидов рДНК, включая различные участки (участок внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS)1-5.8S-ITS2, фрагмент D2–D3 гена *s8S*, малую 18S субъединицу, фрагмент гена первой субъединицы митохондриальной цитохром с-оксидазы (мтДНК) и последовательности гена *hsp90* (яДНК)), позволяет четко различать *D. gigas* от *D. dipsaci* s.s. (Vovlas *et al.*, 2011).

4.2.2 *Ditylenchus destructor*

Молекулярный диагноз *D. destructor* основывается на ПЦР-ПДРФ или секвенировании ITS-участка гена рРНК.

Wendt *et al.* (1993) показали, что ПЦР-ПДРФ ITS-региона позволяет отличить паразита картофеля *D. destructor* от рас *D. dipsaci* и от *D. myceliophagus*, и опубликовали диагностические ПДРФ-профили для этих трех видов. *D. africanus* можно отличить от *D. destructor* по сочетанию следующих признаков: ПДРФ, генерированная семью рестриктазами на ITS-участке рДНК.

Ji *et al.* (2006) получили ПДРФ-профили для нескольких популяций *D. destructor* из батата и выявили ряд отличий в их ПДРФ-профилях.

Powers *et al.* (2001) первыми секвенировали участок ITS1 для *D. dipsaci*; в настоящее время в базе данных GenBank находится более 50 последовательностей фрагментов рРНК, полученных от *D. destructor* из различных местностей и от различных растений-хозяев.

4.2.3 Выделение ДНК

Несколько ювенильных или взрослых особей помещают в микропробирку и выделяют из них ДНК. Выделение ДНК описано Webster *et al.* (1990).

4.2.4 Анализ ПЦР-ПДРФ для идентификации *D. dipsaci* и *D. destructor*, основанный на рРНК ITS-области

Данный тест был разработан Wendt *et al.* (1993).

Методика

В данном анализе использовались следующие универсальные праймеры ITS рРНК (амплификацию проводили согласно описанию Vrain *et al.* (1992)):

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

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

Размеры ампликонов составляют 900 пар нуклеотидов (п.н.) для *D. dipsaci* и *D. myceliophagus* и 1200 п.н. для *D. destructor*.

Амплификация достигается в соответствии с рекомендациями производителя для наборов для проведения ПЦР, содержащих *Taq* ДНК-полимеразу, нуклеотиды и буферный раствор.

Параметры циклов ПЦР¹: начальный цикл при 96 °С в течение 1,5 мин, 30 с при 50 °С и 4 мин при 72 °С; 40 циклов по 45 с при 96 °С, 30 с при 50 °С и 4 мин при 72 °С; и последний цикл – 45 с при 96 °С, 30 с при 50 °С и 10 мин при 72 °С. После амплификации ДНК 2–5 мкл продукта запускают на 1% агарозном геле. Оставшийся продукт хранится при температуре –20 °С и используется для ПДРФ-анализа. Для того, чтобы отличить *D. destructor* и *D. dipsaci* от других видов *Ditylenchus* могут использоваться несколько рестрикционных ферментов, например, *Hae*III, *Hpa*II, *Hinf*I и *Rsa*I (Wendt *et al.*, 1993). Длины рестрикционных фрагментов, полученных с использованием указанных диагностических ферментов, приводятся в таблице 3.

Таблица 3. Приблизительная длина (п.н.) фрагментов рестрикции ITS-рРНК для видов *Ditylenchus*, полученных 4 рестриктазами

Фермент	<i>D. destructor</i>	<i>D. myceliophagus</i>	<i>D. dipsaci</i>	<i>D. gigas</i> ¹	<i>D. africanus</i>
Нерестриктированный продукт ПЦР	1 200	900	900	900	1 000
<i>Hae</i> III	450, 170	450, 200	900	800, 200	650, 540
<i>Hpa</i> II	1 000	900	320, 200, 180	600, 200	950
<i>Hinf</i> I	780, 180	630, 310	440, 350, 150	350, 150	450, 340, 150, 130, 100
<i>Rsa</i> I	600, 250, 170	900	450, 250, 140	490, 450	690, 450

Источник: Wendt *et al.* (1993, 1995).

п.н. – пара нуклеотидов; ITS – внутренний транскрибируемый спейсер; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов; рРНК – рибосомальная РНК.

¹ В оригинальной статье назван гигантской расой *D. dipsaci*.

4.2.5 ПЦР с использованием SCAR-праймеров для идентификации *D. dipsaci*

Данная ПЦР амплифицированного региона с известной последовательностью (SCAR) была разработана Esquibet *et al.* (2003) как видоспецифичный тест для идентификации *D. dipsaci* с дифференциацией между нормальной и гигантской расами. Метод оценивался в сравнении с

¹ Параметры данной ПЦР описаны в оригинальной статье (Wendt *et al.*, 1993). Усовершенствования амплификаторов и реагентов для ПЦР могут потребовать пересмотра этих параметров.

D. myceliophagus (одна популяция), нормальной расой *D. dipsaci* (11 популяций от различных хозяев и различных местностей) и гигантской расой *D. dipsaci*, описанной как *D. gigas* у Vovlas *et al.* (2011) (11 популяций из различных местностей, выделенных из *V. faba*).

Методика

Использовались следующие *D. dipsaci*-специфичные праймеры:

D. dipsaci (нормальная раса):

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

H06: 5'-CAACTG CTA ATG CGT GCT CT-3'

D. dipsaci (гигантская раса, описанная Vovlas *et al.* (2011) как *D. gigas*):

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

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

Длина ампликона составляет приблизительно 242 п.н. для *D. dipsaci* (нормальная раса) и 198 п.н. для *D. dipsaci* (гигантская раса). С обоими наборами праймеров амплификация для видов, не являющихся мишенью, и расы, не являющейся мишенью, не наблюдалась (Esquibet *et al.*, 2003).

ПЦР-смесь (10 мкл) состоит из: 1,5 mM MgCl₂, по 250 мкМ каждого dNTP, по 690 nM каждого праймера для дуплексной ПЦР (H05-H06) или (D09-D10) либо по 500 каждого праймера для мультиплексной ПЦР (H05-H06-D09-D10) и 0,5 ед. Taq ДНК-полимеразы. Параметры ПЦР: предварительная денатурация 3 мин при 94 °C; 30 циклов по 1 мин при 94 °C, 1 мин при 59 °C и 1 мин при 72 °C; финальная элонгация 10 мин при 72 °C. Продукты ПЦР анализируют методом электрофореза в агарозном геле.

4.2.6 18S и ITS1-специфичный ПЦР-анализ для идентификации *D. dipsaci*

Данный анализ разработан Subbotin *et al.* (2005) как видоспецифичный для идентификации *D. dipsaci* s.s. (только нормальная раса). Метод апробировался с *D. destructor* (одна популяция), нормальной расой *D. dipsaci* (18 популяций от различных хозяев и из различных мест) и *Ditylenchus* sp. (12 популяций от различных хозяев и из различных мест).

Методика

Использовались следующие *D. dipsaci*-специфичные праймеры:

rDNA2: 5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3' (Vrain *et al.*, 1992)

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

Длина ампликона составляет приблизительно 263 п.н. для *D. dipsaci* s.s. (гигантская раса, позднее названная *D. gigas*, не была включена в анализ). Амплификация для видов, не являющихся мишенью, не наблюдалась.

ПЦР-смесь (25 мкл) состоит из: 1× из 10× ПЦР буфера, включая 15 mM MgCl₂, по 0,2 mM каждого dNTP, по 60 nM каждого праймера и 1 ед. Taq ДНК-полимеразы. ПЦР проводят в 96-луночном амплификаторе типа Peltier (PTC100, MJ Research²) со следующими параметрами: начально 4 мин при 94 °C; 35 циклов по 15 с при 94 °C, 30 с при 57 °C и 30 с при 72 °C; финальная элонгация 10 мин при 72 °C. Продукты ПЦР анализируют методом электрофореза в агарозном геле.

² В данном диагностическом протоколе методы (в том числе ссылки на названия торговых марок) описаны так, как они опубликованы, поскольку по ним определяется первоначальный уровень чувствительности, специфичности и/или достигнутой воспроизводимости. Представленные в протоколах лабораторные процедуры могут быть адаптированы к стандартам отдельных лабораторий при условии, что они должным образом прошли процедуру валидации.

4.2.7 5.8S рДНК-специфичный ПЦР-анализ для идентификации *D. dipsaci*

Данный анализ разработан Marek *et al.* (2005) как видоспецифичный анализ для идентификации *D. dipsaci*. Анализ апробировался с *D. dipsaci* (три европейские популяции от разных хозяев) и популяциями не являющегося мишенью рода (*Globodera pallida*, *Bursaphelenchus xylophilus*, *Rhabditis* spp.).

Методика

Для идентификации *D. dipsaci* были разработаны два набора праймеров; самая высокая чувствительность (детектируется 10 пг ДНК-мишени) у следующего:

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

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

Длина ампликона с этим набором праймеров составляет примерно 327 п.н. для *D. dipsaci*.

ПЦР-смесь (25 мкл) состоит из: 1× Taq буфера, 1,5 mM MgCl₂, по 200 мкМ каждого dNTP, по 10 pmol каждого праймера (набор праймеров PF1-PR1) и 1,5 ед. Taq ДНК-полимеразы (Fermentas²). ПЦР проводят в 96-луночном амплификаторе типа Peltier (PTC200, MJ Research²) со следующими параметрами: 3 мин при 94 °C; 30 циклов по 2 мин при 94 °C, 30 с при 62 °C и 2 мин при 72 °C; заключительная элонгация 10 мин при 72 °C. Продукты ПЦР анализируют методом электрофореза в агарозном геле.

4.2.8 5.8S рДНК и ITS-специфичный ПЦР-анализ для идентификации *D. dipsaci*

Данный анализ разработан Kerkoud *et al.* (2007) как видоспецифичный анализ для идентификации *D. dipsaci* и апробировался с *D. dipsaci* (10 популяций от различных хозяев и из различных мест), *D. africanus*, *D. destructor*, *D. myceliophagus*, *Aphelenchoides ritzemabosi* (по одной популяции каждого вида) и *Ditylenchus* sp. (согласно статье и в настоящее время описываемого как *D. gigas*) (10 популяций из различных мест, выделенных из *V. faba*).

Методика

Используются два специфичных набора праймеров: один – для идентификации *D. dipsaci*, другой – для идентификации *D. gigas* и *D. dipsaci*. Использование обоих наборов позволяет дифференцировать *D. gigas* и *D. dipsaci*.

Первый набор праймеров:

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

rDNA2: 5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3' (Vrain *et al.*, 1992)

Длина ампликона составляет приблизительно 517 п.н. для *D. dipsaci*. Амплификация для видов, не являющихся мишенями, включая *D. gigas*, не наблюдается.

Второй набор праймеров:

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

rDNA2: 5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3' (Vrain *et al.*, 1992)

Длина ампликона составляет приблизительно 707 п.н. для *D. dipsaci* и *D. gigas*.

ПЦР-смесь (20 мкл) состоит из: 1,5 mM амплификационного буфера с итоговой концентрацией MgCl₂ в 5 mM, по 200 мкМ каждого dNTP, по 0,5 мкМ каждого праймера (в симплексной ПЦР с DdpS1-rDNA2 или DdpS2-rDNA2; в дуплексной ПЦР итоговая концентрация праймера DdpS1 0,5 мкМ и 1 мкМ для DdpS2 и rDNA2) и 1 ед. Taq ДНК-полимеразы (MP Biomedicals²). ПЦР проводят в 96-луночном амплификаторе типа Peltier (GeneAmp 9600 PCR System, Perkin Elmer²), со следующими параметрами: 1 мин при 94 °C; 40 циклов по 30 с при 94 °C, 30 с при

60 °C и 45 с при 72 °C; заключительная элонгация 10 мин при 72 °C. Продукты ПЦР анализируют методом электрофореза в агарозном геле.

4.2.9 ПЦР с использованием SCAR-праймеров для *D. dipsaci*

Данный SCAR ПЦР анализ разработан Zouhar *et al.* (2007) как видоспецифичный анализ для *D. dipsaci* и апробировался только с *D. dipsaci* (10 европейских популяций от разных хозяйев).

Методика

Для идентификации *D. dipsaci* были разработаны два набора праймеров:

Первый набор праймеров:

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

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

Длина ампликона с этим набором праймеров составляет для *D. dipsaci* приблизительно 325 п.н.

Второй набор праймеров:

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

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

Длина ампликона с этим набором праймеров составляет для *D. dipsaci* приблизительно 245 п.н.

ПЦР-смесь (25 мкл) состоит из: 1× ПЦР-буфера (Fermentas²), 1,5 mM MgCl₂, по 200 мкМ каждого dNTP, по 10 pmol каждого праймера (набор DIT_2 или DIT_5), 1,5 ед. Taq ДНК-полимеразы (Fermentas²) и 50 нг ДНК-матрицы. ПЦР проводят в 96-луночном амплификаторе типа Peltier (PTC200, MJ Research²), со следующими параметрами: 3 мин при 94 °C; 30 циклов по 1 мин при 94 °C, 30 с при 60 °C и 1 мин при 72 °C; заключительная элонгация 10 мин при 72 °C. Продукты ПЦР анализируют методом электрофореза в агарозном геле.

4.2.10 Контроли молекулярных анализов

Чтобы результат анализа считался надежным, каждая серия выделения нуклеиновых кислот и амплификации нуклеиновой кислоты вредного организма-мишени или нуклеиновой кислоты-мишени должна сопровождаться постановкой надлежащих контролей, выбор которых зависит от типа использованного анализа и требуемого уровня достоверности. Положительный контроль нуклеиновой кислоты, отрицательный контроль амплификации и отрицательный контроль выделения являются тем минимумом, который следует использовать.

Положительный контроль нуклеиновой кислоты. Данный контроль используется для отслеживания эффективности амплификации (наряду с выделением). Может использоваться предварительно подготовленная (сохраненная) нуклеиновая кислота нематоды-мишени.

Отрицательный контроль амплификации (контроль без матрицы). Данный контроль необходим для традиционной ПЦР, чтобы исключить ложные положительные результаты, обусловленные загрязнением во время приготовления реакционной смеси. Используемая при подготовке реакционной смеси вода для ПЦР добавляется на этапе амплификации.

Отрицательный контроль выделения. Данный контроль ставится для отслеживания загрязнения в процессе выделения нуклеиновой кислоты. Контроль включает выделение нуклеиновой кислоты и последующую амплификацию только экстракционного буфера. Рекомендуется ставить несколько контролей в тех случаях, когда ожидаются большие количества положительных образцов.

4.2.11 Интерпретация результатов традиционной ПЦР

Патоген-специфическая ПЦР будет считаться действительной только при соблюдении следующих двух критериев:

- положительный контроль выделения нуклеиновой кислоты производит ампликон правильного размера для вида нематоды-мишени
- в отрицательном контроле качества выделения и отрицательном контроле амплификации не производится ампликонов правильного размера для вида нематоды-мишени.

5. Данные

Данные и результаты исследований должны храниться, как описано в МСФМ 27 (*Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов*).

В тех случаях, когда результаты диагностики могут отразиться на других договаривающихся сторонах, данные и свидетельства (в особенности зафиксированные или смонтированные на предметных стеклах образцы, фотографии отличительных таксономических признаков, экстракты ДНК и фотографии гель-электрофореза, при необходимости) должны храниться как минимум один год.

6. Контактные адреса для получения дополнительной информации

Дополнительную информацию по данному протоколу можно получить в:

Biosystematics Division, ARC-PPRI, Private Bag X134, Queenswood, 0121 Republic of South Africa (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, Canada (Harvinder Bennypaul; e-mail: bennypaulhs@inspection.gc.ca).

Запрос на пересмотр диагностического протокола может быть направлен национальными организациями по карантину и защите растений (НОКЗР), региональными организациями по карантину и защите растений (РОКЗР) или вспомогательными органами Комиссии по фитосанитарным мерам (КФМ) через Секретариат МККЗР (ippc@fao.org), который, в свою очередь, направит его в Техническую группу экспертов по диагностическим протоколам (ТГЭДП).

7. Благодарности

Проект настоящего протокола подготовили Антуанетта Сварт (Nematology Unit, Biosystematics Division, ARC-PPRI, Republic of South Africa), Элисео Хорхе Чавес (INTA-Estación Experimental de Balcarce, Laboratorio de Nematología, Argentina) и Рената С.В. Тененте (EMBRAPA, Recursos Genéticos e Biotecnología, Brazil).

Описание молекулярных методов сделано Сепреем Субботиным (Plant Pest Diagnostic Center, California Department of Food and Agriculture, 3294 Meadowview Road, Sacramento, CA 95832-1448, United States).

Следующие нематологи улучшили протокол, внося комментарии и замечания:

- Харвиндер Беннипол (Canadian Food Inspection Agency, Canada)
- Йоханнес Халлман (Julius Kühn-Institut, Germany)
- Михаил Приданников (Центр паразитологии, Институт проблем экологии и эволюции им. А.И. Северцова, Россия)

- П. Кастильо (Instituto Agricultura Sostenible, Consejo Superior de Investigaciones Cientificas, Spain).

8. Справочные материалы

- Andrássy, I.** 1984. Klasse Nematoda (Ordnungen Monhysterida, Desmoscolecida, Araeolaimida, Chromadorida, Rhabditida). In *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. In *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. In W.R. Nickle, ed. *Plant and insect nematodes*, pp. 213–242. New York, Marcel Dekker Inc. 925 pp.
- Bridge, J. & Hunt, D.** 1986. Nematodes. In *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. In 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. In 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. In 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. In 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. Available at <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). Available at 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. In 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. In 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. In 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. In 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. In 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. In 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. & Obrepałska-Stęplowska, A.** 2013. A comparative and phylogenetic study of the *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 (in Chinese).
- Johnson, C.S.** 1998. Tobacco. In 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. In 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. In 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. In 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. In 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. In 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* (Khun, 1857) Filipjev, 1936. *Nematologia Brasileira*, 27: 223–225.
- Southey, J.F.** 1993. Nematodes of ornamental and bulb crops. In 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. In 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 bioraces of *Ditylenchus dipsaci* from the Czech Republic. *Plant Protection Science*, 38 (Special 2): 358–360.

9. Рисунки



Рисунок 1. Семя *Vicia faba*, зараженное *Ditylenchus dipsaci* (показан нематодный войлок). Фотография любезно предоставлена G. Caubel, Nemapix (1999).



Рисунок 2. *Allium sativum*, зараженный *Ditylenchus dipsaci*. Фотография любезно предоставлена G. Caubel, Nemapix (1999).



Рисунок 3. Молодые растения *Allium cepa*, зараженные *Ditylenchus dipsaci*. Фотография любезно предоставлена E. Hennig, State Plant Health and Seed Inspection Service, Torun, Poland.



Рисунок 4. Луковица чеснока, зараженная *Ditylenchus dipsaci*.
Фотография любезно предоставлена G. Caubel, Nemapix (2002).



Рисунок 5. *Narcissus* spp., зараженные *Ditylenchus dipsaci*.
Фотография любезно предоставлена G. Caubel, Nemapix (1999).



Рисунок 6. Поперечный разрез луковицы *Narcissus* sp., пораженной *Ditylenchus dipsaci*. Фотография любезно предоставлена С.W. Laughlin, Nemapix (2002).



Рисунок 7. Поперечный разрез клубня сахарной свеклы, зараженной *Ditylenchus dipsaci*. Фотография любезно предоставлена С. Hogger, Nemapix (1999).



Рисунок 8. Поперечный разрез клубня картофеля, зараженного *Ditylenchus destructor*, рядом со здоровым клубнем.

Фотография любезно предоставлена S. Ayoub, Netarix (2000).

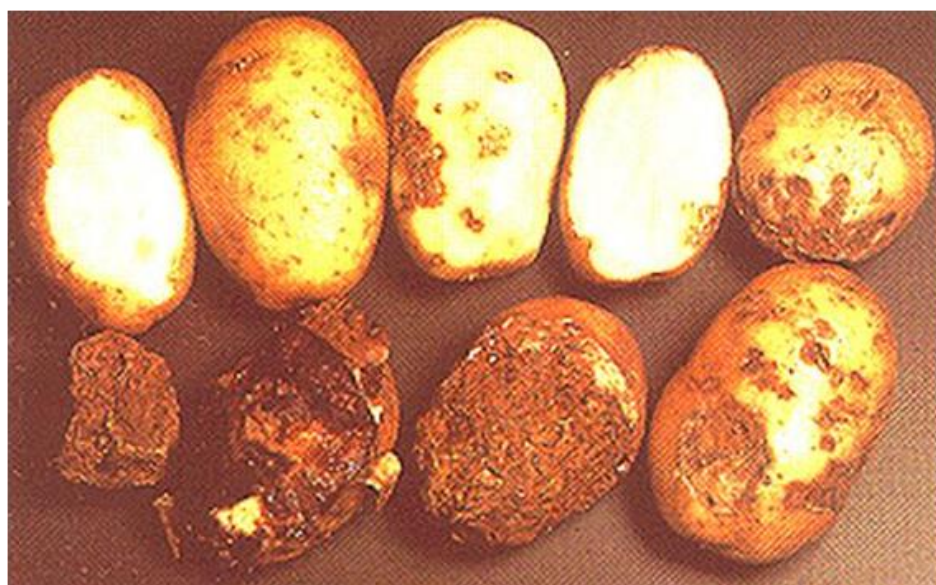


Рисунок 9. Клубни картофеля различной степени зараженности *Ditylenchus destructor*.

Фотография любезно предоставлена H. Andersen.

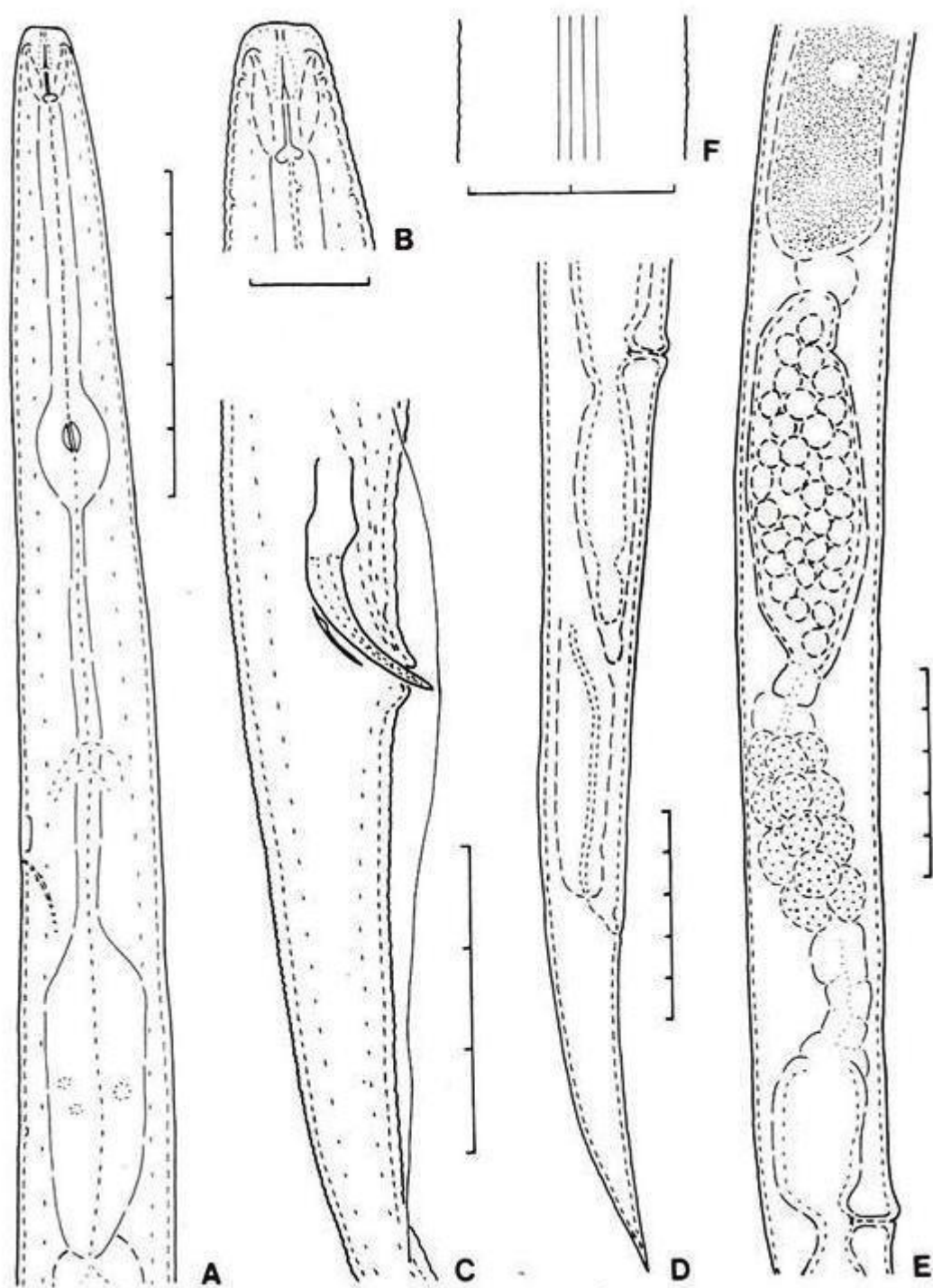


Рисунок 10. *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 1936 (по Sturhan and Brzeski, 1991). (A) самка, область пищевода; (B) голова самки; (C) самец, область спикул; (D) самка, задний отдел тела; (E) часть репродуктивной системы самки; (F) боковое поле в среднем отделе тела. Деление масштабной линейки = 10 мкм.

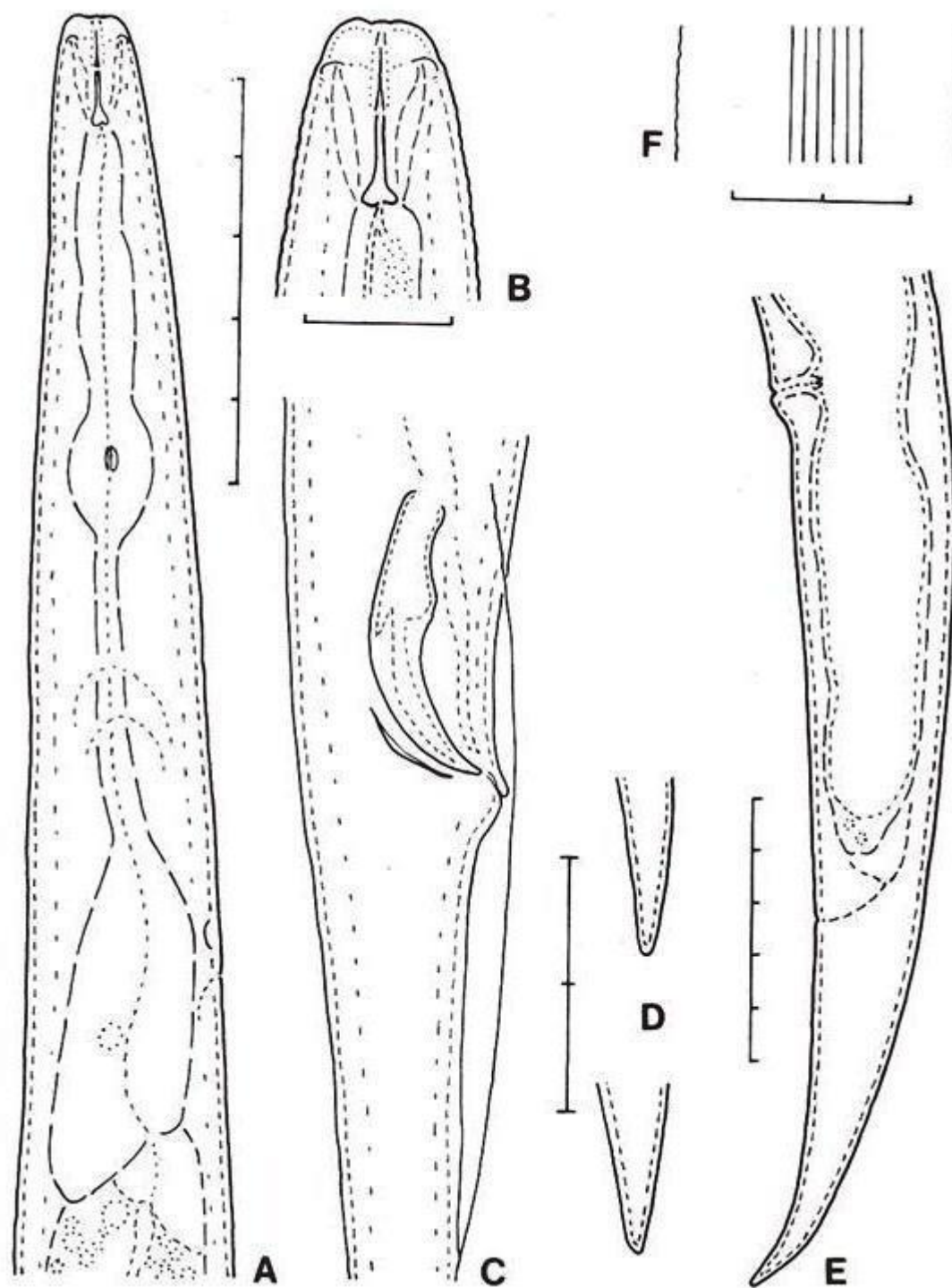


Рисунок 11. *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945 (по Sturhan and Brzeski, 1991). (A) самка, область пищевода; (B) голова самки; (C) самец, область спикул; (D) хвостовые концы тела двух самок; (E) самка, задний отдел тела; (F) боковое поле в среднем отделе тела. Деление масштабной линейки = 10 мкм.

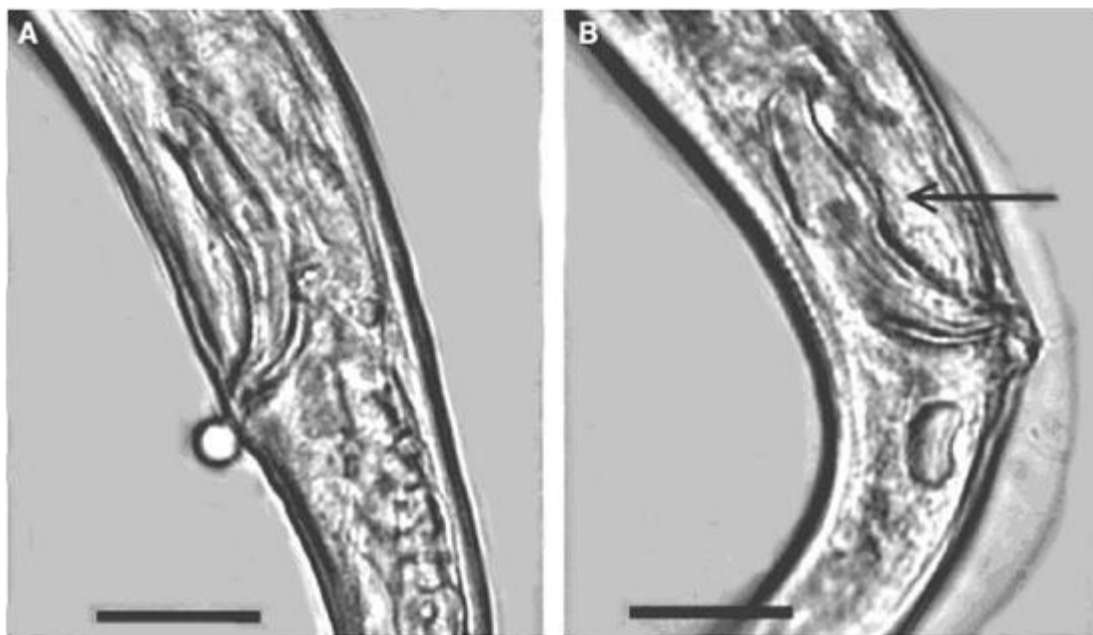


Рисунок 12. Спикула *Ditylenchus spiculum*: (A) *D. dipsaci* и (B) *D. destructor*. Стрелка указывает на бугорок (tumulus). Масштабные линейки = 12 мкм.
 Фотография любезно предоставлена Karssen and Willemsen (2010).

История публикации

Не является официальной частью стандарта

2006-04 КФМ-1 (2006) добавила в программу работы тему (Нематоды, 2006-008)

2004-11 КС добавил тему: *Ditylenchus destructor* / *D. dipsaci* (2004-017)

2010-07 Проект представлен ТГЭДП (заседание)

2013-04 Консультация с экспертами

2013-06 Проект представлен ТГЭДП (заседание)

2014-05 КС одобрил текст для проведения консультаций с членами (2014_eSC_May_11)

2014-07 Консультация с членами

2015-04 ТГЭДП одобрила проект для передачи КС (2015_eTPDP_Apr_03)

2015-06 КС утвердил проект для периода направления нотификаций (2015_eSC_Nov_02)

2015-08 КС утвердил ДП от лица КФМ (формальных возражений не высказывалось)

МСФМ 27. Приложение 8. *Ditylenchus dipsaci* и *Ditylenchus destructor* (2015). Рим, МККЗР, ФАО.

История публикации последний раз обновлена: 2015-09