

Received: 19.05.2017 / Accepted: 13.09.2017

The use of real-time polymerase chain reaction with high resolution melting (real-time PCR-HRM) analysis for the detection and identification of pathogenetic and nonpathogenetic populations of the quarantine nematode *Bursaphelenchus xylophilus*

Wykorzystanie techniki real-time PCR-HRM do wykrywania i odróżniania patogenicznych i niepatogenicznych populacji kwarantannowego gatunku nicienia *Bursaphelenchus xylophilus*

Anna Filipiak*

Summary

The quarantine nematode *Bursaphelenchus xylophilus* (pine wood nematode, PWN) is the causal agent of pine wilt disease in Asia and Europe. Great variation has been reported in the virulence level among populations of *B. xylophilus*. It is difficult to distinguish nematodes differing in virulence based on their morphology, therefore molecular biological techniques have been developed to identify virulence of various *B. xylophilus* populations. The real-time PCR-HRM was developed and evaluated as a method to detect and distinguish virulent and avirulent populations of *B. xylophilus*. A set of primers was designed to target the ITS-2 region of rDNA. Reliability of the newly developed primer pair was examined and positively verified on eight virulent and two avirulent isolates of *B. xylophilus* originating from geographically distant localities in Europe and Asia. The results showed two distinct melting curve profiles related to each of the examined virulent forms. The results have demonstrated that the real-time PCR-HRM analysis is a rapid, simple and accurate method to detect and distinguish virulent and avirulent populations of *B. xylophilus*.

Key words: *Bursaphelenchus xylophilus*; nematode virulence; real-time PCR-HRM; pine wilt disease; quarantine nematode; detection

Streszczenie

Bursaphelenchus xylophilus jest czynnikiem sprawczym choroby wędnięcia sosny, doprowadzającym do zamierania drzew sosnowych na kontynencie azjatyckim, a od 1999 roku również w Europie. Dotychczasowe badania prowadzone nad patogenicznością nicienia *B. xylophilus* wykazały, że nie wszystkie izolaty tego szkodnika doprowadzają do zamierania drzew. W obrębie jego populacji stwierdzono występowanie patogenicznych, jak i całkowicie niepatogenicznych jego izolatów. Morfologiczne odróżnienie poszczególnych populacji charakteryzujących się różną patogenicznością jest całkowicie niemożliwe, dlatego poszukiwane są metody molekularne umożliwiające jak najbardziej precyzyjne ich odróżnienie. W przeprowadzonych badaniach do odróżniania patogenicznych i niepatogenicznych populacji tego kwarantannowego nicienia wykorzystano reakcję real-time PCR-HRM. W badaniach wykorzystano całkowite DNA patogenicznych oraz niepatogenicznych populacji *B. xylophilus* pochodzących z różnych rejonów świata. Dla populacji tych zaprojektowano własne startery, które amplifikowały fragment regionu ITS-2 rDNA. Przeprowadzone doświadczenia potwierdziły wysoką skuteczność zaprojektowanych starterów do odróżniania patogenicznych i niepatogenicznych populacji kwarantannowego nicienia *B. xylophilus*.

Słowa kluczowe: *Bursaphelenchus xylophilus*; wirulencja; real-time PCR-HRM; choroba wędnięcia sosny; nicienie kwarantannowe; wykrywanie

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Biologicznych Metod
Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań
*corresponding author: A.Filipiak@iorpib.poznan.pl

Wstęp / Introduction

Bursaphelenchus xylophilus jest czynnikiem sprawczym choroby wędnięcia sosny, doprowadzającym do zamierania drzew sosnowych na kontynencie azjatyckim, a od 1999 roku również w Europie (Portugalia i Hiszpania) (Mota i wsp. 1999; Robertson i wsp. 2011). Dotychczasowe badania prowadzone nad patogennością nicienia *B. xylophilus* wykazały, że nie wszystkie izolaty tego szkodnika doprowadzają do zamierania drzew. W obrębie jego populacji stwierdzono występowanie patogenicznych, jak i całkowicie niepatogenicznych jego izolatów, które nie powodują obumierania drzew (Kiyohara i Bolla 1990; Wang i wsp. 2005; Aikawa i Kikuchi 2007). W obrębie populacji *B. xylophilus* stwierdzono także takie, które charakteryzują się występowaniem samic z wyrostkiem na końcu ogona, tzw. mukronem. Typowe samice kwarantannowego nicienia *B. xylophilus* posiadają zaokrąglony ogon. Badania nad patogennością populacji zawierających taki wyrostek wykazały, że charakteryzują się one różną wirulencją w stosunku do roślin, tzn. w ich obrębie można wyróżnić zarówno izolaty, które powodują zamieranie roślin, jak również takie, które nie powodują ich obumierania (Braasch i wsp. 2001; Penas i wsp. 2004; Fonseca i wsp. 2008; Gu i wsp. 2011).

Morfologiczne odróżnienie poszczególnych populacji charakteryzujących się różną patogennością jest całkowicie niemożliwe, gdyż zarówno osobniki młodociane, jak i dorosłe (tj. samce i samice) wyglądają identycznie. W związku z zaistniałymi trudnościami, poszukiwane są metody molekularne umożliwiające jak najbardziej precyzyjne odróżnienie poszczególnych populacji od siebie. Dotychczas nie opracowano żadnej molekularnej metody umożliwiającej odróżnienie populacji patogenicznych od niepatogenicznych tego kwarantannowego nicienia.

W przeprowadzonych badaniach do odróżniania patogenicznych i niepatogenicznych populacji tego kwarantannowego nicienia wykorzystano reakcję real-time PCR-HRM (Polymerase Chain Reaction-High Resolution Melting). W technice tej, podobnie jak w przypadku real-time PCR, wykorzystuje się analizę topnienia produktu

PCR. Dzięki zastosowaniu barwników fluorescencyjnych możliwe jest wykrycie pojedynczych różnic nukleotydowych w porównywanych produktach PCR, przez co uzyskuje się więcej informacji na temat produktu PCR, niż było to możliwe przy zastosowaniu innych technik. Ponadto, metoda ta nie wymaga dodatkowego trawienia enzymami restrykcyjnymi (jak PCR-RFLP – Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism – reakcja łańcuchowej polimerazy z analizą polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych) i rozdziału elektroforetycznego, co znacznie przyspiesza uzyskanie wyników (Wittwer i wsp. 2003; Pasay i wsp. 2008).

Technika real-time PCR-HRM wielokrotnie wykorzystywana była do identyfikacji innych gatunków organizmów, w tym także nicieni (Senapin i wsp. 2010; Panichareon i wsp. 2011; Holterman i wsp. 2012; Demeler i wsp. 2013). Ponadto, w ostatnim czasie technikę tę z powodzeniem zastosowano do identyfikacji i odróżnienia *B. xylophilus* od najbliższej spokrewnionego z nim morfologicznie gatunku nicienia *B. mucronatus* (Filipiak i Hasiów-Jaroszewska 2016).

Materiały i metody / Materials and methods

W przeprowadzonych badaniach wykorzystano osiem patogenicznych oraz dwie niepatogeniczne (obecnie, jedyne udostępnione do badań) populacje *B. xylophilus* pochodzące z różnych rejonów świata (tab. 1).

DNA nicieni izolowano z pojedynczych osobników (tj. osobno z samic, samców i osobników larwalnych) przy zastosowaniu zestawu QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN) zgodnie z zaleceniami producenta. Dla DNA badanych populacji zaprojektowano własne startery, które amplifikowały fragment regionu internal transcribed spacer (ITS)-2 rDNA (forward: 5'-CAGAAACGCCGACTTGTTTT-3' oraz reverse 5'-ATATTGGTCGCGGAACAAAC-3') (rys. 1). Startery zaprojektowano przy pomocy programu komputerowego Primer3web version 4.0.0 - Pick primers from a DNA sequence (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) (Koressaar i Remm 2007; Untergasser i wsp. 2012).

Tabela 1. Pochodzenie populacji *Bursaphelenchus xylophilus* wykorzystanych w badaniach oraz numery akcesyjne ich sekwencji zdeponowanych w GenBanku

Table 1. Origin of nematode species and isolates used in the study and their GenBank accession numbers

Forma patogenności Virulent form	Nazwa izolatu Isolate name	Pochodzenie izolatu Geographical origin	Numer akcesyjny w Banku Genów GenBank GenBank accession No.
Patogeniczne Pathogenic	China	Nanjing, Chiny – China	KM657966
	Ne 21/02	Nanjing, Chiny – China	KT581989
	Ka4	Ibaraki, Japonia – Japan	KX856335
	S10	Shimane, Japonia – Japan	AB277206
	T4	Iwate, Japonia – Japan	AB277207
	KR-3(w)	Korea – Korea	KT581988
	BxPt67OL	Portugalia – Portugal	JN684843
	BxMad25C	Madeira, Portugalia – Portugal	KX856336
Niepatogeniczne Nonpathogenic	C14-5	Chiba, Japonia – Japan	AB277203
	OKD-1	Okayama, Japonia – Japan	AB277205

	510 520 530 540 550
BxT4	CAGAAACGCC GACTTGTTTT TTTCAGTTT CTGCACGTTG TGACAGTCGT
BxChina	CAGAAACGCC GACTTGTTTT TTTCAGTTT CTGCACGTTG TGACAGTCGT
BxKR-3 (w)	CAGAAACGCC GACTTGTTTT TTTCAGTTT CTGCACGTTG TGACAGTCGT
BxNe2102	CAGAAACGCC GACTTGTTTT TTTCAGTTT CTGCACGTTG TGACAGTCGT
BxPt67OL	CAGAAACGCC GACTTGTTTT TTTCAGTTT CTGCACGTTG TGACAGTCGT
BxS10	CAGAAACGCC GACTTGTTTT TTTCAGTTT CTGCACGTTG TGACAGTCGT
BxKa4	CAGAAACGCC GACTTGTTTT TTTCAGTTT CTGCACGTTG TGACAGTCGT
BxMad25C	CAGAAACGCC GACTTGTTTT TTTCAGTTT CTGCACGTTG TGACAGTCGT
BxC14-5	CAGAAACGCC GACTTGTTTT TTTCAGTTT CTGCACGTTG TGACAGTCGT
BxOKD-1	<u>CAGAAACGCC GACTTGTTTT TTTCAGTTT CTGCACGTTG TGACAGTCGT</u>
	forward primer

	560 570 580 590 600
BxT4	CTCGCATTGT TCGCGCAATG TTAGGCACCA TCTGTTTTAC GCGGTTTGT
BxChina	CTCGCATTGT TCGCGCAATG TTAGGCACCA TCTGTTTTAC GCGGTTTGT
BxKR-3 (w)	CTCGCATTGT TCGCGCAATG TTAGGCACCA TCTGTTTTAC GCGGTTTGT
BxNe2102	CTCGCATTGT TCGCGCAATG TTAGGCACCA TCTGTTTTAC GCGGTTTGT
BxPt67OL	CTCGCATTGT TCGCGCAATG TTAGGCACCA TCTGTTTTAC GCGGTTTGT
BxS10	CTCGCATTGT TCGCGCAATG TTAGGCACCA TCTGTTTTAC GCGGTTTGT
BxKa4	CTCGCATTGT TCGCGCAATG TTAGGCACCA TCTGTTTTAC GCGGTTTGT
BxMad25C	CTCGCATTGT TCGCGCAATG TTAGGCACCA TCTGTTTTAC GCGGTTTGT
BxC14-5	CTCGCATTGT TCGCGCAATG TTAGGCACCA TCTGTTTTAC GCGGTTTGT
BxOKD-1	CTCGCATTGT TCGCGCAATG TTAGGCACCA TCTGTTTTAC GCGGTTTGT

	610
BxT4	CCGCGACCAA TAT
BxChina	CCGCGACCAA TAT
BxKR-3 (w)	CCGCGACCAA TAT
BxNe2102	CCGCGACCAA TAT
BxPt67OL	CCGCGACCAA TAT
BxS10	CCGCGACCAA TAT
BxKa4	CCGCGACCAA TAT
BxMad25C	CCGCGACCAA TAT
BxC14-5	CCGCGACCAA TAT
BxOKD-1	<u>CCGCGACCAA TAT</u>
	reverse primer

Rys. 1. Diagram ukazujący sekwencje nukleotydów startera forward i reverse oraz zidentyfikowaną różnicę w sekwencji amplikonu pomiędzy populacjami patogenicznymi i niepatogenicznymi *Bursaphelenchus xylophilus*

Fig. 1. Diagram indicating the nucleotide sequences of the forward and reverse primer and the identified sequence single nucleotide polymorphism (SNP) differentiating virulent and avirulent populations of *Bursaphelenchus xylophilus*

Mieszanina reakcyjna zawierała: 1 µl DNA (stężenie 30–50 ng/µl), 1 µl startera forward 10 µmol/µl, 1 µl startera reverse 10 µmol/µl, 2,5 mM MgCl oraz 10 µl buforu LightCycler® 480 High Resolution Melting Master (Roche Diagnostics). Całość uzupełniano wodą do objętości 20 µl. Reakcje PCR-HRM prowadzono w następujących warunkach: początkowa denaturacja w temperaturze 95°C przez 10 minut, 50 cykli: denaturacja w temperaturze 95°C przez 15 sekund, przyłączanie starterów w temperaturze 60°C przez 15 sekund oraz wydłużanie w temperaturze 72°C przez 20 sekund. Reakcje przeprowadzono w aparacie LightCycler® 480 Software, Version 1.5. Otrzymane dane analizowane były zgodnie z instrukcjami producenta.

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Przeprowadzone, wcześniejsze badania nad nicieniem *B. xylophilus* wykazały znaczne różnice genetyczne, a także w patogeniczności pomiędzy populacjami tego kwarantannowego szkodnika (Braasch i wsp. 1995; Irdani i wsp. 1995; Zhang i wsp. 2002; Vieira i wsp. 2007). Roz-

różnienie populacji patogenicznych od niepatogenicznych tego nicienia jest niemożliwe, dlatego poszukiwane są metody molekularne. W przeprowadzonych badaniach do odróżniania dwóch wirulentnych form *B. xylophilus* wykorzystano reakcję real-time PCR-HRM. Zaletą tej techniki jest możliwość odróżnienia dwóch badanych gatunków lub populacji na podstawie pojedynczych mutacji występujących pomiędzy nimi (Wittwer i wsp. 2003; Pasay i wsp. 2008). Wykryta mutacja występująca w regionie zmiennym ITS-2 pomiędzy populacjami patogenicznymi i niepatogenicznymi *B. xylophilus* umożliwiła wykorzystanie tej techniki do rozróżniania dwóch wirulentnych form tego nicienia. W niektórych populacjach *B. xylophilus* w obrębie tego regionu występują inne, dodatkowe mutacje. Są one jednak charakterystyczne dla populacji tego nicienia obejmujących samice wyróżniające się charakterystycznym wyrostkiem na końcu ogona (Braasch i wsp. 2001; Penas i wsp. 2004; Fonseca i wsp. 2008; Gu i wsp. 2011).

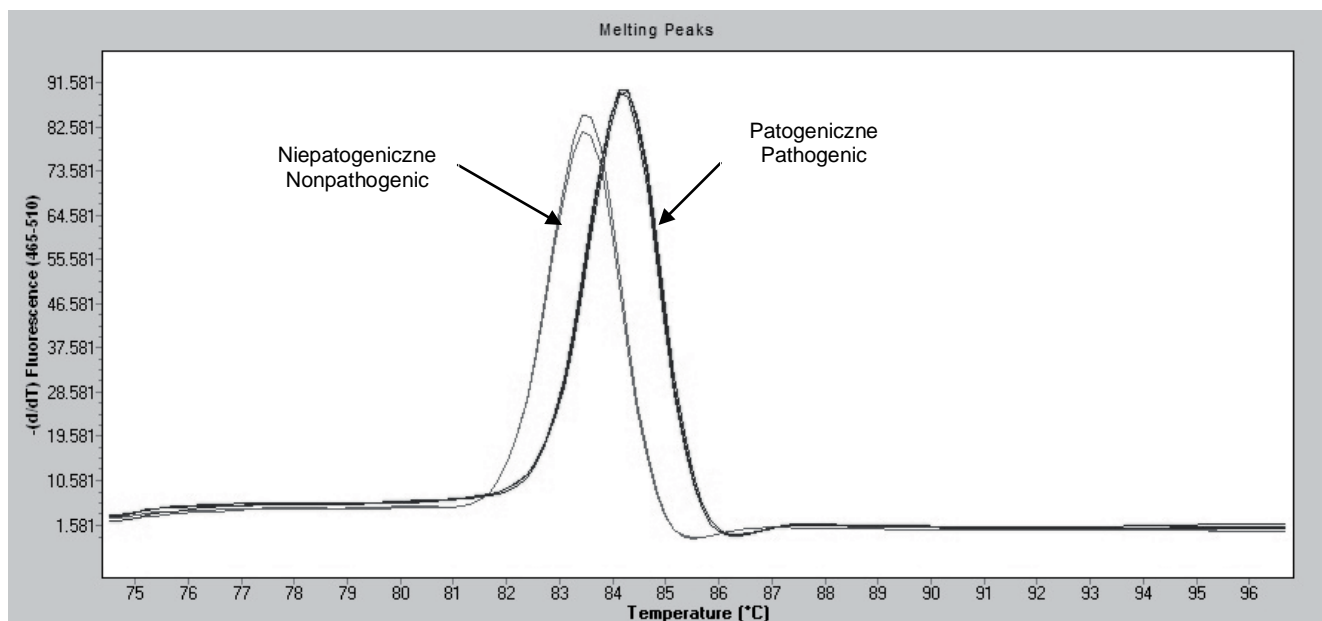
Przeprowadzone doświadczenia potwierdziły skuteczność zaprojektowanych starterów do powielania wybranych fragmentów DNA, które umożliwiają odróżnianie patogenicznych od niepatogenicznych populacji kwaran-

tannowego nicienia *B. xylophilus*. Analiza krzywej topnienia produktów reakcji wykazała obecność pojedynczego produktu amplifikacji dla każdej z przeprowadzonych reakcji (rys. 2).

Uzyskane podczas analizy HRM znormalizowane krzywe topnienia DNA różniły się pomiędzy sobą temperaturą denaturacji, o czym świadczą znaczne przesunięcia tych krzywych względem siebie. Wskazuje to na obecność różnic w składzie nukleotydowym badanych gatunków nicieni w amplifikowanym rejonie genomu (rys. 3).

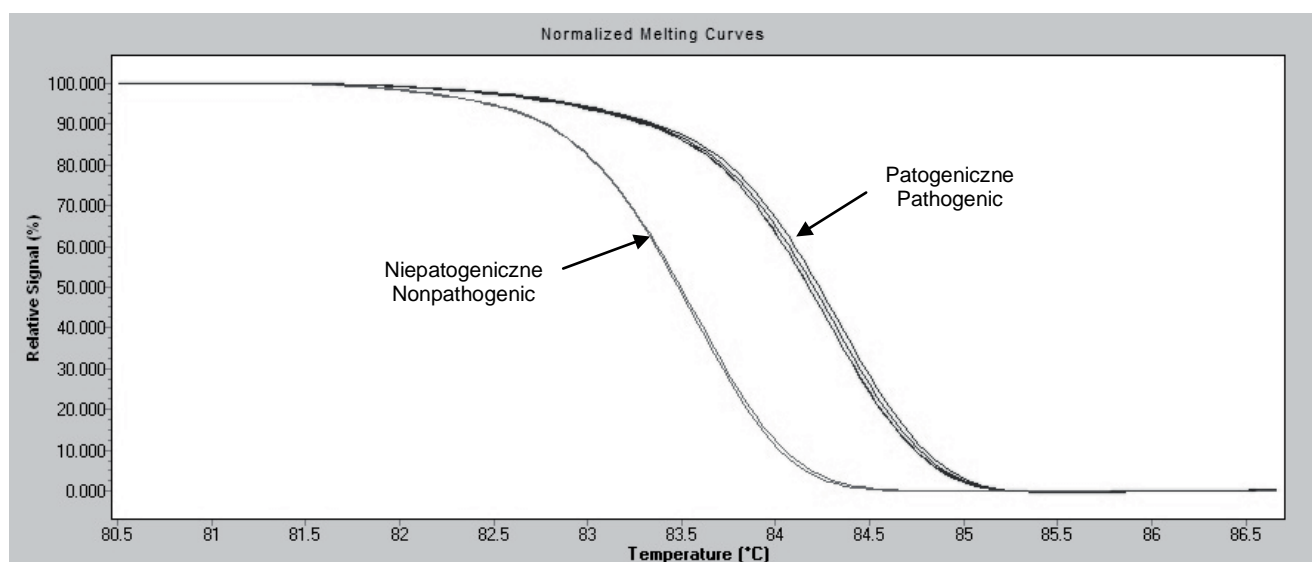
Zaprojektowane startery pozwalały na amplifikację produktów umożliwiającą odróżnienie dwóch różnych wirulentnych form *B. xylophilus*, co potwierdzone zostało również na wykresie różnicującym patogeniczne i niepatogeniczne populacje tego szkodnika (rys. 4).

Zarówno reakcje DNA wyizolowanym z populacji nicieni, jak i z pojedynczych osobników (bez względu na stadium rozwojowe) pozwalały na wyraźne odróżnienie od siebie populacji tego nicienia charakteryzujących się różną patogenicznością.



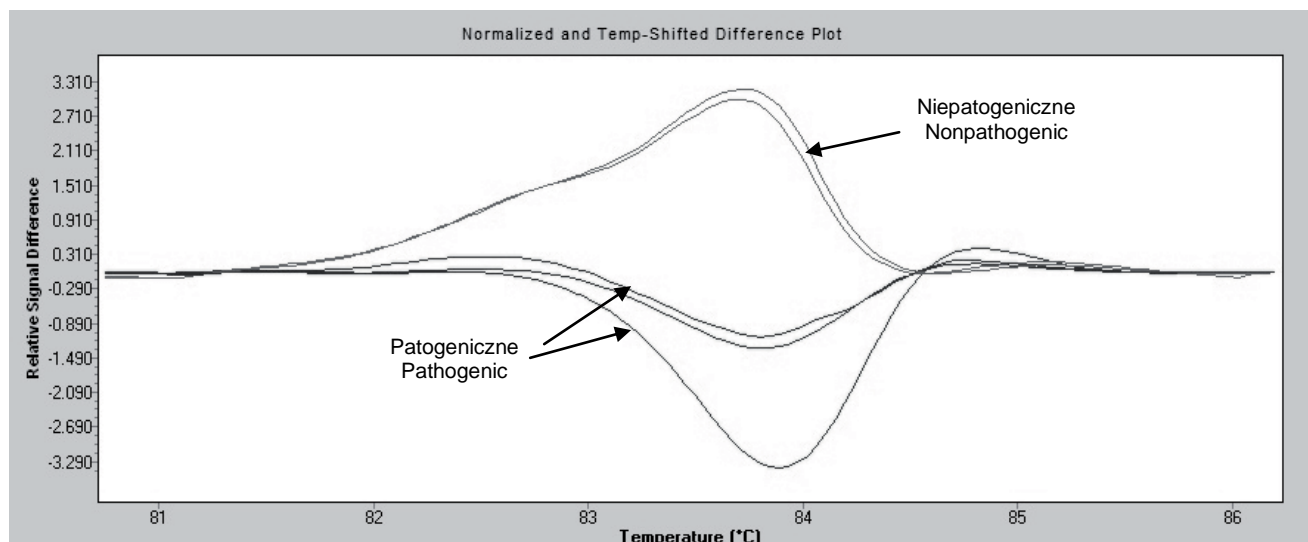
Rys. 2. Krzywe topnienia produktów reakcji PCR-HRM dla patogenicznych (China, Ka4 oraz T4) i niepatogenicznych (C14-5 oraz OKD-1) populacji *Bursaphelenchus xylophilus*

Fig. 2. Melting curves of real-time PCR-HRM products for pathogenic (China, Ka4 and T4) and nonpathogenic (C14-5 and OKD-1) populations of *Bursaphelenchus xylophilus*



Rys. 3. Znormalizowany wykres fluorescencji różnicujący produkty reakcji PCR-HRM dla patogenicznych (China, Ka4 oraz T4) i niepatogenicznych (C14-5 oraz OKD-1) populacji *Bursaphelenchus xylophilus*

Fig. 3. Normalized melting curves of real-time PCR-HRM products for pathogenic (China, Ka4 and T4) and nonpathogenic (C14-5 and OKD-1) populations of *Bursaphelenchus xylophilus*



Rys. 4. Wykres różnicujący produkty reakcji PCR-HRM dla patogenicznych (China, Ka4 oraz T4) i niepatogenicznych (C14-5 oraz OKD-1) populacji *Bursaphelenchus xylophilus*

Fig. 4. Differential plot of real-time PCR-HRM products for pathogenic (China, Ka4 and T4) and nonpathogenic (C14-5 and OKD-1) populations of *Bursaphelenchus xylophilus*

Reakcja PCR-HRM umożliwia wykrycie nawet pojedynczych zmian nukleotydowych w badanych produktach PCR, dzięki czemu może być bardzo przydatną metodą wspomagającą i rozstrzygającą w przypadku identyfikacji bardzo blisko ze sobą spokrewnionych gatunków i izolatów dających niejednoznaczne rezultaty w reakcji real-time PCR. W porównaniu do innych metod molekularnych, technika PCR-HRM może być dużo prostszym i znacznie tańszym sposobem identyfikowania i różnicowania kwarantannowego szkodnika *B. xylophilus*.

Wnioski / Conclusions

1. Przeprowadzone badania wykazały, że reakcja PCR-HRM umożliwia łatwe odróżnienie patogenicznych od niepatogenicznych populacji *B. xylophilus*.

2. Metoda ta jest bardzo czuła i pozwala na wykrycie różnic nawet w pojedynczych nukleotydach.
3. Analiza PCR-HRM jest również znacznie tańsza w porównaniu do powszechnie stosowanej techniki PCR-RFLP.

Podziękowania / Acknowledgements

Autorka pragnie podziękować pracownikom Międzyzakładowej Pracowni Biologii Molekularnej oraz Zakładowi Wirusologii i Bakteriologii Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego za udostępnienie części wykorzystanego w badaniach sprzętu oraz cenne wskazówki udzielone w czasie realizacji prac i interpretacji wyników.

Literatura / References

- Aikawa T., Kikuchi T. 2007. Estimation of virulence of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) based on its reproductive ability. *Nematology* 9 (3): 371–377. DOI: 10.1163/156854107781352007.
- Braasch H., Burgermeister W., Pastrok K. 1995. Differentiation of three *Bursaphelenchus* species by means of RAPD-PCR. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 47: 310–314.
- Braasch H., Tomiczek Ch., Metge K., Hoyer U., Burgermeister W., Wulfert I., Schönfeld U. 2001. Records of *Bursaphelenchus* spp. (Nematoda, Parasitaphelenchidae) in coniferous timber imported from the Asian part of Russia. *Forest Pathology* 31: 129–140. DOI: 10.1046/j.1439-0329.2001.00233.x.
- Demeler J., Ramünke S., Wolken S., Ianiello D., Rinaldi L., Gahutu J.B., Cringoli G., von Samson-Himmelstjerna G., Krücken J. 2013. Discrimination of gastrointestinal nematode eggs from crude fecal egg preparations by inhibitor-resistant conventional and real-time PCR. *PLoS ONE* 8(4): e61285. DOI: 10.1371/journal.pone.0061285.
- Filipiak A., Hasiów-Jaroszewska B. 2016. The use of real-time polymerase chain reaction with high resolution melting (real-time PCR-HRM) analysis for the detection and discrimination of the quarantine nematode *Bursaphelenchus xylophilus* and *Bursaphelenchus mucronatus*. *Molecular and Cellular Probes* 30 (2): 113–117. DOI: 10.1016/j.mcp.2016.02.003.
- Fonseca L., dos Santos M.C.V., Santos M.S.N.A., Curtis R.H.C., Abrantes I.M.O. 2008. Morphobiometrical characterisation of Portuguese *Bursaphelenchus xylophilus* isolates with mucronate, digitate or round tailed females. *Phytopathologia Mediterranea* 47: 223–233.
- Gu J., Wang J., Braasch H., Burgermeister W., Schroeder T. 2011. Morphological and molecular characterisation of mucronate isolates ('M' form) of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae). *Russian Journal of Nematology* 19: 103–120.
- Holterman M.H.M., Oggenfuss M., Frey J.E., Kiewnick S. 2012. Evaluation of high-resolution melting curve analysis as a new tool for root-knot nematode diagnostics. *Journal of Phytopathology* 160: 59–66.

- Irdani T., Caroppo S., Ambrogioni L. 1995. Molecular identification of pine wood *Bursaphelenchus* species. *Nematologia Mediterranea* 23: 99–106.
- Kiyohara T., Bolla R.I. 1990. Pathogenic variability among populations of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Forest Science* 36 (4): 1061–1076.
- Koressaar T., Remm M. 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23 (10): 1289–1291.
- Mota M.M., Braasch H., Bravo M.A., Penas A.C., Burgermeister W., Metge K., Sousa E. 1999. First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology* 1 (7–8): 727–734.
- Panichareon B., Khawsak P., Deesukon W., Sukhumsirichart W. 2011. Multiplex real-time PCR and high-resolution melting analysis for detection of White spotsyndrome virus, Yellow-head virus, and Penaeus monodon densovirus in penaeidshrimp. *Journal of Virological Methods* 178 (1–2): 16–21. DOI: 10.1016/j.jviromet.2011.07.010.
- Pasay C., Arlian L., Morgan M., Vyszynski-Moher D., Rose A., Holt D., Walton S., McCarthy J. 2008. High-resolution melt analysis for the detection of a mutation associated with permethrin resistance in a population of scabies mites. *Medical and Veterinary Entomology* 22 (1): 82–88. DOI: 10.1111/j.1365-2915.2008.00716.x.
- Penas A.C., Correia P., Bravo M.A., Mota M., Tenreiro R. 2004. Species of *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Nematoda: Parasitaphelenchidae) associated with maritime pine in Portugal. *Nematology* 6 (3): 437–453.
- Robertson L., Cobacho Arcos S., Escuer M., Santiago Merino R., Esparrago G., Abelleira A., Navas A. 2011. Incidence of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* Steiner & Buhner, 1934 (Nickle, 1970) in Spain. *Nematology* 13 (6): 755–757.
- Senapin S., Molthathong S., Phiwasaiya K., Jaengsanong C., Chuchird N. 2010. Application of high resolution melt (HRM) analysis for duplex detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) in shrimp. *Molecular and Cellular Probes* 24 (5): 291–297.
- Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M., Rozen S.G. 2012. Primer3 – new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40 (15): e115. DOI: 10.1093/nar/gks596.
- Vieira P., Burgermeister W., Mota M., Metge K., Silva G. 2007. Lack of genetic variation of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal revealed by RAPD-PCR analyses. *Journal of Nematology* 39 (2): 118–126.
- Wang Y., Yamada T., Sakaue D., Suzuki K. 2005. Variations on the life history parameters and their influence on rate of population increase of different pathogenic isolates of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Nematology* 7 (3): 459–467.
- Wittwer C.T., Reed G.H., Hundry C.N., Vandersteent J.G., Pryor R.J. 2003. High-resolution genotyping by amplicons melting analysis using LC green. *Clinical Chemistry* 49 (6): 853–860.
- Zhang L., Kong F., Yang B. 2002. Intra and interspecific variation in *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* revealed by mtDNA polymorphism. *Forest Research* 15: 7–12.