

ПРИКЛАДНІ ПРОБЛЕМИ ВИЯВЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЇ ЗОЛОТИСТОЇ КАРТОПЛЯНОЇ НЕМАТОДИ

А.Г. БАБИЧ, кандидат сільськогосподарських наук, Національний
університет біоресурсів і природокористування України,
E-mail: nubipbabich@gmail.com

Р.Д. СУХАРЕВА, кандидат біологічних наук, УкрНДСКР ІЗР НААН України

О.А. БАБИЧ, кандидат біологічних наук, Національний університет
біоресурсів і природокористування України, E-mail: nubipbabich@gmail.com

І.В. ПРИХОДЬКО, аспірант, Національний університет біоресурсів
і природокористування України

Анотація. В Україні золотиста картопляна нематода – об'єкт внутрішнього карантину рослин поширена переважно на присадибних ділянках, значно рідше в колективних господарствах. Виявлення її осередків, особливо на початкових етапах заселення угідь досить ускладнено, оскільки типові ознаки ураження – глободерозом (відставання в рості й розвитку, хлорози, в'янення листя тощо) візуально проявляються лише після накопичення високої щільності популяції в результаті багаторічного вирощування пасльонових культур у монокультурі чи з мінімальними перервами між повторним їх розміщенням. Для удосконалення методів моніторингу золотистої картопляної нематоди апробовані різні схеми обстеження: по діагоналі, методом трикутника та конверту. Встановлено, що вищу ймовірність виявлення заселеності угідь золотистою картопляною нематодою забезпечує відбір ґрунтових зразків за методом конверту. Водночас порівняно з іншими схемами моніторингу, досягається більш рівномірне охоплення обстеженої площі.

Сучасні методи флотації забезпечують високу ефективність виділення цист з ґрунту, доведеного до повітряно-сухого стану. Однак, зразки ґрунту, відібрані з вантажів підкарантинної продукції, часто потребують проведення експрес аналізу. Встановлено, що з підвищенням рівня вологості зразків ґрунту, спостерігалася тенденція до зниження частки виділення цист нематод. Тому, для досягнення вищої ефективності виділення цист нематод, слід застосовувати насичений розчин кухонної солі NaCl із розрахунку 50 грам на 1 літр води.

Визначення видового складу цистоутворюючих нематод картоплі доцільно проводити за комплексом морфометричних показників, біологічними особливостями (використанням сортів-диференціаторів) та біохімічними відмінностями. Однак, зважаючи на нинішню високу вартість біохімічних методів діагностування, їх слід застосовувати першочергово для ідентифікації карантинних

та нових для науки видів цистоутворюючих нематод. Зокрема, методом ізоелектричного фокусування білків в поліакриламідному гелі підтверджено належність цист, відібраних з осередків Закарпаття, до одного виду – золотистої картопляної цистоутворюючої нематоди *Globodera rostochiensis* (патотипу Ro1).

Ключові слова: золотиста картопляна нематода, глободероз картоплі, методи виявлення, зразки ґрунту, виділення цист, ідентифікація видів.

Актуальність.

Золотиста картопляна нематода (ЗКН) *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923) Behrens, 1975 є одним із найбільш небезпечних шкідливих організмів картоплі та інших пасльонових культур (ЕРРО, 2013).

Батьківщиною походження картопляної глободери вважають Андське передгір'я Південної Америки, звідки наприкінці XVIII століття вона була завезена в Європу, імовірно з посадковим матеріалом.

Нині золотиста картопляна нематода поширена в 36 країнах Європи, 12 – Азії, 6 – Африки, 3 – Північної Америки, 1 – Центральної Америки й Карибського регіону, 6 – Південної Америки, 3 – Океанії.

В Україні золотисту картопляну нематоду *G. rostochiensis* (Wollenweber, 1923; Behrens, 1975) уперше було виявлено в 1963 році на Всесоюзній науково-дослідній станції по раку картоплі Чернівецької області. Однак, незважаючи на запровадження карантинних заходів, запобігти її подальшому розселенню в нові регіони не вдалося. Так, в 1980 році осередки фітопаразита було зареєстровано в 11 областях на загальній площі 534,35 гектарів, а станом на 1 січня 1990 року площа заселення збільшилася до 4708,46 гектарів. На початок 2011 року осередки золотистої картопляної нематоди були зареєстровані у Вінницькій, Волин-

ській, Житомирській, Закарпатській, Івано-Франківській, Київській, Луганській, Львівській, Одеській, Рівненській, Сумській, Тернопільській, Харківській, Хмельницькій, Черкаській, Чернівецькій і Чернігівській областях в 1124 населених пунктах 126 районів 17 областей України на загальній площі 4951,0558 гектарів (Babych, A., Babych, A., Suhareva, R., Statkevich, A., 2014).

В Україні ЗКН поширена переважно на присадибних ділянках, рідше в колективних господарствах. Основною причиною такого стану є багаторічне вирощування картоплі в монокультурі та її безконтрольна реалізація, недотримання сівозмін чи неможливість їхнього практичного впровадження, відсутність ефективних нематодцидів тощо. Так, в 1995 році площа заселення золотистою картопляною нематодою в індивідуальних господарствах складала 86 % від загальної інвазійної (2167,1 га), у 2007 році майже 95 % (від 5669,07 га), а нині понад 97 %.

Найбільші площі осередків глободерозу виявлено у Львівській, Волинській, Житомирській, Чернігівській, Сумській, Тернопільській та Хмельницькій областях. Однак, з огляду на те, що діагностування дуже низької вихідної чисельності популяції ускладнене, припускаємо, що фактична зона її поширення є значно більшою порівняно з офіційно зареєстрованою.

Розселення ЗКН відбувається в основному антропогенним шляхом, а саме, цисти можуть переноситися зараженим ґрунтом, знаряддями обробітку ґрунту, транспортними засобами, садивним матеріалом, а також водою, вітром тощо (Shesteporov A. A., Lukyanova E. A., 2018).

Для запобігання подальшого розселення, необхідно проводити систематичний моніторинг пасльонових культур, особливо в прикордонних областях. Тому, вдосконалення сучасних і розробка нових методів моніторингу глободерозу залишається однією з найбільш актуальних задач сьогодення.

Для виявлення цистоутворюючих нематод в агроценозах та встановлення щільності їхніх популяцій застосовують різні схеми маршрутних обстежень (по діагоналі, методом трикутника, конверта, човника тощо). Оскільки, єдиної загальноприйнятої схеми відбору проб немає, тому науковці і спеціалісти служби карантину рослин постійно працюють над їхнім удосконаленням.

В Україні розроблено стандартні методики (ДСТУ 3355-96 та ДСТУ 3344-96) відбору зразків ґрунту та бульб картоплі.

Фітосанітарне обстеження насаджень картоплі рекомендовано проводити у фазу цвітіння, коли на коренях рослин, навіть без засобів оптики, можливо, діагностувати наявність новоутворених самиць, білих за кольором на початкових фазах онтогенезу (Sukhomlin, K. B., Koshirets, V. M., Zinchenko, et al., 2019).

Визначення патотипів ЗКН здійснюють методом біотестування із використанням стандартних рослин-диференціаторів.

Для виділення цист нематоди із ґрунтових зразків застосовують різні способи: Фенуїка, Кірхнера, Віль-

ке Бойнаке, флотаційно-лійковий та ін. Однак, постійно з'являються нові, більш досконалі пристрої. Зокрема, для виділення цист нематод із ґрунту спеціалістами Української науково-дослідної станції карантину рослин розроблено апарат «РУТА».

Ідентифікацію цистоутворюючих нематод картоплі здійснюють за трьома основними критеріями: комплексом морфометричних показників; біологічними особливостями (використанням сортів-диференціаторів) та біохімічними відмінностями.

Нині для ідентифікації розроблено також низку інших методів: ПЛР-аналіз, використання моноклональних антитіл у якості діагностичних процедур, серологічні методи ідентифікації тощо (Christoforou M., Pantelides, I.S., Kanetis, L., et al., 2014).

Проте, останнім часом, учені схиляються до думки, що достовірне визначення видового складу цистоутворюючих нематод можливе лише за поєднання різних методів: ПЛР-аналізу з морфо-анатомічною ідентифікацією та біотестуванням (Duceppe, MO., Lafond-Lapalme, J., Palomares-Rius, J.E. et al., 2017).

Метою дослідження було удосконалення методів виявлення, виділення та ідентифікації золотистої картопляної нематоди – об'єкта внутрішнього карантину рослин.

Матеріали і методи дослідження.

Обстеження полів, присадибних ділянок і відбір зразків ґрунту проводили за загальноприйнятими методиками (Shesteporov A. A., Lukyanova E. A., Bondarev A. A., 2019).

Вихідну (допосадкову) та післязбиральну щільність популяції

ЗКЦН встановлювали за кількістю личинок та яєць у цистах, виділених флотаційно-лійковим методом зі 100 см³ ґрунту. Життєздатність личинок та яєць у цистах визначали за допомогою їхнього забарвлення 0,05 % розчином малахітової зелені та візуально під мікроскопом за формою тіла і станом внутрішніх органів личинок (Pridannikov, M.V., Petelina, G.G., Palchuk, et al., 2007).

Анально-вувлярні пластинки цист виготовляли за загальноприйнятою методикою. Дослідження структури анально-вувлярної області самиць проводили за великого збільшення під мікроскопом, а також із використанням імерсійної системи. Здатних до міграції личинкові стадії глободер виділяли модифікованим методом Бермана.

Морфологічні та морфометричні показники личинок II віку, самців вивчали на тимчасових водно-гліцеринових препаратах із використанням мікроскопів МБІ-3, МБІ-15. Фіксування нематод здійснювали ТАФом.

Для удосконалення методів виявлення КЦН в агроценозах проводили відбір ґрунтових проб нематологічним буром за різними схемами маршрутів (по діагоналі, методом трикутника та конверту).

Додатково також вивчали ефективність виділення цист залежно від рівня вихідної заселеності ґрунту та його зволоження. Повторність польових дослідів чотирикратна, лабораторно-вегетаційних – восьми-десятикратна.

Для визначення видової належності картопляних цистоутворюючих нематод апробовано біохімічний метод – ізоелектрофокусування білків у пластинах поліакриламідного гелю (С-3 %, Т-5 %) з амфолітом в інтервалі рН 3.0-10.0 з деякими модифікаціями (Karelov, A.V., Pylypenko, L.A.,

Kozub, N.O. et al., 2013). В основі методу – принцип розділення білків ізоелектричними точками у градієнті рН. Цисти КН для біохімічних досліджень замочували в дистильованій воді на 48 годин, після чого розтирали в мікрогомогенізаторі з 40 мл води та залишали на 20 годин у морозильній камері. Після відтавання екстракт цист – 25 мл поміщали в лунки аплікатора (Back, M., Haydock, P. and Jenkinson, P., 2006). Ізоелектрофокусування білків проб проводили на приладі АГГЕ-3 фірми «Хайу Калур» на охолоджуючому столику за напруги 600 вольт упродовж 2 годин і силі струму 15 міліампер. Білкові спектри нематод виявляли після відмивки гелю від амфолітів, з одночасною їхньою фіксацією розчином трихлороцтової кислоти, етанолу, води в співвідношенні 10 : 25 : 65. Після ізоелектричного фокусування білків гель інкубували впродовж 1 години за 37 °С у 0,1 М фосфатному буфері з 0,025 % а – нафтилацетатом. Фарбування білкових спектрів і їхню відмивку від надлишку фарби (0,0С 5 % розчин кумасі синій R-250) проводили відповідно розчином оцтової кислоти, етанолу і води (10 : 25 : 65) (Sudha, R., Venkatasalama, E.P., Bairwa, A., et al., 2016). Фарбування естеразних зон здійснювали 0,1 % водним розчином міцного синього РР упродовж години. Фіксацію ізоферментного спектру естераз проводили розчином оцтової кислоти, етанолу і води (10 : 25 : 65) (Subbotin S.A., Vera I.C.D., Mundo-Ocampo M., Baldwin J.G., 2011).

Результати дослідження та їх обговорення.

Виявлення осередків глободерозу, особливо на початкових етапах заселення угідь досить ускладнено,

оскільки типові ознаки ураження (відставання в рості та розвитку, хлорози, в'янення листя, а за дуже високої щільності й загибель рослин) візуально проявляються лише після багаторічного вирощування пасльонових культур у монокультурі або з мінімальними перервами.

За таких умов вищу ймовірність їхнього виявлення забезпечує відбір ґрунтових зразків, першочергово з потенційно заселених карантинними організмами ділянок. Однак за проведення нематологічних обстежень виникають певні протиріччя, які потребують вирішення, зокрема, досягнення достовірного визначення рівня заселеності ґрунту за мінімально необхідної кількості відібраних зразків.

Для удосконалення методів моніторингу золотистої картопляної нематоди нами апробовані різні схеми маршрутів: по діагоналі, методом трикутника та конверту. Встановлено, що найбільшу ймовірність виявлення ЗКН забезпечував метод конверту з відбиранням 4 виїмок ґрунту на 5 погонних метрів маршруту (рис. 1).

Водночас, порівняно з іншими схемами моніторингу, досягається більш рівномірне охоплення площі

ділянок із меншими інтервалами між відбором певних зразків. Апробація цього методу засвідчила доцільність його практичного застосування фахівцями карантинних інспекцій для виявлення осередків золотистої картопляної нематоди (табл. 1).

Отримані результати досліджень (табл. 2) засвідчили, що рекомендований метод Держстандарту виділення цист зі 100 см³ ґрунту забезпечує ймовірність виявлення цист лише у випадку надходження великих партій (завдяки збільшенню загального об'єму наважок ґрунту) або вантажів із високим рівнем інвазованості рослинної продукції.

Встановлено, що за наявності в 300 см³ ґрунту однієї цисти стандартним флотаційним методом досягалося її виділення лише в 3 % випадків. За вихідної заселеності – 5 цист /300 см³ ґрунту вірогідність виділення традиційним флотаційним методом становила 37 %. За рівня заселеності ґрунту – 15 цист ймовірність їхнього виявлення досягала 87 %. За умови збільшення наважки ґрунту до 800 см³ вірогідність виявлення 1 цисти в пробі становила відповідно 15 %, 5 – 72 %, а 15 цист – 96 %. Отже, для запобігання

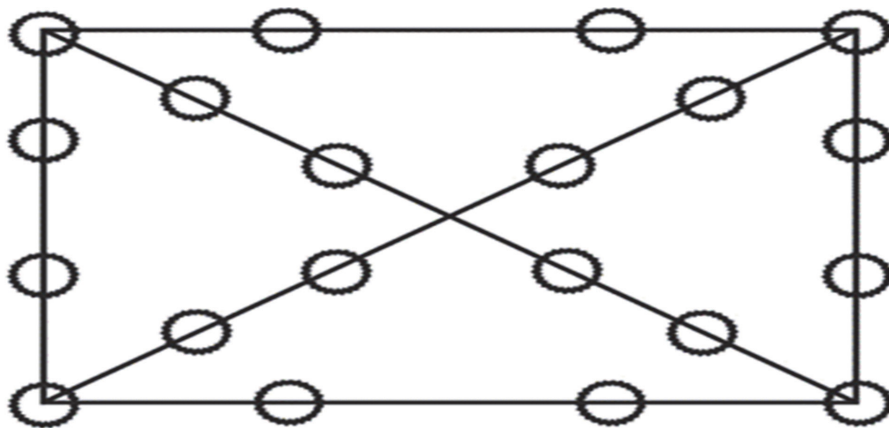


Рис. 1. Відбір ґрунтових зразків за схемою конверта

1. Ефективність виявлення заселеності ґрунту золотистою картопляною нематодою залежно від схеми відбору зразків

№ п/п	Схема відбору	Кількість цист, екз./100 см ³ ґрунту				
		1	2	3	4	Середнє
м. Рахів Закарпатської області						
1.	Діагоналі	40	20	70	17	36,8
2.	Трикутника	16	53	88	104	65,3
3.	Конверта	43	166	250	420	219,7
м. Маневичі Волинської області						
1.	Діагоналі	32	96	193	172	123,2
2.	Трикутника	24	39	65	108	59,0
3.	Конверта	47	243	281	351	230,5

розселення цист ЗКН із підкарантинною продукцією доцільно для аналізу відбирати й аналізувати зразки загальним об'ємом – 800 см³ ґрунту.

Усі наявні нині методи базуються на виділенні цист із ґрунту доведеного до повітряно-сухого стану. Однак, зразки ґрунту, відібрані з вантажів підкарантинної продукції часто потребують проведення експрес аналізу. Тому, для визначення ефективності виділення цист залежно від рівня зволоженості ґрунту нами були проведені спеціальні дослідження.

Встановлено, що з підвищенням рівня вологості відібраних зразків

ґрунту, спостерігалася тенденція до зниження частки їхнього виділення (табл. 3). Так, за 5 % вологості ґрунту флотаційним методом виділялося приблизно 97 % цист, а за 15,5 %, відповідно – 85 %. Тому, метою наших досліджень було підібрати економічно доступні речовини, які здатні забезпечити підвищення рівня виділення цист із вологого ґрунту.

У результаті проведених досліджень було встановлено, що найдоцільніше для цієї мети застосовувати насичений розчин кухонної солі NaCl із розрахунку 50 грам на 1 літр води (табл. 3).

2. Вірогідність виявлення цист золотистої картопляної нематоди залежно від об'єму ґрунтової проби

№ п/п	Кількість цист в 300 см ³ ґрунту	Вірогідність виявлення цист, %	
		Метод Держстандарту, 100 см ³ ґрунту	Збільшена вибірка до 800 см ³ ґрунту
1.	1	3	15
2.	3	19	28
3.	5	37	72
4.	7	53	81
5.	10	70	90
6.	15	87	96

3. Вплив вологості ґрунту на виділення цист картопляних нематод за методом Кірхнера

№ п/п	Вологість ґрунту в %	Вірогідність виділення, %	
		Рекомендований спосіб, %	При додаванні NaCl (50 гр/1л H ₂ O), %
1.	5,0	97	100
2.	10,0	90	99
3.	15,5	85	94
4.	24,0	73	90
5.	36,0	65	86

Традиційно цистоутворюючих нематод ідентифікують за комплексом морфологічних і біологічних особливостей та здатністю до розмноження на нематодостійких сортах. Однак, визначення видів і патотипів цими методами є досить складним і тривалим за часом процесом та вимагає певних практичних навичок. Тому, в останні роки для ідентифікації глободер почали застосовувати різні біохімічні методи.

Нашим завданням було оцінити можливість практичного використання методу ізоелектричного фокусування для ідентифікації цист золотистої картопляної нематоди.

У результаті проведених досліджень методом ізоелектричного фо-

кусування білків в поліакриламідному гелі встановлено (рис. 2.), що білкові спектри (паспорти) цист відібраних з осередків Закарпаття вказують на їхню ідентичність і належність до одного виду *G. rostochiensis* (патотипу Ro₁) – золотистої картопляної цистоутворюючої нематоди, що також було підтверджено морфо-анатомічними та біологічними дослідженнями.

Водночас, зважаючи на нинішню економічну затратність проведення біохімічних методів, вважаємо за доцільне їхнє застосування першочергово для діагностування карантинних та нових для науки видів цистоутворюючих нематод.

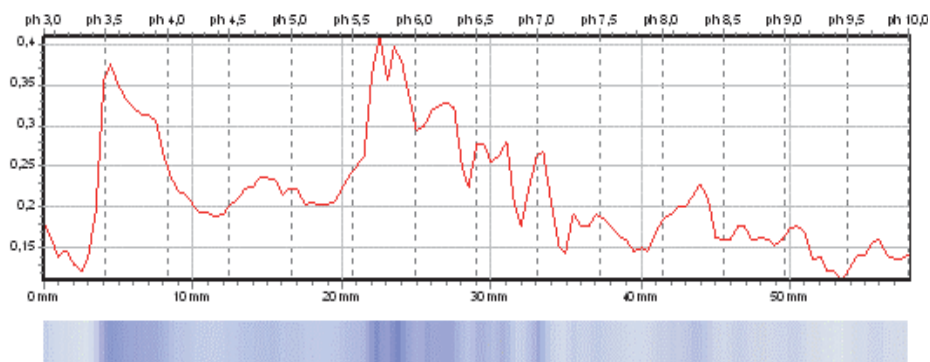


Рис. 2. Білковий паспорт цист золотистої картопляної нематоди із осередків Закарпатської області

Висновки та перспективи

1. Найбільшу ймовірність виявлення осередків золотистої картопляної нематоди забезпечував відбір зразків ґрунту за методом конверту.
2. Для запобігання розселення карантинних видів нематод, особливо із садивним матеріалом, варто відбирати й аналізувати на наявність цист зразки ґрунту загальним об'ємом – 800 см³.
3. Використання насиченого розчину кухонної солі NaCl із розрахунку 50 грам на 1 літр води забезпечує підвищення ефективності виділення цист із вологого ґрунту флотаційним методом.
4. Біохімічні методи доцільно застосовувати першочергово для ідентифікації карантинних та нових для науки видів цистотворюючих нематод.

References

1. EPPO. (2013). *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. PM 7/40 (3). OEPP/EPPO Bull., 43, 119-138. <https://doi.org/10.1111/epp.12025>
2. Babych, A. G., Babych, A. A., Suhareva, R. D., & Statkevich, A. A. (2014). Effect of crop rotation on the abundance of golden potato nematode. *Plant protection and quarantine*, 1, 42-45. <https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-sevooborota-na-chislennost-zolotistoy-kartofelnoy-nematody/viewer>
3. Shesteporov A. A., Lukyanova E. A. (2018). Foundations and methods of modeling of projected growth potato globoderosis on agrometeorological conditions. *Rosiyskiy parazitologicheskii zhurnal*, 12(2), 95–103. <https://doi.org/10.31016/1998-8435-2018-12-2-95-103>
4. Sukhomlin, K. B., Koshirets, V. M., Zinchenko, M. O., Biletskiy, Y. V., & Zinchenko, O. P. (2019). The current state of the pop-

- ulation of the golden potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* (Nematoda, Heteroderidae) in the northwest of Ukraine. *Biosystems Diversity*, 27(1), 33–38. doi:10.15421/011905
5. Christoforou M., Pantelides, I.S., Kanetis, L., Ioannou, N. (2014). Rapid detection and quantification of viable potato cyst nematodes using qPCR in combination with propidium monoazide. *Plant Pathology*, 63, 1185-1192.
6. Duceppe, MO., Lafond-Lapalme, J., Palomares-Rius, J.E. et al. (2017). Analysis of survival and hatching transcriptomes from potato cyst nematodes, *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Sci Rep* 7, 3882. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03871-x>
7. Shesteporov A. A., Lukyanova E. A., Bondarev A. A. (2019). Application the Hassell model for prediction the population density of golden nematode of potato after growing *Globodera* resistant variety of potato. *Russian Journal of Parasitology*, 13(1), 90–96. DOI: 10.31016/1998-8435-2019-13-1-90-96.
8. Pridannikov, M.V., Petelina, G.G., Palchuk, M.V., Masler, E.P., Dzhavakhiya, V.G. (2007). Influence of components of *Globodera rostochiensis* cysts on the in vitro hatch of second-stage juveniles. *Nematology*, 9, 837-844. <https://doi.org/10.1163/156854107782331126>
9. Karelov, A.V., Pylypenko, L.A., Kozub, N.O. et al. (2013). Allelic state of the molecular marker for golden nematode (*Globodera rostochiensis*) resistance gene H1 among Ukrainian and world potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) cultivars. *Cytol. Genet.*, 47, 294–297. <https://doi.org/10.3103/S0095452713050058>
10. Back, M., Haydock, P. and Jenkinson, P. (2006). Interactions between the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* and diseases caused by *Rhizoctonia solani* AG3 in potatoes under field conditions. *Eur. J. Pl. Pathol.*, 114, 215-223. <https://doi.org/10.1007/s10658-005-5281-y>

11. Sudha, R., Venkatasalama, E.P., Bairwa, A., Bhardwaj, V. and Dalamu-Sharma, R. (2016). Identification of potato cyst nematode resistant genotypes using molecular markers. *Scient. Hort.*, 198, 21-26. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.11.029>
12. Subbotin S.A., Vera I.C.D., Mundo-Ocampo M., Baldwin J.G. (2011). Identification, phylogeny and phylogeography of circumfenestrate cyst nematodes (Nematoda: Heteroderidae) as inferred from analysis of ITS-rDNA. *Nematology*, 13, 805–24. <https://doi.org/10.1163/138855410X552661>

A.G. Babich, R.D. Suhareva, O.A. Babich, I.V. Prichodko (2020). APPLIED PROBLEMS OF DETECTION AND IDENTIFICATION OF GOLDEN POTATO NEMATODE. BIOLOGICAL SYSTEMS: THEORY AND INNOVATION, 11(4): 87-95. <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Biologiya/article/view/14558>. <https://doi.org/10.31548/biologiya2020.04.008>.

Abstract. In Ukraine, the golden potato nematode - an object of internal quarantine of plants is distributed mainly in homesteads, much less often in collective farms. Detection of its foci, especially in the initial stages of land settlement is quite difficult, because the typical signs of damage - globoderosis (lag in growth and development, chlorosis, leaf wilting, etc.) are visually manifested only after the accumulation of high population density as a result of long-term cultivation of nightshade crops in monoculture or with minimal intervals between re-placement. To improve the methods of monitoring the golden potato nematode, various survey schemes were tested: diagonally, by the method of triangle and envelope. It is established that the highest probability of detection of land population by the golden potato nematode is provided by the selection of soil samples by the envelope method. At the same time, compared to other monitoring schemes, a more uniform coverage of the surveyed area is achieved.

Modern methods of flotation provide high efficiency of isolation of cysts from the soil brought to an air-dry state. However, soil samples taken from quarantined goods often require rapid analysis. It was found that with increasing humidity of soil samples, there was a tendency to decrease the proportion of nematode cysts. Therefore, to achieve higher efficiency of nematode cyst isolation, a saturated solution of NaCl should be used at the rate of 50 grams per 1 liter of water.

Determination of the species composition of cyst-forming potato nematodes should be carried out on a set of morphometric parameters, biological features (using varieties of differentiators) and biochemical differences. However, given the current high cost of biochemical diagnostic methods, they should be used primarily to identify quarantine and new to science species of cyst nematodes. In particular, the method of isoelectric focusing of proteins in polyacrylamide gel confirmed the belonging of cysts selected from Transcarpathian cells to one species - golden potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* (pathotype Ro1).

Keywords: golden potato nematode, potato globoderosis, detection methods, soil samples, cyst isolation, species identification.