

Received: 10.10.2021 / Accepted: 15.11.2021

ARTYKUŁ ORYGINALNY

## Ocena przydatności techniki PCR do identyfikacji nicieni *Bursaphelenchus mucronatus* Mamiya & Enda 1979, *B. xylophilus* Steiner & Buhner 1934 (Nickle 1970) i *B. fraudulentus* Rühm 1956 (Nematoda, Aphelenchoididae) w surowym ekstrakcie nicieni izolowanych z drewna

## Assessment of the PCR technique for identification of *Bursaphelenchus mucronatus* Mamiya & Enda 1979, *B. xylophilus* Steiner & Buhner 1934 (Nickle 1970) and *B. fraudulentus* Rühm 1956 (Nematoda, Aphelenchoididae) in crude extract of nematodes isolated from wood

Anna Filipiak<sup>A\*</sup>, Marek Tomalak<sup>B</sup>

### Streszczenie

*Bursaphelenchus xylophilus* Steiner & Buhner 1934 (Nickle 1970) jest czynnikiem sprawczym choroby wędnięcia sosny, prowadzącym do szybkiego zamierania drzew sosnowych w Azji i Europie. Występujące na naszym kontynencie niepatogeniczne nicienie *B. mucronatus* Mamiya & Enda 1979 oraz *B. fraudulentus* Rühm 1956 są najbardziej podobne morfologicznie do *B. xylophilus*. Co więcej, wszystkie te trzy gatunki mogą występować na tych samych stanowiskach drzew iglastych, dlatego też istnieje duże ryzyko błędnej identyfikacji tych nicieni w próbach drewna sosny. Głównym celem przedstawionych badań było możliwe uproszczenie skuteczności obecnie dostępnych procedur identyfikacji *B. xylophilus* w surowym ekstrakcie z drewna, przy możliwej, równoczesnej obecności pozostałych gatunków *Bursaphelenchus* z grupy *xylophilus* oraz innych nicieni bakterio- i grzybożernych naturalnie występujących w próbkach drewna sosnowego. W obecnie opisywanych badaniach, identyfikację nicieni *B. mucronatus* występujących zarówno w surowym ekstrakcie z drewna, jak również w ekstrakcie uzupełnionym określoną liczbą osobników *B. xylophilus* lub *B. fraudulentus*, przeprowadzano stosując prostszą technikę łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) z zaprojektowanymi specyficznymi starterami, komplementarnymi do regionów ITS1–28S rDNA.

**Słowa kluczowe:** węgorek sosnowiec, identyfikacja nicieni, modyfikacja techniki PCR, drewno sosny

### Abstract

The pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* Steiner & Buhner 1934 (Nickle 1970) is the major causative agent of the pine wilt disease which has become devastating to Asian and European coniferous forests. These regions are also naturally occupied by two other native but nonpathogenic species, *i.e.* *B. mucronatus* Mamiya & Enda 1979 and *B. fraudulentus* Rühm 1956 which are closely related to the invasive *B. xylophilus*. Moreover, all these three species can colonize pine trees, and potentially be extracted from the same wood samples. Due to the cosmopolitan character and wide genetic variation within- and between existing populations the taxonomic distinction of these species based exclusively on their morphology is difficult or, almost impossible. The present quarantine regulations related to *B. xylophilus* require the most credible and simple methods which could allow for a possibly earliest detection and precise identification of this species in wood shipments and conifer forests stands. The main objectives of the presently reported research were to simplify the presently available procedures for possibly fast and precise detection and identification of *B. xylophilus* examined in the background of the remaining *Bursaphelenchus* species of the *xylophilus* group and other bacterio- and mycetophagous nematodes naturally present in the pine wood samples. The developed method is based on a direct examination of the crude nematode extract from wood samples and subsequent use of PCR technique with earlier designed specific reaction starters amplifying ITS1–28S rDNA regions.

**Key words:** pine wood nematode, nematode detection, modification of the PCR technique, pine wood samples

## Wstęp / Introduction

Rozwijający się w drewnie nicien węgorek sosnowiec – *Bursaphelenchus xylophilus* Steiner & Buhner 1934 (Nickle 1970) (Nematoda, Aphelenchoididae) jest głównym sprawcą groźnej choroby wędnięcia sosny, atakującej niektóre jej gatunki i okazjnie również inne drzewa iglaste w różnych rejonach świata. Jako gatunek inwazyjny pochodzący z Ameryki Północnej już od początku ubiegłego wieku zaczął on zasiedlać wschodnie rejony Azji (Japonia, Chiny, Tajwan i Korea Południowa), gdzie stał się ważnym szkodnikiem dewastującym lokalne drzewostany sosnowe (Mamiya i Kiyohara 1972; Cheng i wsp. 1983; Futai 2013). Od lat 90. węgorek sosnowiec występuje również w Europie (Portugalia i Hiszpania) (Mota i wsp. 1999; Inacio i wsp. 2015). W procesie zasiedlania kolejnych, zdrowych drzew oraz nowych obszarów geograficznych węgorek sosnowiec skutecznie wykorzystuje niektóre lokalne gatunki chrząszczy kózkowatych z rodzaju żerdzianka (*Monochamus*), jako niezbędne wektory. W Europie jest to powszechnie występująca żerdzianka sosnowka (*Monochamus galloprovincialis*) (Coleoptera, Cerambycidae). Poprzez swoją wysoką patogeniczność, prowadzącą do szybkiego zamierania nawet starszych drzew oraz stałe rozprzestrzenianie się na nowe obszary, od początku bieżącego wieku *B. xylophilus* stwarza poważne zagrożenie również dla drzewostanów sosnowych Europy, w skład których wchodzi szereg bardzo wrażliwych gatunków sosny (*Pinus silvestris* L., *Pinus nigra* Arn., *Pinus pinaster* Aiton). Z tego powodu również w Europie nicien ten został objęty szczególnymi przepisami kwarantannowymi (m.in. Lista EPPO A2; stale aktualizowane Decyzje implementacyjne Komisji i Rady Europy; przepisy krajowe), obowiązującymi we wszystkich państwach tego rejonu. Do najważniejszych, regulowanych obszarów należy prewencja, polegająca głównie na stałym monitorowaniu pod kątem obecności węgorka sosnowca lokalnych drzewostanów oraz transportów drewna i opakowań drewnianych przemieszczanych w handlu międzynarodowym oraz wczesnym eliminowaniu porażonych drzew i materiałów drzewnych. Wczesne, szybkie i w pełni wiarygodne wykrywanie oraz identyfikacja nicieni zasiedlających drewno jest zadaniem priorytetowym dla służb fitosanitarnych i leśnych. Wcześniejsze badania wykazały, że szereg naturalnych zjawisk, takich jak: wpływ temperatury otoczenia na opóźnienie ujawniania się symptomów chorobowych, niska liczebność węgorka sosnowca na początku infekcji, możliwość równoczesnego występowania podobnych, lokalnych gatunków rodzaju *Bursaphelenchus* z grupy *xylophilus* w tych samych próbach drewna, spontaniczna hybrydyzacja pomiędzy *B. xylophilus* i najbliższym z nim spokrewnionym, rodzimym dla drzewostanów Europy *Bursaphelenchus mucronatus* oraz związane z tym rozszerzenie zmienności morfologicznej, *etc.*, znacznie utrudnia realizację tego zadania. Dotychczasowe badania

wykazały możliwość występowania tych zjawisk w drzewostanach w Polsce i dostarczyły nowych rozwiązań ułatwiających wykrywanie i identyfikację *B. xylophilus* na tle pozostałych nicieni występujących w próbach drewna (Filipiak i wsp. 2010, 2017, 2019; Tomalak i Filipiak 2021). Zgodnie z rekomendacją EPPO, DNA nicieni ekstrahowanych z drewna wykrywane jest przy użyciu techniki real-time PCR wymagającej specjalistycznej aparatury (EPPO Bulletin 2013).

Głównym celem prezentowanych badań było możliwe uproszczenie i weryfikacja skuteczności metody identyfikacji *B. xylophilus* w surowym ekstrakcie z drewna sosny przy pomocy prostszej techniki PCR z zastosowaniem specyficznych starterów.

## Materiały i metody / Materials and methods

W przeprowadzonych badaniach wykorzystano próby drewna sosny z widocznymi śladami żerowisk żerdzianki sosnowki i/lub sinizny drewna, które pobrano w Nadleśnictwach Międzychód (Leśnictwo Przedlesie: 52.61565 N i 15.85122 E) i Wronki (Leśnictwo Mokrz: 52.77256 N i 16.27805 E). Próby te poddane zostały ocenie pod kątem występowania nicieni naturalnie zasiedlających drewno.

### Ekstrakcja nicieni z drewna

Rozdrobnione próby drewna o całkowitej objętości około 500 cm<sup>3</sup> umieszczano na wyścielonych ręcznikiem papierowym sitach nematologicznych o średnicy oczek 1 mm. Sita wstawiano do pojemników z wodą, zanurzając je do głębokości około 1,5 cm. Znajdujące się w drewnie nicienie poddawano ekstrakcji przez 24 h. W każdym uzyskanym ekstrakcie na drodze seryjnych rozcieńczeń określano liczebności osobników gatunku *B. mucronatus* w jednostce objętości (1 ml) oraz dokonywano ogólnego przeglądu pozostałych gatunków z innych grup taksonomicznych. Uzyskany ekstrakt zawierający liczne, naturalnie zasiedlające badane drewno osobniki *B. mucronatus* oraz inne, towarzyszące nicienie bakterio- i grzybożerne oraz drapieżne, należące głównie do rzędów Rhabditida, Tylenchida i Aphelenchida, zagęszczano do objętości około 25 ml na drodze swobodnej sedymentacji przez 1 h. Po upływie tego czasu, supernatant usuwano pipetą, pozostawiając ostateczną objętość ekstraktu do 5 ml. Następnie, tak przygotowany surowy ekstrakt dokładnie mieszano i rozdzielano na 1 ml próby do pięciu osobnych probówek Eppendorfa. Całość wirowano przez 10 minut przy obrotach 11 000 rpm. Supernatant zlewano, a do osadu dodawano 1 kulkę szklaną o średnicy 3 mm i 4 kulki o średnicy 1 mm oraz 180 µl buforu ATL i 20 µl proteiny K z zestawu QIAmp DNA Mini Kit, QIAGEN (zestaw rekomendowany przez EPPO do izolacji nicieni z drewna). Tak otrzymana mieszanina była poddawana

na homogenizacji (30 uderzeń/s przez 40 s). Kolejne etapy przeprowadzono zgodnie z metodyką załączoną do zestawu QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN). Wyizolowane z drewna DNA stanowiło matrycę do dalszych analiz molekularnych w celu detekcji badanych nicieni.

### Reakcja PCR

Do reakcji PCR użyto starterów specyficznych amplifikujących regiony ITS1–28S rDNA dla trzech znanych gatunków nicieni z rodzaju *Bursaphelenchus*, grupy *xylophilus*, mogących w Europie występować w drewnie sosny, tj. węgorka sosnowca (Bx-For/Bur-Rev), *B. mucronatus* (Bm-For/Bur-Rev) i *B. fraudulentus* (Bf-For/Bur-Rev) (tab. 1) (Filipiak i wsp. 2017). Reakcje PCR prowadzono w objętości 10 µl, z użyciem polimerazy DreamTaq™ Green Master Mix (2X) (ThermoFisher Scientific), specyficznych starterów 0,16 µM (Bx-For, Bm-For, Bf-For oraz Bur-Rev) oraz 2 µl DNA, otrzymanego po ekstrakcji z drewna. W kontroli pozytywnej stosowano odpowiednio DNA (2 µl) wyizolowane z hodowli laboratoryjnej *B. mucronatus*, *B. xylophilus* i *B. fraudulentus*.

Dodatkowo, w celu potwierdzenia możliwości jednoczesnego wykrywania w drewnie wspomnianych trzech gatunków nicieni: *B. mucronatus*, *B. xylophilus* oraz/lub *B. fraudulentus*, do przygotowanej, analogicznie jak powyżej, mieszaniny reakcyjnej oprócz DNA pochodzącego z wcześniej uzyskanego ekstraktu z badanych próbek, wprowadzano dodatkowo DNA wyizolowane z 1 lub 10 osobników dorosłych *B. xylophilus* lub *B. fraudulentus*. Przygotowano również kontrolę pozytywną dla każdego z trzech badanych gatunków nicieni oraz kontrolę odczynnikową, gdzie zamiast DNA użyto sterylnej wody.

Reakcję PCR przeprowadzono według następujących warunków termicznych: wstępna denaturacja 2 min w 94°C, następnie 35 cykli: denaturacja w 94°C przez 40 s, przyłączanie starterów w 59°C przez 40 s, wydłużanie w 72°C przez 30 s i końcowe wydłużanie w 72°C przez 5 min. Otrzymane produkty rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics Europe) i wizualizowano w świetle UV.

### Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Przedstawione obecnie wyniki badań z wykorzystaniem surowego ekstraktu nicieni z drewna sosny oraz uproszczonej metody równoczesnego wykrywania i identyfikacji wszystkich trzech gatunków nicieni z rodzaju *Bursaphelenchus*, grupy *xylophilus*, mogących występować w drewnie sosny w Europie (Filipiak i wsp. 2017) wykazały wysoką skuteczność zastosowanej procedury. Metoda PCR wykorzystująca zaprojektowane wcześniej startery pozwoliła na jednoznaczny identyfikację otrzymanych produktów reakcji, specyficznych dla wszystkich badanych gatunków z rodzaju *Bursaphelenchus*.

W przypadku reakcji, w których jako matrycy użyto DNA *B. xylophilus*, *B. mucronatus* i *B. fraudulentus* pochodzących z hodowli laboratoryjnej (kontrola pozytywna), otrzymano produkty o spodziewanej wielkości: 767 pz dla *B. xylophilus* (fot. 1 ścieżka na żelu A i fot. 2 ścieżka A), 305 pz dla *B. mucronatus* (fot. 1 ścieżka B i fot. 2 ścieżka B) i 132 pz dla *B. fraudulentus* (fot. 2 ścieżka C). Dzięki tak wyraźnym różnicom identyfikacja reprezentowanych przez nie gatunków nicieni była stosunkowo łatwa. Dla kontroli odczynnikowej na żelu nie otrzymywano żadnych produktów (fot. 1 ścieżka F i fot. 2 ścieżka I).

Dla nicieni naturalnie występujących w obecnie ekstrahowanych próbach drewna (surowy ekstrakt) rozdział elektroforetyczny wykazywał tylko jeden produkt reakcji o wielkości 305 pz, co jednoznacznie wskazywało na obecność *B. mucronatus* (fot. 1 ścieżki C–E i fot. 2 ścieżka D). DNA pozostałych, występujących równocześnie naturalnych populacji innych nicieni bakterio- i grzybożernych oraz drapieżnych nie było amplifikowane w trakcie przeprowadzanej reakcji PCR ze względu na brak odpowiednich starterów.

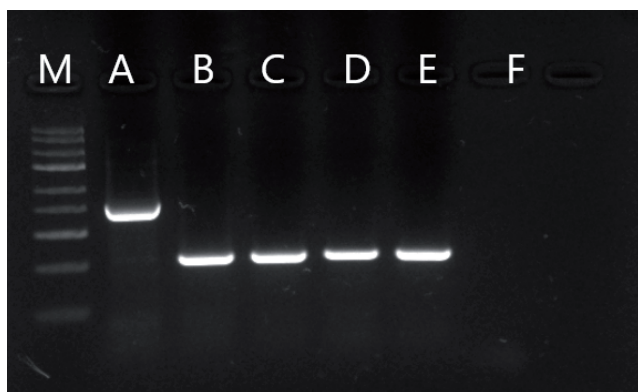
W badaniach, w których do analizowanej mieszaniny, poza DNA pochodzącym z wcześniej uzyskanego surowego ekstraktu, wprowadzano także osobniki dorosłe *B. xylophilus* lub *B. fraudulentus*, otrzymywano jednocześnie produkty PCR specyficzne dla *B. mucronatus* naturalnie występującego w badanym ekstrakcie, jak i specyficzne produkty dla dodatkowo wprowadzonych *B. xylophilus* lub *B. frau-*

**Tabela 1.** Startery zaprojektowane do wykrywania *Bursaphelenchus xylophilus*, *Bursaphelenchus mucronatus* i *Bursaphelenchus fraudulentus* (Filipiak i wsp. 2017)

**Table 1.** Primers designed to detect *Bursaphelenchus xylophilus*, *Bursaphelenchus mucronatus* and *Bursaphelenchus fraudulentus* (Filipiak et al. 2017)

Nazwa startera Primer name	Sekwencja 5'-3' Sequence 5'-3'	Wielkość produktu (pz) Amplicon size (bp)
Bx-For	CGATGATGCGATTGGTGACT	767
Bm-For	CCAAGTTTCTGCATTTCGTGAAC	305
Bf-For	CCGTCATGGATGTCTTCTGATTA	132
Bur-Rev	CCCAACTCAGGTGGTTTCAA	–





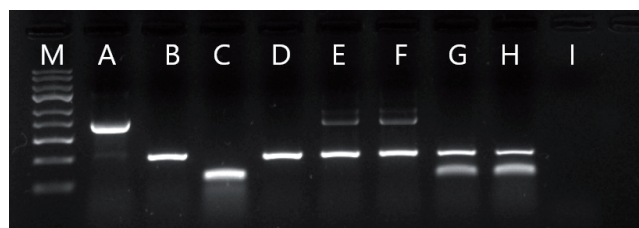
**Fot. 1.** Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR z zastosowaniem specyficznych starterów forward (Bx-For/Bm-For/Bf-For) oraz uniwersalnego startera reverse (Bur-Rev): A – *Bursaphelenchus xylophilus* Pt67OL (hodowla – Portugalia); B – *Bursaphelenchus mucronatus* Mdz-01 (hodowla – Międzychód, Polska); C – DNA nicieni otrzymane z surowego ekstraktu drewna z Nadleśnictwa Międzychód; D–E – DNA nicieni otrzymane z surowego ekstraktu drewna z Nadleśnictwa Wronki; F – kontrola odczynnikowa; M – marker GeneRuler™ Express DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)

**Photo 1.** PCR products separated by electrophoresis after amplification using species-specific primer (Bx-For/Bm-For/Bf-For) and universal primer (Bur-Rev): A – *Bursaphelenchus xylophilus* Pt67OL (culture – Portugal); B – *Bursaphelenchus mucronatus* Mdz-01 (culture – Międzychód, Poland); C – nematode DNA obtained from crude extract from wood (forest district Międzychód, Poland); D–E – nematode DNA obtained from crude extract from wood (forest district Wronki, Poland); F – no template control; M – marker GeneRuler™ Express DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)

*dulentus* (fot. 2 ścieżki E–H). Reakcja ta okazała się bardzo czuła, gdyż nawet w przypadku wprowadzenia 1 osobnika *B. xylophilus* lub *B. fraudulentus* do ekstraktu zawierającego materiał genetycznych z ponad 40 osobników *B. mucronatus* (średnia z rzeczywistych liczb nicieni naturalnie występująca w danej objętości próby ekstraktu), otrzymywano specyficzne produkty PCR zarówno dla *B. mucronatus*, jak i dla *B. xylophilus* lub *B. fraudulentus*.

Dużą zaletą zastosowanej techniki jest możliwość wprowadzania do mieszaniny reakcyjnej jednocześnie wszystkich opracowanych starterów. Nie stwierdzono przy tym występowania reakcji krzyżowych (cross-reactions) pomiędzy starterami i uzyskiwanymi produktami.

Dla praktyki bardzo ważna jest również wysoka specyficzność użytych starterów i wynikający z niej całkowity brak wpływu innych gatunków nicieni na ostateczny obraz separacji elektroforetycznej. Miazga i drewno osłabionych, zamierających i martwych drzew są zwykle zasiedlane przez liczne populacje innych nicieni (gatunki bakterio- i grzybożerne, drapieżne, pasożyty owadów, etc.). Użycie starterów



**Fot. 2.** Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR z zastosowaniem specyficznych starterów forward (Bx-For/Bm-For/Bf-For) oraz uniwersalnego startera reverse (Bur-Rev): A – *Bursaphelenchus xylophilus* Pt67OL (hodowla – Portugalia); B – *Bursaphelenchus mucronatus* Mdz-01 (hodowla – Międzychód, Polska); C – *Bursaphelenchus fraudulentus* (hodowla Helmstedt, Niemcy); D – DNA nicieni otrzymane z surowego ekstraktu drewna z Nadleśnictwa Wronki; E – DNA nicieni otrzymane z surowego ekstraktu drewna oraz 1 osobnik *B. xylophilus* Pt67OL; F – DNA nicieni otrzymane z surowego ekstraktu drewna oraz 10 osobników *B. xylophilus* Pt67OL; G – DNA nicieni otrzymane z surowego ekstraktu drewna oraz 1 osobnik *B. fraudulentus* Helmstedt; H – DNA nicieni otrzymane z surowego ekstraktu drewna oraz 10 osobników *B. fraudulentus* Helmstedt; I – kontrola odczynnikowa; M – marker GeneRuler™ Express DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)

**Photo 2.** PCR products separated by electrophoresis after amplification using species-specific primers (Bx-For/Bm-For/Bf-For) and universal primer (Bur-Rev): A – *Bursaphelenchus xylophilus* Pt67OL (culture – Portugal); B – *Bursaphelenchus mucronatus* Mdz-01 (culture – Międzychód, Poland); C – *Bursaphelenchus fraudulentus* (culture Helmstedt, Germany); D – nematode DNA obtained from crude extract of wood (forest district Wronki, Poland); E – nematode DNA obtained from crude extract of wood and 1 specimen of *B. xylophilus* Pt67OL; F – nematode DNA obtained from crude extract of wood and 10 specimens of *B. xylophilus* Pt67OL; G – nematode DNA obtained from crude extract of wood and 1 specimen of *B. fraudulentus* Helmstedt; H – nematode DNA obtained from crude extract of wood and 10 specimens of *B. fraudulentus* Helmstedt; I – no template control; M – marker GeneRuler™ Express DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)

uniwersalnych mogłoby prowadzić do wieloznaczności uzyskiwanych wyników identyfikacji taksonomicznej nicieni występujących w ekstrakcie.

Obecnie w drzewostanach sosnowych w Polsce, dominującym gatunkiem z grupy *xylophilus*, która gromadzi nicienie wykazujące najbliższe podobieństwo do węgorka sosnowca jest rodzimy, niepatogeniczny *B. mucronatus*. Drugim, blisko spokrewnionym z poprzednimi jest również niepatogeniczny *B. fraudulentus*. W przeciwieństwie do obu wcześniej wymienionych gatunków nicieni ten związany jest głównie z drzewami liściastymi, lecz okazjonalnie może występować również w sośnie (Tomalak 2017). Morfologicznie gatunki te są trudne do odróżnienia i wymagają szczególnej uwagi w trakcie analizy materiału pobranego z drewna, gdzie występuje również wiele innych nicieni.

Zastosowanie opracowanej wcześniej metody molekularnej, pozwalającej na równoczesne wykrywanie wszystkich tych trzech gatunków w jednej próbie drewna przy wykorzystaniu stosunkowo prostej techniki PCR ze specyficznymi starterami (Filipiak i wsp. 2017), rozwiązuje ten problem. Ponadto, zweryfikowana obecnie metoda analizy surowego ekstraktu nicieni z drewna, bez dodatkowego, arbitralnego wybierania poszczególnych osobników, lub wcześniejszego ich masowego rozmnożenia, znacznie upraszcza proces identyfikacji wymienionych wyżej gatunków. W przeciwieństwie do rekomendowanej przez EPPO techniki real-time PCR wymagającej specjalistycznej aparatury, proponowane rozwiązanie pozwala na uzyskanie wiarygodnych wyników przy zastosowaniu zwykłego termocyklera, który obecnie stanowi podstawowe wyposażenie większości laboratoriów służb fitosanitarnych zajmujących się badaniem szkodliwych organizmów.

Skuteczne wykrywanie wszystkich wymienionych gatunków zarówno niezależnie, jak i w przedstawionych kombinacjach mieszanych, w surowym ekstrakcie, przy obecności pojedynczych osobników *B. xylophilus* lub *B. fraudulentus* wśród licznych populacji *B. mucronatus* i innych odległych taksonomicznie gatunków, jednoznacznie wskazuje na wysoką czułość tej metody. W przypadku kolejnego, na początku zwykle ogniskowego, zadamawiania się węgorka sosnowca (*B. xylophilus*) na nowych obszarach Europy, najbardziej prawdopodobnym scenariuszem może być właśnie konieczność wykrywania jego nielicznych osobników na tle znacznych populacji rodzimych, niepatogenicznych gatunków *B. mucronatus* i okazynie *B. fraudulentus*. Proponowana obecnie procedura została przygotowana właśnie z myślą o takiej sytuacji, gdy prostota, łatwość przeprowadzenia analiz oraz szybkość i bardzo wysoka ich czułość są absolutnie niezbędne.

## Wnioski / Conclusions

Wyniki przeprowadzonych badań:

1. Pozwalają na skuteczną modyfikację metody wykrywania i identyfikacji kwarantannowego nicienia węgorka

## Literatura / References

- Cheng H.R., Lin M., Li W., Fang Z. 1983. The occurrence of a pine wilting disease caused by a nematode found in Nanjing. *Forest Pest Disease* 4: 1–5.
- EPPO Bulletin 2013. Diagnostics PM 7/4 (3) *Bursaphelenchus xylophilus* 43 (1): 105–118. DOI: 10.1111/epp.12024
- Filipiak A., Jakubowska A., Tomalak M. 2010. Species-specific polymerase chain reaction primers for simple detection of *Bursaphelenchus fraudulentus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae). *Nematology* 12 (1): 157–160. DOI: 10.1163/138855409X12469543767319
- Filipiak A., Wiczorek P., Tomalak M. 2017. Multiplex polymerase chain reaction for simultaneous detection and identification of *Bursaphelenchus xylophilus*, *B. mucronatus* and *B. fraudulentus* – Three closely species within the *xylophilus* group. *Nematology* 19 (9): 1107–1116. DOI: 10.1163/15685411-00003110

sosnowca (*B. xylophilus*) w surowym ekstrakcie nicieni z drewna sosny.

2. Umożliwiają równoczesną, szybką, stosunkowo łatwą i w pełni wiarygodną identyfikację wszystkich trzech gatunków nicieni z rodzaju *Bursaphelenchus*, z grupy *xylophilus*, zasiedlających drewno sosny w Europie.
3. Umożliwiają dokonanie jednoznacznej identyfikacji nawet pojedynczych osobników węgorka sosnowca w próbach drewna, równocześnie licznie zasiedlonych przez blisko spokrewnione z nim, rodzime, lecz niepatogeniczne gatunki *B. mucronatus* i *B. fraudulentus*.
4. Dzięki wysokiej specyficzności opracowanych wcześniej starterów reakcji PCR, pozwalają również na uniknięcie ewentualnego, negatywnego wpływu DNA innych bakterio- i grzybożernych oraz drapieżnych nicieni naturalnie zasiedlających drewno osłabionych, zamierających i martwych drzew.
5. Wyniki te mogą mieć istotne znaczenie dla doskonalenia metod wykrywania węgorka sosnowca zarówno w drzewostanach, jak i transportach drewna przemieszczanych w handlu międzynarodowym.

## Podziękowanie / Acknowledgements

Autorzy pragną podziękować panu mgr. Tadeuszowi Hłyniowi za pomoc w realizacji prac laboratoryjnych. Osobne podziękowania adresowane są do pracowników Zakładu Biologii Molekularnej i Biotechnologii za udostępnienie części wykorzystanego w badaniach sprzętu oraz cenne wskazówki udzielone w czasie realizacji prac.

## Finansowanie / Funding

Prezentowane badania finansowane były w ramach Dotacji Celowej MRiRW: Zadanie 1.2. „Optymalizacja metod wykrywania, monitorowania i zwalczania kwarantannowego nicienia węgorka sosnowca (*Bursaphelenchus xylophilus*) oraz jego wektora, żerdzianki sosnowki (*Monochamus galloprovincialis*) w warunkach środowiskowych Polski”.

- Filipiak A., Wieczorek P., Tomalak M. 2019. A fast and sensitive multiplex real-time PCR assay for simultaneous identification of *Bursaphelenchus xylophilus*, *B. mucronatus* and *B. fraudulentus* – three closely related species from the *xylophilus* group. *European Journal of Plant Pathology* 155 (1): 239–251. DOI: 10.1007/s10658-019-01767-2
- Futai K. 2013. Pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Annual Review of Phytopathology* 51: 61–83. DOI: 10.1146/annurev-phyto-081211-172910
- Inacio M.L., Nobrega F., Vieira P., Bonifacio L., Naves P., Sousa E., Mota M. 2015. First detection of *Bursaphelenchus xylophilus* associated with *Pinus nigra* in Portugal and in Europe. *Forest Pathology* 45 (3): 235–238. DOI: 10.1111/efp.12162
- Mamiya Y., Kiyohara T. 1972. Description of *Bursaphelenchus lignicolus* n. sp. (Nematoda: Aphelenchoididae) from pine wood and histopathology of nematode-infested trees. *Nematologica* 18 (1): 120–124. DOI: 10.1163/187529272X00296
- Mota M., Braasch H., Bravo M.A., Penas A.C., Burgermeister W., Metge K., Couse E. 1999. First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology* 1 (7): 727–734. DOI: 10.1163/156854199508757
- Tomalak M. 2017. Parasitic association of the mycetophagous wood nematode, *Bursaphelenchus fraudulentus* with the honey fungus *Armillaria ostoyae*. *Forest Pathology* 47 (3): 1–10. DOI: 10.1111/efp.12325
- Tomalak M., Filipiak A. 2021. Effects of inter-specific crossbreeding between the invasive pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* and native *B. mucronatus* on morphology and reproduction of the hybrid offspring. *Forest Pathology* 51 (2): e12676. DOI: 1111/efp.12676