

# Диагностика стеблевой нематоды картофеля *Ditylenchus destructor* в фитосанитарной практике

\* СУДАРИКОВА С.В.<sup>1</sup>, ХУДЯКОВА Е.А.<sup>2</sup>, ЛИМАНЦЕВА Л.А.<sup>3</sup>

<sup>1,2</sup> ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия, 140150

<sup>3</sup> Центр паразитологии Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук (ИПЭЭ РАН), г. Москва, Россия, 119071

<sup>1</sup> e-mail: sudarikovah@mail.ru

<sup>2</sup> e-mail: fer59@mail.ru

<sup>3</sup> e-mail: lutik47@yandex.ru

## АННОТАЦИЯ

Среди более чем 90 видов нематод рода *Ditylenchus* стеблевая нематода лука *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 1936 и стеблевая нематода картофеля *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945 имеют важное экономическое значение для сельскохозяйственных культур. Эти нематоды являются мигрирующими эндопаразитами и полифагами. Наиболее распространен и вредоносен для культуры картофеля на территории нашей страны вид *D. destructor*, который имеет карантинный статус для ряда стран – импортеров российской продукции. Поэтому быстрая и точная его диагностика имеет большое значение для фитосанитарной практики. В международных и региональных диагностических протоколах основное внимание уделяется стеблевой нематоде лука *D. dipsaci*, а для идентификации *D. destructor* представлены достаточно трудоемкие для лабораторий тесты. С целью оптимизации диагностики стеблевой нематоды картофеля *D. destructor* был выбран метод классической полимеразной цепной реакции, предложенный польскими учеными – Arnika Jeszke с соавторами (Jeszke et al., 2013), с универсальным и видоспецифическим праймерами DITuniF/DITdesR, разработанными к участку внутреннего транскрибируемого спейсера 1 (ITS1) и 5.8S рДНК. Тест был апробирован с отечественными коммерческими наборами для выделения ДНК и амплификации, также оптимизирован состав рабочей смеси для получения лучшего результата при работе с этими наборами. В процессе апробации протестированы отечественные картофельные популяции *D. destructor* различного географического происхождения, установлена их принадлежность к гаплотипу Е. Успешно проведена оценка применимости теста. Он рекомендован для проведения исследований в отечественных диагностических лабораториях в области фитосанитарии и карантина растений.

# Diagnosis of potato root nematode *Ditylenchus destructor* in phytosanitary practice

\* STELLA V. SUDARIKOVA<sup>1</sup>, ELENA A. KHUDYAKOVA<sup>2</sup>, LYUDMILA A. LIMANTSEVA<sup>3</sup>

<sup>1,2</sup> FGBU “All-Russian Plant Quarantine Center” (FGBU “VNIIEKR”), Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia, 140150

<sup>3</sup> Center of Parasitology of the A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences (IEE RAS), Moscow, Russia, 119071

<sup>1</sup> e-mail: sudarikovah@mail.ru

<sup>2</sup> e-mail: fer59@mail.ru

<sup>3</sup> e-mail: lutik47@yandex.ru

## ABSTRACT

Among over 90 nematode species of the genus *Ditylenchus*, *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 1936 and *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945 are of great economic importance for agricultural crops. These nematodes are migratory endoparasites and polyphages. The species *D. destructor* is most common and harmful for potato culture in Russia, which has a quarantine status for some countries importing Russian products. Therefore, its rapid and accurate diagnosis is of great importance for phytosanitary practice. International and regional diagnostic protocols focus on *D. dipsaci*, and for the identification of *D. destructor*, quite sophisticated tests for laboratories are presented. In order to optimize the diagnosis of *D. destructor*, the classical polymerase chain reaction method was chosen, proposed by Polish scientists – Arnika Jeszke with co-authors (Jeszke et al., 2013), with universal and species-specific DITuniF/DITdesR primers designed for the region of internal transcribed spacer 1 (ITS1) and 5.8S rDNA. The test was verified with Russian commercial kits for DNA extraction and amplification, and the composition of the working mixture was also optimized to obtain the best result when working with these kits. In the verification process, Russian potato populations of *D. destructor* of various geographic origins were tested, and their belonging to the E haplotype was established. The applicability of the test was assessed successfully. It is recommended for research in Russian diagnostic laboratories for phytosanitary and plant quarantine.

**Ключевые слова.** Фитосанитария, молекулярно-генетические методы, ПЦР, ПДРФ, ITS, гаплотип.

## ВВЕДЕНИЕ



стеблевые нематоды картофеля *Ditylenchus destructor* Thorne и лука *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev наносят большой ущерб урожаю картофеля, лука, чеснока и многим другим видам сельскохозяйственных и декоративных культур (Анисимов и др., 2009; Буторина и др., 2006; Ефременко, Бурштейн, 1972; Зиновьева и др., 2012). В настоящее время идентификация этих видов имеет значение в основном для экспортируемой продукции или семенного и посадочного материала внутри страны. Идентификация морфологическим методом достаточно надежна, но возможна только у взрослых особей, так как строение половых структур является основным диагностическим признаком. Молекулярно-генетические методы дают возможность идентификации и по личиночным стадиям (Subbotin et al., 2005). В международных диагностических протоколах основное внимание уделяется стеблевой нематоде лука *D. dipsaci*, для которой описано 6 молекулярно-генетических методов (полимеразная цепная реакция (ПЦР), полимеразная цепная реакция с анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ)) (МСФМ 27 ДП 8, 2015; РМ 7/87 (2), 2017). В то же время для молекулярной диагностики *D. destructor* рекомендуется ПЦР-ПДРФ или секвенирование внутреннего транскрибируемого спейсера – ITS-участка гена рДНК (Subbotin et al., 2005; Wendt et al., 1993). Метод ПЦР-ПДРФ достаточно трудоемкий, требует наличия полного набора ферментов, рекомендуемых авторами метода, в противном случае трудно с уверенностью идентифицировать вид *D. destructor*, характеризующийся внутривидовой вариабельностью, связанной с изменчивой длиной последовательности ITS1.

В настоящее время известно 7 гаплотипов *D. destructor* (от А до G), которые отличаются по длине и по нуклеотидному составу региона ITS1 (Jeszke et al., 2013). Наиболее подходящим для применения в диагностических лабораториях представляется метод классической ПЦР, предложенный польскими учеными – Arnika Jeszke с соавторами (Jeszke et al., 2013). Ими разработан набор праймеров: 1 универсальный DITuniF к участку 18S рДНК и 2 специфических праймера к участкам ITS1 и 5.8S рДНК – DITdesR для *D. destructor* и DITdipR для *D. dipsaci*. Этот метод был апробирован на популяции *D. destructor* из Московской области и показал положительные результаты (Mahmoudi et al., 2019). Ожидаемые размеры ампликонов для *D. destructor* (в зависимости от гаплотипа): 152–340 пар нуклеотидов (п. н.), для *D. dipsaci* – 148 п. н. Молекулярные маркеры, использованные авторами предложенного метода, позволяют определить все популяции

**Key words.** Phytosanitary, molecular genetic methods, PCR, RFLP, ITS, haplotype.

## INTRODUCTION



*Ditylenchus destructor* Thorne and *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev cause great damage to the crop of potatoes, onions, garlic and many other agricultural and ornamental crops (Anisimov et al., 2009; Butorina et al., 2006; Efremenko, Burshtein, 1972; Zinovieva et al., 2012). At present, the identification of these species is important mainly for exported products or seeds and planting material within the country. Identification by the morphological method is quite reliable, but is possible only in adults, since the reproductive structures are the main diagnostic feature. Molecular genetic methods make it possible to identify by larval stages (Subbotin et al., 2005). International diagnostic protocols focus on *D. dipsaci*, for which 6 molecular genetic methods are described (polymerase chain reaction (PCR), polymerase chain reaction with restriction fragment length polymorphism analysis (PCR-RFLP)) (ISPM 27 DP 8, 2015; RM 7/87 (2), 2017). At the same time, for molecular diagnosis of *D. destructor*, PCR-RFLP or sequencing of the internal transcribed spacer, the ITS region of the rDNA gene, is recommended (Subbotin et al., 2005; Wendt et al., 1993). The PCR-RFLP method is quite laborious, since it requires the full set of enzymes recommended by the authors of the method, otherwise it is difficult to identify with certainty the *D. destructor* species, which is characterized by intraspecific variability associated with the variable length of the ITS1 sequence.

Currently, 7 haplotypes of *D. destructor* are known (from A to G), which differ in length and nucleotide composition of the ITS1 region (Jeszke et al., 2013). The most suitable for use in diagnostic laboratories is the classical PCR method proposed by the Polish scientists – Arnika Jeszke et al. (Jeszke et al., 2013). They developed a set of primers: 1 universal DITuniF to the 18S rDNA region and 2 specific primers to the ITS1 and 5.8S rDNA regions – DITdesR for *D. destructor* and DITdipR for *D. dipsaci*. This method was tested on a *D. destructor* population from Moscow Oblast and showed positive results (Mahmoudi et al., 2019). Expected amplicon sizes for *D. destructor* (depending on haplotype) are 152–340 bp, for *D. dipsaci* – 148 bp. Molecular markers used by the authors of the proposed method make it possible to identify all *D. dipsaci* populations and all *D. destructor* haplotypes, deposited in the GenBank database. It should be noted that in the laboratory diagnosis of nematodes, the availability of the method, its reliability and the time of the study are important. Therefore, the PCR method with specific primers seems to be the most suitable.

The aim of this work was to optimize the molecular genetic diagnosis of *D. destructor*, to select an appropriate method for its use in phytosanitary practice.

*D. dipsaci* и все гаплотипы *D. destructor*, депонированные в базу данных GenBank. Надо отметить, что в лабораторной диагностике нематод важна доступность метода, его достоверность и время проведения исследования. Поэтому самым оптимальным представляется метод ПЦР со специфическими праймерами.

Целью настоящей работы являлась оптимизация молекулярно-генетической диагностики стеблевой нематоды картофеля *D. destructor*, подбор подходящего метода для его применения в фитосанитарной практике.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были проанализированы особи из 11 популяций стеблевой нематоды *D. destructor*, выделенные из картофеля происхождением из Московской, Рязанской, Тульской и Орловской областей.

Подготовлены образцы ДНК *D. destructor* (целевой объект) из шести особей на образец и образцы ДНК трех других видов нематод – *Meloidogyne hapla* и *Rhabditidae* sp., выделенных из клубней и корней картофеля, и *Ditylenchus dipsaci* из земляники (нецелевые объекты). Выделение ДНК проведено набором «ДНК-Экстран-2» (ООО «Синтол», Россия). Инструкция производителя модифицирована путем уменьшения в 2 раза объема реактивов без изменения результата выделения. Оптимизировали состав рабочих смесей для амплификации с применением отечественного коммерческого набора «5x ScreenMix» (ЗАО «Евроген», Россия), увеличен общий объем рабочей смеси до 25 мкл, для анализа брали 2 мкл ДНК и по 1 мкл каждого праймера.

Для проведения ПЦР-ПДРФ по Wendt et al. (1993) использовали следующие универсальные праймеры к региону ITS рДНК:

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

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

Условия амплификации: начальный шаг – 1,5 мин при 96 °C, 30 сек при 50 °C и 4 мин при 72 °C; 40 циклов по 45 сек при 96 °C, 30 сек при 50 °C и 4 мин при 72 °C; и последний шаг – 45 сек при 96 °C, 30 сек при 50 °C и 10 мин при 72 °C.

Размеры ампликонов составляют 1200 п. н. для *D. destructor* и 900 п. н. для *D. dipsaci*. Рестрикция фрагментов проведена одним из ферментов, рекомендуемым авторами метода, – TaqI и ферментом Tru1I. Для рестриктазы TaqI ожидаемые показатели ампликонов: 640, 200, 150 п. н. Состав рабочей смеси: 5x ScreenMix – 5 мкл, ДНК – 2 мкл, 2 праймера – по 1 мкл, H<sub>2</sub>O – 16 мкл.

Для проведения теста классической ПЦР по A. Jeszke et al. (2013) использовали праймеры:

DITuniF CTGTAGGTGAACCTGC (универсальный);

DITdesR GTTTTTCGCCCCACAAATTAGC (специфический к *D. destructor*).

Условия амплификации: денатурация – 3 мин при 95 °C; 35 циклов – 30 сек при 95 °C, 30 сек при 63,5 °C и 30 сек при 72 °C; финальная элонгация – 5 мин при 72 °C. Ожидаемые размеры ампликонов для *D. destructor* (в зависимости от гаплотипа): 152–340 п. н.

Состав рабочей смеси: 5x ScreenMix – 5 мкл, ДНК – 2 мкл, 2 праймера – по 1 мкл, H<sub>2</sub>O – 16 мкл.

В качестве положительного контроля использовали очищенную и подтвержденную

## MATERIALS AND METHODS

Individuals from 11 *D. destructor* populations isolated from potatoes originating from Moscow Oblast, Ryazan Oblast, Tula Oblast and Oryol Oblast were analyzed.

DNA samples of *D. destructor* (target object) were prepared from six individuals per sample and DNA samples from three other nematode species – *Meloidogyne hapla* and *Rhabditidae* sp., isolated from potato tubers and roots, and *Ditylenchus dipsaci* from wild strawberries (non-target objects). DNA extraction was carried out using the DNA-Extran-2 kit (Syntol, Russia). The manufacturer's instructions have been modified by reducing the volume of reagents by a factor of 2 without changing the isolation result. The composition of working mixtures for amplification was optimized using the Russian commercial kit "5x ScreenMix" (Eurogen, Russia), the total volume of the working mixture was increased to 25 µl, 2 µl of DNA and 1 µl of each primer were taken for analysis.

For PCR-RFLP according to Wendt et al. (1993) the following universal primers for the ITS region of rDNA were used:

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

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

Amplification conditions: initial step – 1.5 min at 96 °C, 30 sec at 50 °C and 4 min at 72 °C; 40 cycles of 45 sec at 96 °C, 30 sec at 50 °C and 4 min at 72 °C; and the last step is 45 sec at 96 °C, 30 sec at 50 °C and 10 min at 72 °C.

The amplicons are 1200 bp for *D. destructor* and 900 bp for *D. dipsaci*. Fragment restriction was carried out by one of the enzymes recommended by the authors of the method, TaqI and Tru1I. For restriction TaqI expected amplicons: 640, 200, 150 bp. Composition of the working mixture: 5x ScreenMix – 5 µl, DNA – 2 µl, 2 primers – 1 µl each, H<sub>2</sub>O – 16 µl.

For the classical PCR test according to A. Jeszke et al. (2013) primers were used:

DITuniF CTGTAGGTGAACCTGC (universal);

DITdesR GTTTTTCGCCCCACAAATTAGC (specific to *D. destructor*).

Amplification conditions: denaturation – 3 min at 95 °C; 35 cycles – 30 sec at 95 °C, 30 sec at 63.5 °C and 30 sec at 72 °C; final elongation – 5 min at 72 °C. Expected amplicon sizes for *D. destructor* (depending on haplotype): 152–340 bp.

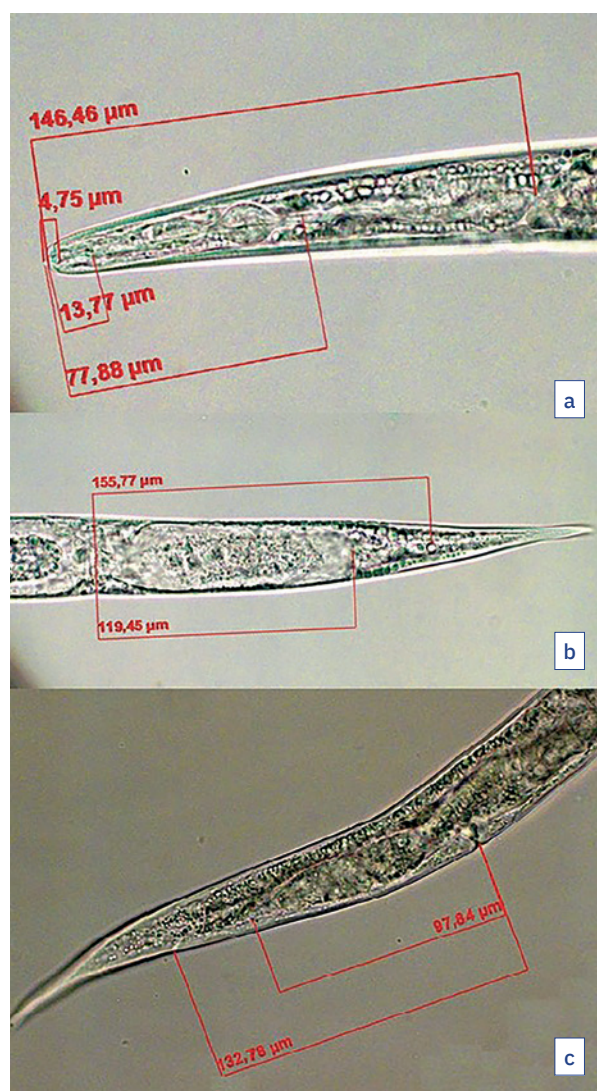
Composition of the working mixture: 5x ScreenMix – 5 µl, DNA – 2 µl, 2 primers – 1 µl each, H<sub>2</sub>O – 16 µl.

Purified and confirmed by sequencing *D. destructor* DNA was used as a positive control from the laboratory collection, while as a negative control – it was deionized water. Amplification was carried out on a CFX96 thermal cycler (Bio-Rad, USA).

## RESULTS AND DISCUSSION

The isolated nematodes being *D. destructor* was confirmed by the morphological method. The morphometric parameters of the studied nematodes (males and females) corresponded to those of *D. destructor* (see Fig. 1). The body length of adults is from 995 to 1610 µm (n = 10); body width – from 27 to 45 µm; stylet length – from 10 to 13.8 µm; tail length – from 65 to





**Рис. 1.** Основные морфометрические признаки нематод вида *D. destructor* на примере популяции, поддерживаемой в культуре лаборатории гельминтологии ИЛЦ\* ФГБУ «ВНИИКР»: а – головной конец взрослой особи *D. destructor*; б – хвостовой конец самки, вентральная сторона; в – хвостовой конец самки, боковая проекция (фото С.В. Судариковой)

**Fig. 1.** The main morphometric features of *D. destructor* nematode on the example of a population maintained in the culture of the Helminthology Laboratory of Testing Laboratory Center, FGBU “VNIICR”: а – the head end of an adult *D. destructor*; б – the tail end of the female, ventral side; в – the tail end of the female, lateral projection (photo by S.V. Sudarikova)

секвенированием ДНК *D. destructor* из коллекции лаборатории, в качестве отрицательного контроля – деионизированную воду. Амплификацию проводили на термоциклере CFX96 (Bio-Rad, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Принадлежность выделенных нематод к виду *D. destructor* подтверждена морфологическим методом. Морфометрические параметры исследуемых нематод (самцов и самок) соответствовали *D. destructor* (см. рис. 1). Длина тела взрослых особей – от 995 до 1610 мкм ( $n = 10$ ); ширина тела – от 27 до 45 мкм; длина стилета – от 10 до 13,8 мкм; длина

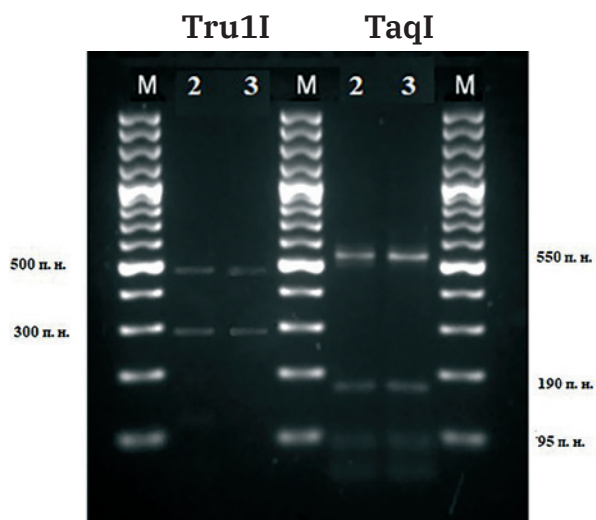
81 мкм; average values:  $a = 36$ ;  $b = 6.5$ ;  $c = 17$ . The esophageal glands overlap the intestines from the dorsal side. Males have a bursa that does not reach the tail apex. In females, the posterior uterus is more than half the length of the distance “vulva – anus”.

As a result of PCR-RFLP with the target species using universal primers according to Wendt et al. a 1200 bp fragment was obtained. The fragment was sequenced, and its belonging to the *D. destructor* species was confirmed using the GenBank database (Mahmoudi et al., 2019). As a result of its restriction with the TaqI enzyme recommended by the authors, fragments of 550, 190, and 95 bp were obtained instead of the expected 640, 200 and 150 bp (see Fig. 2). This difference is likely due to intraspecific variation in *D. destructor*. Restriction with the Tru1I enzyme resulted in the formation of 2 fragments 500 and 300 bp in length.

The method is quite laborious, requires additional testing on *D. destructor* populations in Russia, and is currently not recommended as the main one in a diagnostic laboratory. However, this analysis is promising for studying the intraspecific polymorphism of the species.

As a result of PCR with DITuniF/DITdesR primers, a 209 bp fragment was amplified for *D. destructor* DNA samples from all studied populations, which corresponds to haplotype E (see Fig. 3.) (Jeszke et al., 2013).

When studying non-target species by PCR with these primers, no amplification was observed. The applicability of this method was assessed: sensitivity – 1 individual of the nematode, DNA was detected even when the stock solution was diluted 1 : 100. Specificity and repeatability were 100%.



**Рис. 2.** Результаты электрофореза фрагментов рестрикции ампликона, полученного с помощью пары универсальных праймеров 18S/26S ферментами TaqI и Tru1I: образцы 2, 3 – популяции *D. destructor* из Московской области; М – маркер молекулярного веса 100–3000 п. н. (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder)

**Fig. 2.** The electrophoresis results of the restriction amplicon fragments obtained using a pair of universal primers 18S/26S with TaqI and Tru1I enzymes: samples 2, 3 – populations of *D. destructor* from Moscow Oblast; M – 100–3000 bp molecular weight marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder)

\* Испытательный лабораторный центр ФГБУ «ВНИИКР».

хвоста – от 65 до 81 мкм; средние значения:  $a = 36$ ;  $b = 6,5$ ;  $c = 17$ . Пищеводные железы налегают на кишечник с дорсальной стороны. У самцов присутствует бурса, не достигает кончика хвоста. У самок задняя матка больше половины длины расстояния «вульва – анус».

В результате проведения ПЦР-ПДРФ с целевым видом с использованием универсальных праймеров по Wendt et al. получен фрагмент 1200 п. н. Фрагмент секвенирован, подтверждена его принадлежность к виду *D. destructor* с использованием базы данных GenBank (Mahmoudi et al., 2019). В результате его рестрикции, проведенной рекомендуемым авторами ферментом TaqI, получены фрагменты размеров 550, 190 и 95 п. н. вместо ожидаемых 640, 200 и 150 п. н. (см. рис. 2). Вероятно, эта разница связана с внутривидовыми вариациями *D. destructor*. При рестрикции ферментом Tru1I образовались 2 фрагмента длиной 500 и 300 п. н.

Метод достаточно трудоемок, требует дополнительной отработки на отечественных популяциях *D. destructor* и в настоящее время не рекомендуется в качестве основного в диагностической лаборатории. Однако, этот анализ перспективен для изучения внутривидового полиморфизма вида.

В результате ПЦР с праймерами DITuniF/DITdesR для образцов ДНК *D. destructor* всех исследуемых популяций амплифицирован фрагмент размером 209 п. н., что соответствует гаплотипу E (см. рис. 3) (Jeszke et al., 2013).

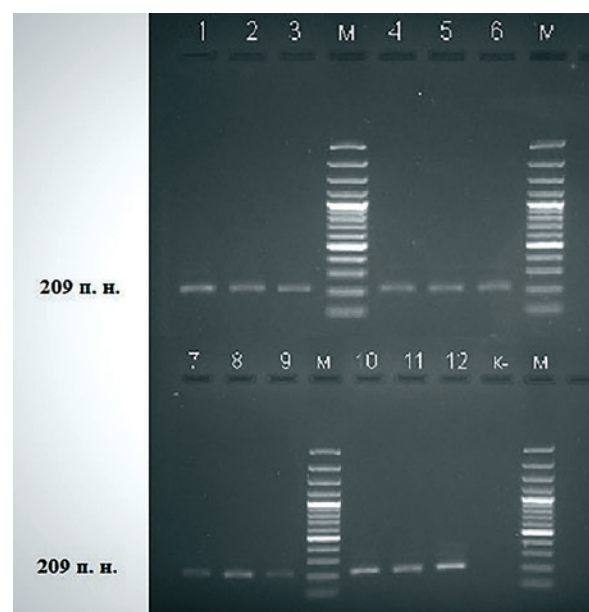
При исследовании нецелевых видов методом ПЦР с этими праймерами амплификации не прошло. Проведена оценка применимости данного метода: чувствительность – 1 особь нематоды, ДНК выявлялась даже при разведении исходного раствора 1 : 100. Специфичность и повторяемость составили 100%.

Следует отметить, что при проведении дуплексной ПЦР с праймерами DITuniF/DITdesR/DITdipR возможна амплификация очень близких по размеру фрагментов для *D. dipsaci* и гаплотипа A *D. destructor* – 148 и 152 п. н., что не дает возможность дифференцировать исследуемые виды без последующего секвенирования, которое повышает трудоемкость метода. Рекомендуется проводить ПЦР отдельно с парами праймеров DITuniF/DITdesR и DITuniF/DITdipR для идентификации этих двух видов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для проанализированных отечественных популяций *Ditylenchus destructor* определена принадлежность к гаплотипу E. Определен размер фрагментов при применении ПЦР-ПДРФ по Wendt et al. (1993) для данного гаплотипа E: для фермента TaqI – 550, 190 и 95 пар нуклеотидов; Tru1I – 500 и 300 пар нуклеотидов.

Метод ПЦР для идентификации *Ditylenchus destructor* с парой праймеров DITuniF/DITdesR, предложенный Jeszke et al. (2013), оптимизирован для использования с отечественными коммерческими наборами. Успешно проведена оценка применимости теста. Он рекомендован для проведения исследований в отечественных диагностических лабораториях в области фитосанитарии.



**Рис. 3.** Результаты ПЦР с праймерами для *D. destructor* (DITuniF/DITdesR): образцы *D. destructor*: 1–3 – Московская область; 4–6 – Тульская область; 7–9 – Рязанская область; 10, 11 – Орловская область; 12 – положительный контроль; K- – отрицательный контроль; M – маркер молекулярного веса 100–3000 п. н. (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder)

**Fig. 3.** PCR results with primers for *D. destructor* (DITuniF/DITdesR): *D. destructor* samples: 1–3 – Moscow Oblast; 4–6 – Tula Oblast; 7–9 – Ryazan Oblast; 10, 11 – Oryol Oblast; 12 – positive control; K- – negative control; M – 100–3000 bp molecular weight marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder)

It should be noted that when performing duplex PCR with primers DITuniF/DITdesR/DITdipR, it is possible to amplify fragments very similar in size for *D. dipsaci* and *D. destructor* haplotype A – 148 and 152 bp, which makes it impossible to differentiate the studied species without subsequent sequencing, which increases the complexity of the method. It is recommended that PCR should be performed separately with primer pairs DITuniF/DITdesR and DITuniF/DITdipR to identify these two species.

## CONCLUSION

Haplotype E was determined for the studied Russian populations of *Ditylenchus destructor*. Fragment size was determined using PCR-RFLP according to Wendt et al. (1993) for this haplotype E: for the TaqI enzyme, 550, 190, and 95 bp; Tru1I – 500 and 300 bp.

PCR method for identification of *Ditylenchus destructor* with primer pair DITuniF/DITdesR proposed by Jeszke et al. (2013), optimized for use with Russian commercial kits. The applicability of the test was assessed successfully. It is recommended for research in Russian diagnostic laboratories in the field of phytosanitary.

## REFERENCES

1. Efremenko V.P., Burshtein Kh.S. Potato stem nematode and control measures in the Lithuanian SSR



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ефременко В.П., Бурштейн Х.С. Стеблевая нематода картофеля и меры борьбы с ней в Литовской ССР // В сб.: Нематодные болезни сельскохозяйственных культур и меры борьбы с ними. 1972. С. 97–98.
2. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков / Анисимов Б.В., Белов Г.Л., Варицев Ю.А., Еланский С.Н., Журомский Г.К., Завриев С.К., Зейрук В.Н., Иванюк В.Г., Кузнецова М.А., Пляхневич М.П., Пшеченков К.А., Симаков Е.А., Склярова Н.П., Стасhevски З., Усков А.И., Яшина И.М. // Картофелевод. 2009. 272 с.
3. МСФМ 27 ДП 8: *Ditylenchus dipsaci* и *Ditylenchus destructor* (2015).
4. Прикладная нематология / Буторина Н.Н., Зиновьева С.В., Кулинич О.А. и др.; [отв. ред. Зиновьева С.В., Чижов В.Н.]; Ин-т паразитологии РАН. – М.; Наука, 2006. 350 с.: – ISBN 5-02-034307-2 (в пер.).
5. Фитопаразитические нематоды России / Зиновьева С.В., Чижов В.Н., Приданников М.В., Субботин С.А., Рысс А.Ю., Хусаинов Р.В. // Товарищество научных изданий КМК. 2012. С. 242–248.
6. A comparative and phylogenetic study of the *Ditylenchus dipsaci*, *Ditylenchus destructor* and *Ditylenchus gigas* populations occurring in Poland (Short Communication) / Jeszke A., Budziszewska M., Dobosz R., Stachowiak A., Protasewicz D., Wieczorek P. & Obrepalska-Stęplowska A. // Journal of Phytopathology. 2013. 162: 61–67.
7. Molecular diagnostics, taxonomy and phylogeny of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* species complex based on the sequences of the ITS-rDNA / Subbotin S.A., Madani M., Krall E., Sturhan D. & Moens M. // Phytopathology. 2005. 95: 1308–1315.
8. Molecular identification of *Ditylenchus destructor* nematode with PCR Species-Specific primers in the Moscow region / Mahmoudi N., Naserzadeh Y., Pakina E.N., Limantseva L.A., Nejad D.K. // RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries. 2019. 14 (4): 430–436.
9. PM 7/87 (2) *Ditylenchus destructor* and *Ditylenchus dipsaci* (2017) // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 2017. 47 (3), 401–419.
10. Wendt K.R., Vrain T.C. & Webster J.M. Separation of three species of *Ditylenchus* and some host races of *D. dipsaci* by restriction fragment length polymorphism // Journal of Nematology. 1993. 25: 555–563.

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

**Сударикова Стелла Валериевна**, старший научный сотрудник лаборатории гельминтологии ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; e-mail: sudarikovah@mail.ru.

**Худякова Елена Анатольевна**, старший научный сотрудник лаборатории гельминтологии ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; e-mail: fer59@mail.ru.

**Лиманцева Людмила Алексеевна**, старший научный сотрудник Центра паразитологии ИПЭЭ РАН, г. Москва, Россия; e-mail: lutik47@yandex.ru.

[Steblevaya nematoda kartofelya i mery borby s neyu v Litovskoy SSR] // In: Nematode diseases of agricultural crops and control measures. 1972; 97–98. (In Russ.)

2. Protection of potatoes from diseases, pests and weeds [Zashchita kartofelya ot bolezney, vreditel'ey i sornyakov] / Anisimov B.V., Belov G.L., Varitsev Yu.A., Elansky S.N., Zhuromsky G.K., Zavriev S.K., Zeiruk V.N., Ivanyuk V.G., Kuznetsova M.A., Plyakhnevich M.P., Pshechenkov K.A., Simakov E.A., Sklyarova N.P., Stashevsky Z., Uskov A.I., Yashina T.H. // Potato grower. 2009; 272. (In Russ.)

3. ISPM 27 DP 8: *Ditylenchus dipsaci* and *Ditylenchus destructor* (2015).

4. Applied nematology / Butorina N.N., Zinovieva S.V., Kulinich O.A. and etc.; [res. ed. Zinovieva S.V., Chizhov V.N.]; Institute of Parasitology RAS. – M.; Nauka, 2006. 350 p.: – ISBN 5-02-034307-2 (in transl.). (In Russ.)

5. Phytoparasitic nematodes of Russia [Fitoparaziticheskiye nematody Rossii] / Zinovieva S.V., Chizhov V.N., Pridannikov M.V., Subbotin S.A., Ryss A.Yu., Khusainov R.V. // Association of scientific publications KMK. 2012; 242–248. (In Russ.)

6. A comparative and phylogenetic study of the *Ditylenchus dipsaci*, *Ditylenchus destructor* and *Ditylenchus gigas* populations occurring in Poland (Short Communication) / Jeszke A., Budziszewska M., Dobosz R., Stachowiak A., Protasewicz D., Wieczorek P. & Obrepalska-Stęplowska A. // Journal of Phytopathology. 2013. 162: 61–67.

7. Molecular diagnostics, taxonomy and phylogeny of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* species complex based on the sequences of the ITS-rDNA / Subbotin S.A., Madani M., Krall E., Sturhan D. & Moens M. // Phytopathology. 2005. 95: 1308–1315.

8. Molecular identification of *Ditylenchus destructor* nematode with PCR Species-Specific primers in the Moscow region / Mahmoudi N., Naserzadeh Y., Pakina E.N., Limantseva L.A., Nejad D.K. // RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries. 2019. 14 (4): 430–436.

9. PM 7/87 (2) *Ditylenchus destructor* and *Ditylenchus dipsaci* (2017) // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 2017. 47 (3), 401–419.

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

## INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Stella Sudarikova**, Senior Researcher, Helminthology Laboratory of Testing Laboratory Center, FGBU “VNIICR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; e-mail: sudarikovah@mail.ru.

**Elena Khudyakova**, Senior Researcher, Helminthology Laboratory of Testing Laboratory Center, FGBU “VNIICR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; e-mail: fer59@mail.ru.

**Lyudmila Limantseva**, Senior Researcher, Center of Parasitology of the A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences (IEE RAS), Moscow, Russia; e-mail: lutik47@yandex.ru.