



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **233838**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **410978**

(51) Int.Cl.
C12Q 1/686 (2018.01)
C12Q 1/6888 (2018.01)

(22) Data zgłoszenia: **16.01.2015**

(54) **Sposób i zestaw do identyfikacji nicieni, szkodników roślin ozdobnych,
metodą Real Time PCR**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

18.07.2016 BUP 15/16

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

29.11.2019 WUP 11/19

(73) Uprawniony z patentu:

**MUZEUM I INSTYTUT ZOOLOGII
POLSKIEJ AKADEMII NAUK, Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**WIESŁAW BOGDANOWICZ, Warszawa, PL
ANETA CHAŁAŃSKA, Skierniewice, PL
EWA DMOWSKA, Warszawa, PL
RENATA DOBOSZ, Poznań, PL
FRANCISZEK KORNOBIS, Puszczykowo, PL
KATARZYNA KOWALEWSKA, Warszawa, PL
MARTA ŁOŚ, Warszawa, PL
TADEUSZ MALEWSKI, Warszawa, PL
EDYTA RYCHLICKA, Piła, PL
ANNA TEREBA, Komorów, PL
ROBERT TURLEJ, Warszawa, PL
KATARZYNA WIŚNIEWSKA, Warszawa, PL
GRAŻYNA WINISZEWSKA-ŚLIPIŃSKA,
Warszawa, PL**

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób i zestaw do identyfikacji nicieni, szkodników roślin ozdobnych, metodą Real Time PCR, w szczególności wynalazek dotyczy sposobu i zestawu do identyfikacji nicieni wybranych z grupy obejmującej gatunki *Aphelenchoides besseyi*, *Aphelenchoides fragariae* i *Aphelenchoides ritzemabosi* z rodziny Aphelenchoididae, *Rotylenchus buxophilus* z rodziny Hoplolaimidae, *Longidorus elongatus* z rodziny Longidoridae oraz *Pratylenchus penetrans* z rodziny Pratylenchidae.

Według najnowszej klasyfikacji rodzinę Anguinidae reprezentują w Polsce 34 gatunki, Heteroderidae 17 gatunków, Meloidogynidae 5 gatunków, a w rodzinie Pratylenchidae 5 gatunków. Wiele spośród nich to szkodniki roślin uprawnych oraz ozdobnych. Porażone rośliny mają uszkodzony system korzeniowy, a zmniejszony pobór wody prowadzi do ich zamierania. Wymienione powyżej gatunki nicieni uznawane są za pasożyty lub potencjalne pasożyty roślin. *Aphelenchoides fragariae* zimują w dolnych częściach roślin lub w glebie. Od wiosny żerują na roślinie początkowo powierzchniowo, w późniejszym czasie wchłaniają się do wnętrza rośliny głównie do liści. Dorosłe zapłodnione samice składają jaja, z których wylęgają się inwazyjne larwy przemieszczające się do zdrowych części roślin, gdzie rozmnażają i rozwijają. Jedno pokolenie rozwija się 14 dni, w ciągu roku wykształca się 10–15 pokoleń. Gatunek atakuje głównie truskawkę i rośliny ozdobne, straty wynoszą od 30–60%. Występuje najczęściej na plantacjach truskawek. Objawy są widoczne na owocach. Truskawki są zniekształcone o poskręcanych ogonkach, karłowe. *Aphelenchoides ritzemabosi* od wielu lat jest znanym i powszechnym szkodnikiem truskawki i chryzantemy, a także występuje na kilkunastu gatunkach bylin i krzewów ozdobnych. W Europie wykazano obecność 79 gatunków *Longidoridae*, z których 13 występuje w Polsce. Przedstawiciele tej rodziny zaliczani są do pasożytów roślin, są również wektorami wirusów atakujących rośliny. Rozmnażają się w glebie. Okres ich rozwoju jest długi i może trwać nawet kilka miesięcy. Mogą pasożytować na wielu roślinach użytkowych. Porażone rośliny są karłowate lub zamierają, szczególnie gdy porażone zostaną we wczesnym stadium swego rozwoju. *Longidorus attenuatus*, *L. elongatus* i *L. macrosoma* mogą przenosić wirusa czarnej plamistości pierścieniowej pomidorów i wirusa pierścieniowej plamistości malin.

Identyfikacja gatunków nicieni oparta jest na analizie cech morfologicznych i morfometrycznych, w tym diagnozowane są m.in.: zabarwienie samicy na poszczególnych etapach rozwojowych, kształt cysty, długość i kształt guzów sztyletu, długość larwy inwazyjnej, wzór na płycie perinealnej. Jest to jednak analiza bardzo pracochłonna i czasochłonna. Wymaga dużo wiedzy i doświadczenia w pracy z materiałem biologicznym. Ponadto, istnieje możliwość nachodzenia na siebie wymiarów różnych gatunków. Metody opartej na analizie cech morfologicznych i morfometrycznych nie można zastosować do identyfikacji młodocianych osobników, u których cechy morfologiczne nie są jeszcze wykształcone.

Obecnie w diagnostyce nematologicznej coraz częściej stosowane są techniki oparte na analizie kwasów nukleinowych, w tym wykorzystujące łańcuchową reakcję polimerazy (PCR). Podstawą techniki PCR jest powielenie fragmentu/ów DNA, specyficznego dla określonego organizmu, do poziomu umożliwiającego jego szybką i prostą detekcję przy użyciu elektroforezy. Uzyskuje się to stosując krótkie jednoniciowe oligonukleotydy (12–40 nukleotydów), tzw. startery, specyficzne dla powielanego fragmentu DNA oraz enzym – termostabilną polimerazę, która umożliwia powielenieżądanego fragmentu w cyklicznej, trzyetapowej reakcji, złożonej z denaturacji, wiązania starterów oraz syntezy DNA. Zazwyczaj po około 30 cyklach reakcji uzyskuje się ponad milion kopii powielanego fragmentu DNA, co pozwala zidentyfikować go techniką elektroforezy żelowej.

Udoskonaleniem łańcuchowej reakcji polimerazy jest Real Time PCR, to jest reakcji PCR z pomiarem ilości powielonego fragmentu w każdym cyklu reakcji. Do pomiaru ilości powielonego fragmentu wykorzystuje się fluorochromy (barwniki fluorescencyjne), np.: SYBR Green I, SYTO9, Eva Green, SYBR Gold, których fluorescencja jest proporcjonalna do ilości powielonego fragmentu. Identyfikację powstałych produktów przeprowadza się poprzez pomiar wielkości fluorescencji oraz analizę krzywej topnienia produktów reakcji bez elektroforezy. Czułość reakcji Real Time PCR jest znacznie większa niż tradycyjnego PCR, a brak elektroforezy skraca czas analizy. Wadą Real Time PCR z barwnikami fluorescencyjnymi (podobnie jak tradycyjnego PCR) jest ograniczona specyficzność reakcji. W większości przypadków reakcja PCR zachodzi nie tylko w przypadku 100% identyczności sekwencji starterów do sekwencji matrycy, lecz również gdy 1–2 nukleotydy są nieidentyczne. Ta właściwość tradycyjnego PCR i Real Time PCR z barwnikami fluorescencyjnymi wymaga precyzyjnego ustawienia parametrów termicznych reakcji. Ponadto, barwniki fluorescencyjne wiążą się z każdym dwuniciowym fragmentem

DNA, powstałym również w wyniku amplifikacji starterów (produkty primer-primer, primer-dimer), co wymaga również starannego doboru odpowiedniego stężenia starterów.

Alternatywą dla barwników fluorescencyjnych są sondy DNA znakowane fluorescencyjnie. Są to krótkie odcinki DNA, komplementarne do poszukiwanej sekwencji, które po przyłączeniu do DNA podczas reakcji PCR emitują fluorescencję o określonej długości fali. Obecnie znanych jest kilka rodzajów sond, np.: TaqMan, FRET, molecular beacons czy scorpions. Specyficzność reakcji Real Time PCR ze znakowanymi sondami jest znacznie wyższa niż z barwnikami fluorescencyjnymi. W odróżnieniu od starterów niedopasowanie jednego nukleotydu w sekwencji sondy prowadzi przeważnie do braku reakcji lub bardzo istotnego zmniejszenia wydajności, co jest łatwe do stwierdzenia podczas monitorowania przebiegu reakcji lub analizy wyników reakcji.

McCouston J.L., Hudson L.C., Subbotin S.A., Davis E.L., Warfield C.Y. Conventional and PCR Detection of *Aphelenchoides fragariae* in Diverse Ornamental Host Plant Species. *J Nematol.* Dec 2007; 39(4): 343–355 opracowali startery do identyfikacji *Aphelenchoides fragariae*. Rybarczyk-Mydłowska K., Mooyman P., Megen H., Elsen S., Vervoort M., Veenhuizen P., Doom J., Dees R., Karsen G., Bakker J., Helder J. 2012 Small Subunit Ribosomal DNA-Based Phylogenetic Analysis of Foliar Nematodes (*Aphelenchoides* spp.) and Their Quantitative Detection in Complex DNA Backgrounds. *Nematology* 102(12): 1153–1160 opracowali startery do identyfikacji czterech gatunków *Aphelenchoides* (*Aphelenchoides besseyi*, *A. fragariae*, *A. ritzemabosi* oraz *A. subtenuis*) metodą Real Time PCR z barwnikiem fluorescencyjnym SYBR.

Metoda polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych PCR-RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism) wykorzystuje enzymy restrykcyjne, które tną nić DNA w specyficznym dla siebie miejscu. Różnice w długości pociętych fragmentów DNA świadczą o zmienności, co pozwoliło autorom opracować metodę do identyfikacji 11 gatunków: *Longidorus aetnaeus*, *L. africanus*, *L. andalusicus*, *L. artemisiae*, *L. caespiticola*, *L. distinctus*, *L. elongatus*, *L. euonymus*, *L. intermedius*, *L. leptcephalus* i *L. lignosus* (Subbotin S.A., Rogozhin E.A., Chizhov V.N. Molecular characterisation and diagnostics of some *Longidorus* species (Nematoda: Longidoridae) from Russia and other countries using rRNA genes. 2014 *Eur J Plant Pathol* 138: 377–390).

Hubschen J., Kling L., Ipach U., Zinkernagel V., Brown D.J.F., Neilson R. 2004. Development and validation of species-specific primers that provide a molecular diagnostic for virus-vector longidorid nematodes and related species in German viticulture. *European Journal of Plant Pathology* 110: 883–891 również opisali startery do identyfikacji trzech gatunków *Longidorus* (*L. attenuatus*, *L. elongatus*, *L. macrosoma*) metodą klasycznego PCR.

Do identyfikacji *Pratylenchus penetrans* metodą klasycznego PCR sekwencje starterów opisali Al-Banna L., Ploeg A.T., Williamson V.M., Kaloshian I., 2004. Discrimination of Six *Pratylenchus* Species Using PCR and Species-Specific Primers. *Journal of Nematology* 36(2): 142–146, a później startery do dipleksu Waeyenberge L., Viaene N., Moens M. 2009. Species-specific duplex PCR for the detection of *Pratylenchus penetrans*. *Nematology*. 11(6): 847–857.

W stanie techniki istnieje nadal potrzeba dostarczenia narzędzia umożliwiającego detekcję wybranych gatunków nicieni nie identyfikowanych metodami genetycznymi, jak również dostarczenia udoskonalonego sposobu identyfikacji tych gatunków nicieni, które są wykrywane znanymi technikami genetycznymi, natomiast nie zapewniają wysokiej precyzyjności i nie wykluczają błędów w analizie.

Celem wynalazku jest dostarczenie sposobu umożliwiającego identyfikację gatunków nicieni z dużą czułością i specyficznością. Celem wynalazku jest również dostarczenie sposobu identyfikacji nicieni, które nie były dotychczas wykrywane metodami analizy materiału genetycznego badanych gatunków. Celem wynalazku jest również dostarczenie nowych sekwencji nukleotydowych starterów i sond bądź nieoczywistego wyboru znanych sekwencji i sond, mających zastosowanie w sposobie wykrywania nicieni techniką PCR, zwłaszcza Real-Time PCR, niezależnie od rodzaju prób badanych, ich pochodzenia i przeznaczenia oraz stadium rozwoju.

Powyższe cele zrealizowano w niniejszym wynalazku.

Przedmiotem wynalazku jest sposób identyfikacji nicieni w próbce gleby wybranych z grupy zawierającej gatunki *Aphelenchoides besseyi*, *Aphelenchoides fragariae*, *Aphelenchoides ritzemabosi*, *Longidorus elongatus* oraz *Pratylenchus penetrans*, obejmujący następujące etapy:

- a) dostarczenie próbki gleby zawierającej nicienie do identyfikacji;
- b) wypłukanie nicieni z gleby;
- c) izolację DNA;

- d) przeprowadzenie reakcji PCR, zwłaszcza Real-Time PCR, z zastosowaniem pary starterów 3' i 5' oraz sondy;
- e) porównanie krzywej amplifikacji badanej próby z krzywymi amplifikacji próby zerowej oraz kontroli negatywnej,

przy czym do identyfikacji jednego z powyższych gatunków w reakcji PCR, zwłaszcza Real-Time PCR, stosuje się właściwe dla danego gatunku startery 3' i 5' oraz sondę wybrane z listy:

Gatunek	5' starter		3' starter		Sonda	
	Nazwa	Sekwencja	Nazwa	Sekwencja	Nazwa	Sekwencja
<i>Aphelenchoides besseyi</i>	Abesfv	ccgtgactaggactgttc	Abesrv	ggacttccaccagagtttc	Abes	ctctggcttcacctgttcgg
<i>Aphelenchoides fragariae</i>	Afrfv	gaccaattggccctagtc	Afrarv	cgtacaccttaaacctctg	Afra	tgaccgactggacaccgaat
<i>Aphelenchoides ritzemabosi</i>	Aritfr	gttggtggtgaattc	Aritrv	cggactatacaccgagtc	Arit	cgcacgaacggaccaacgac
<i>Longidorus elongatus</i>	Lelonfv	gtcgaattgaggtggaaa	Lelonrv	ccaactatccatcgctta	Lelon	accagttcgtcgcttgaatc
<i>Pratylenchus penetrans</i>	Ppenfv	cggatggaggaaatgtg	Ppenrv	gaaggcacatgttgcag	Ppen	aactgccacccccaccaat
<i>Rotylenchus buxophilus</i>	Rbuxfv	ctcccagggaacctaac	Rbuxrv	gctctggactcaaacac	Rbux	atgagtcggagccacaacag

Przedmiotem wynalazku jest również zestaw do identyfikacji nicieni wybranych z grupy obejmującej gatunki *Aphelenchoides besseyi*, *Aphelenchoides fragariae*, *Aphelenchoides ritzemabosi*, *Longidorus elongatus*, *Rotylenchus buxophilus* oraz *Pratylenchus penetrans*, metodą PCR, zwłaszcza Real-Time PCR, zawierający właściwe dla danego gatunku startery 3' i 5' oraz sondę wybrane z listy:

Gatunek	5' starter		3' starter		Sonda	
	Nazwa	Sekwencja	Nazwa	Sekwencja	Nazwa	Sekwencja
<i>Aphelenchoides besseyi</i>	Abesfv	ccgtgactaggactgttc	Abesrv	ggacttccaccagagtttc	Abes	ctctggcttcacctgttcgg
<i>Aphelenchoides fragariae</i>	Afrfv	gaccaattggccctagtc	Afrarv	cgtacaccttaaacctctg	Afra	tgaccgactggacaccgaat
<i>Aphelenchoides ritzemabosi</i>	Aritfr	gttggtggtgaattc	Aritrv	cggactatacaccgagtc	Arit	cgcacgaacggaccaacgac
<i>Longidorus elongatus</i>	Lelonfv	gtcgaattgaggtggaaa	Lelonrv	ccaactatccatcgctta	Lelon	accagttcgtcgcttgaatc
<i>Pratylenchus penetrans</i>	Ppenfv	cggatggaggaaatgtg	Ppenrv	gaaggcacatgttgcag	Ppen	aactgccacccccaccaat
<i>Rotylenchus buxophilus</i>	Rbuxfv	ctcccagggaacctaac	Rbuxrv	gctctggactcaaacac	Rbux	atgagtcggagccacaacag

Mieszanina reakcyjna zawiera bufor, termostabilną Taq polimerazę, jony magnezu, startery i sondę. Stężenie starterów w mieszaninie reakcyjnej wynosi 1–2 μM , sondy 50–100 nM, jonów magnezu 2–5 mM. Reakcję prowadzi się przy temperaturze przyłączania starterów 55–60°C, w objętości mieszaniny reakcyjnej 10–20 μl , przy zastosowaniu od 35 do 40 cykli reakcji. Identyfikacji produktów dokonuje się poprzez porównanie krzywych amplifikacji badanej próby z krzywymi amplifikacji próby zerowej.

Nazwom sekwencji starterów oraz sond odpowiadają kolejne numery sekwencji: Abesfv (SEKW NR ID: 1), Abesrv (SEKW NR ID: 2), Abes (SEKW NR ID: 3), Afrfv (SEKW NR ID: 4), Afrarv (SEKW NR ID: 5), Afra (SEKW NR ID: 6), Aritfr (SEKW NR ID: 7), Aritrv (SEKW NR ID: 8), Arit (SEKW NR ID: 9), Lelonfv (SEKW NR ID: 10), Lelonrv (SEKW NR ID: 11), Lelon (SEKW NR ID: 12), Ppenfv (SEKW NR ID: 13), Ppenrv (SEKW NR ID: 14), Ppen (SEKW NR ID: 15), Rbuxfv (SEKW NR ID: 16), Rbuxrv (SEKW NR ID: 17), Rbux (SEKW NR ID: 18).

Fig. 1 przedstawia krzywe amplifikacji dla *Aphelenchoides besseyi*.

Fig. 2 przedstawia krzywe amplifikacji dla *Aphelenchoides fragariae*.

Fig. 3 przedstawia krzywe amplifikacji dla *Aphelenchoides ritzemabosi*.

Fig. 4 przedstawia krzywe amplifikacji dla *Longidorus elongatus*.

Fig. 5 przedstawia krzywe amplifikacji dla *Pratylenchus penetrans*.

Fig. 6 przedstawia krzywe amplifikacji dla *Rotylenchus buxophilus*.

Poniżej podano przykłady identyfikacji każdego z wchodzących w skład zestawu gatunków nicieni. Każdorazowo identycznym warunkom izolacji i amplifikacji poddawano próbę zerową (dejonizowana H₂O wolna od nukleaz) oraz próbę ujemną. Materiałem dla próby ujemnej było DNA gatunku nicienia należącego do tego samego rodzaju co badany, mieszanina równych ilości DNA nicieni należących do tego samego gatunku co badany gatunek lub w przypadku braku gatunków należących do tego samego rodzaju, gatunek z tej samej rodziny.

Przykład 1

Identyfikacja nicieni z gatunku *Aphelenchoides besseyi*

DNA izolowano przy użyciu komercyjnych zestawów do izolacji DNA NucleoSpin Tissue XS firmy Macherey-Nagel. W reakcji użyto starterów i sondy o następujących sekwencjach:

Starter/sonda	Sekwencja
Abesfv	ccgtgactaggactgttc
Abesrv	ggactccaccagagttc
Abes	ctctggcttcatcctgttcgg

Reakcję Real Time PCR przeprowadzano w mieszaninie o objętości 20 μ l w aparacie RotorGene 6000 firmy Qiagen przy użyciu odczynników z zestawu LuminoCt qPCR Ready Mix (Sigma-Aldrich) w następujących ilościach:

- H₂O wolna od nukleaz do objętości 20 μ l,
- 2 μ l 10,0 μ M każdego ze starterów Abesfv i Abesrv,
- 1 μ l 4,0 μ M sondy Abes znakowanej na końcu 5' barwnikiem JOE, a 3'-końcu wygaszaczem HBQ1,
- 10 μ l 2X LuminoCt qPCR ReadyMix (Sigma-Aldrich),
- 2 μ l DNA.

Mieszaninę reakcyjną umieszczano w próbówce o objętości 20 μ l, umieszczano w rotorze termocyklera RotorGene 6000 i przeprowadzano reakcję amplifikacji w 40 cyklach w następujących warunkach:

Etap		Temperatura [°C]	Czas [s]	Pomiar fluorescencji
Pre-inkubacja		95	180	-
Amplifikacja	denaturacja	95	30	-
	przyłączenie	55	30	pojedynczy
	synteza	72	30	-
Chłodzenie		40	20	-

Kontrolę negatywną stanowiła mieszanka równych objętości roztworów DNA *Aphelenchoides composticola*, *Aphelenchoides ritzemabosi*.

Krzywe amplifikacji uzyskane w wyniku przeprowadzonej analizy przedstawiono na fig. 1.

Przykład 2

Identyfikacja nicieni z gatunku *Aphelenchoides fragariae*

Warunki izolacji i amplifikacji odpowiadały warunkom przedstawionym w przykładzie 1. W reakcji Real-Time PCR użyto następujących starterów i sondy:

Starter/sonda	Sekwencja
Afracv	gaccaattggcctagtc
Afracv	cgtacaccttaactccttg
Afra	tgaccgactggacaccgaat

Kontrolę negatywną stanowiła mieszanka równych objętości roztworów DNA *Aphelenchoides besseyi*, *Aphelenchoides composticola*, *Aphelenchoides ritzemabosi*.

Krzywe amplifikacji uzyskane w wyniku przeprowadzonej analizy przedstawiono na fig. 2.

Przykład 3

Identyfikacja nicieni z gatunku *Aphelenchoides ritzemabosi*

Warunki izolacji i amplifikacji odpowiadały warunkom przedstawionym w przykładzie 1. W reakcji Real-Time PCR użyto następujących starterów i sondy:

Starter/sonda	Sekwencja
Aritfr	gttgggtgtgggtgaattc
Aritrv	ccgactatacaccgagtc
Arit	cgcacgaacggaccaacgac

Kontrolę negatywną stanowiła mieszanka równych objętości roztworów DNA *Aphelenchoides besseyi*, *Aphelenchoides composticola*, *Aphelenchoides fragariae*.

Krzywe amplifikacji uzyskane w wyniku przeprowadzonej analizy przedstawiono na fig. 3.

Przykład 4

Identyfikacja nicieni z gatunku *Longidorus elongatus*

Warunki izolacji i amplifikacji odpowiadały warunkom przedstawionym w przykładzie 1. W reakcji Real-Time PCR użyto następujących starterów i sondy:

Starter/sonda	Sekwencja
Lelonfv	gtcgaattgaggtgaaa
Lelonrv	ccaactatccatcgctta
Lelon	accagttcgtcggcttgaatc

Kontrolę negatywną stanowiła mieszanka równych objętości roztworów DNA *Longidorus diadecturus*, *Longidorus attenuatus*, *Longidorus poessneckensis*.

Krzywe amplifikacji uzyskane w wyniku przeprowadzonej analizy przedstawiono na fig. 4.

Przykład 5

Identyfikacja nicieni z gatunku *Pratylenchus penetrans*

Warunki izolacji i amplifikacji odpowiadały warunkom przedstawionym w przykładzie 1. W reakcji Real-Time PCR użyto następujących starterów i sondy:

Starter/sonda	Sekwencja
Ppenfv	cggattggaggaatgttg
Ppenrv	gaaggcacatgttgcacg
Ppen	aactgccacccacaccaat

Kontrolę negatywną stanowiła mieszanka równych objętości roztworów DNA *Pratylenchus crenatus*, *Pratylenchus pratensis*.

Krzywe amplifikacji uzyskane w wyniku przeprowadzonej analizy przedstawiono na fig. 5.

Przykład 6

Identyfikacja nicieni z gatunku *Rotylenchus buxophilus*

Warunki izolacji i amplifikacji odpowiadały warunkom przedstawionym w przykładzie 1. W reakcji Real-Time PCR użyto następujących starterów i sondy:

Starter/sonda	Sekwencja
Rbuxfv	ctcccagggaacctaac
Rbuxrv	gctctggactcaaacac
Rbux	atgagtcgagccacaacag

Kontrolę negatywną stanowiła mieszanka równych objętości roztworów DNA *Rotylenchus capitatus* i *Rotylenchus uniformis*.

Krzywe amplifikacji uzyskane w wyniku przeprowadzonej analizy przedstawiono na fig. 6.

Rozwiązanie według wynalazku pozwala na wykrycie nicieni w glebie w przeciągu kilku godzin, uwzględniając w tym etapy przygotowania prób, izolacji DNA oraz reakcji Real-Time PCR. Metodę według wynalazku można zastosować do identyfikacji wyżej wymienionych gatunków nicieni niezależnie od rodzaju prób badanych, ich pochodzenia i przeznaczenia oraz stadium rozwoju.

Proponowany zestaw sond pozwala identyfikować wyżej wymienione gatunki nicieni w reakcji Real Time PCR, która jest znacznie czulsza i szybsza od innych metod PCR. Zastosowanie w reakcji Real Time PCR sond znacznie zwiększa specyficzność reakcji w stosunku do reakcji Real Time PCR z barwnikami fluorescencyjnymi.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób identyfikacji gatunków nicieni *Aphelenchoides besseyi*, *Aphelenchoides fragariae*, *Aphelenchoides ritzemabosi*, *Longidorus elongatus* oraz *Pratylenchus penetrans* w próbce gleby, obejmujący następujące etapy:
 - a) dostarczenie próbki gleby zawierającej nicienie do identyfikacji;
 - b) wypłukanie nicieni z gleby;
 - c) izolację DNA;
 - d) przeprowadzenie reakcji Real-Time PCR z zastosowaniem pary starterów 3' i 5' oraz sondy;
 - e) porównanie krzywej amplifikacji badanej próby z krzywymi amplifikacji próby zerowej oraz kontroli negatywnej,
 przy czym do identyfikacji jednego z powyższych gatunków w reakcji Real-Time PCR stosuje się właściwe dla danego gatunku startery 3' i 5' oraz sondy wybrane z listy:

Gatunek	5' starter		3' starter		Sonda	
	Nazwa	Sekwencja	Nazwa	Sekwencja	Nazwa	Sekwencja
<i>Aphelenchoides besseyi</i>	Abesfv	ccgtgactaggacttgctc	Abesrv	ggacttccaccagagtttc	Abes	ctctggcttcatcctgttcgg
<i>Aphelenchoides fragariae</i>	Afrfv	gaccaattgggcctagtc	Afrvr	cgtaaccctaaactccttg	Afra	tgaccgactggaccaccaat
<i>Aphelenchoides ritzemabosi</i>	Aritfr	gttggtgtgggtgaattc	Aritrv	ccgactatacaccagctc	Arit	cgcacgaacggaccaacgac
<i>Longidorus elongatus</i>	Lelonfv	gtcgaattgaggtgaaa	Lelonrv	ccaactatccatcgctta	Lelon	accagttcgtcggcttgaatc
<i>Pratylenchus penetrans</i>	Ppenfv	cggattggaggaaatgtg	Ppenrv	gaaggcacatgttgcctg	Ppen	aactgccacccacaccaat

2. Zestaw do identyfikacji gatunków nicieni *Aphelenchoides besseyi*, *Aphelenchoides fragariae*, *Aphelenchoides ritzemabosi*, *Longidorus elongatus* oraz *Pratylenchus penetrans* metodą Real-Time PCR, zawierający właściwe dla danego gatunku startery 3' i 5' oraz sondy wybrane z listy:

Gatunek	5' starter		3' starter		Sonda	
	Nazwa	Sekwencja	Nazwa	Sekwencja	Nazwa	Sekwencja
<i>Aphelenchoides besseyi</i>	Abesfv	ccgtgactaggacttgctc	Abesrv	ggacttccaccagagtttc	Abes	ctctggcttcatcctgttcgg
<i>Aphelenchoides fragariae</i>	Afrfv	gaccaattgggcctagtc	Afrvr	cgtaaccctaaactccttg	Afra	tgaccgactggaccaccaat
<i>Aphelenchoides ritzemabosi</i>	Aritfr	gttggtgtgggtgaattc	Aritrv	ccgactatacaccagctc	Arit	cgcacgaacggaccaacgac
<i>Longidorus elongatus</i>	Lelonfv	gtcgaattgaggtgaaa	Lelonrv	ccaactatccatcgctta	Lelon	accagttcgtcggcttgaatc
<i>Pratylenchus penetrans</i>	Ppenfv	cggattggaggaaatgtg	Ppenrv	gaaggcacatgttgcctg	Ppen	aactgccacccacaccaat

Rysunki

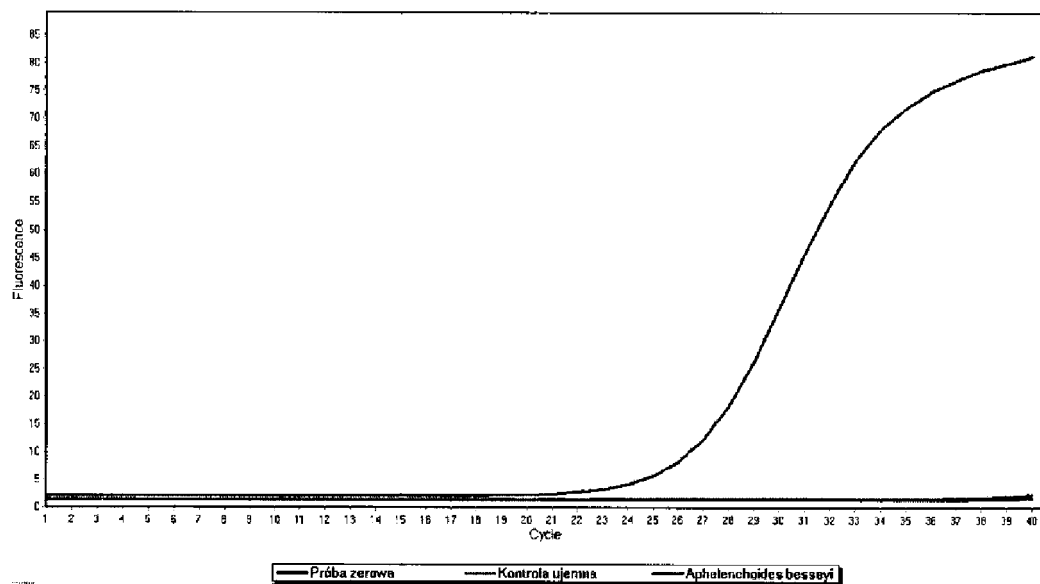


Fig. 1

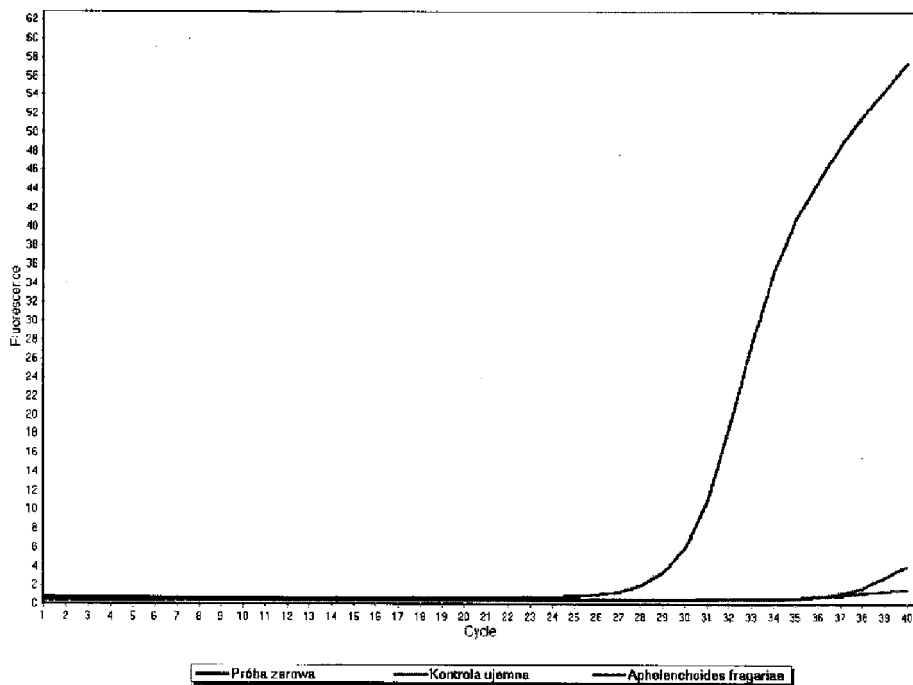


Fig. 2

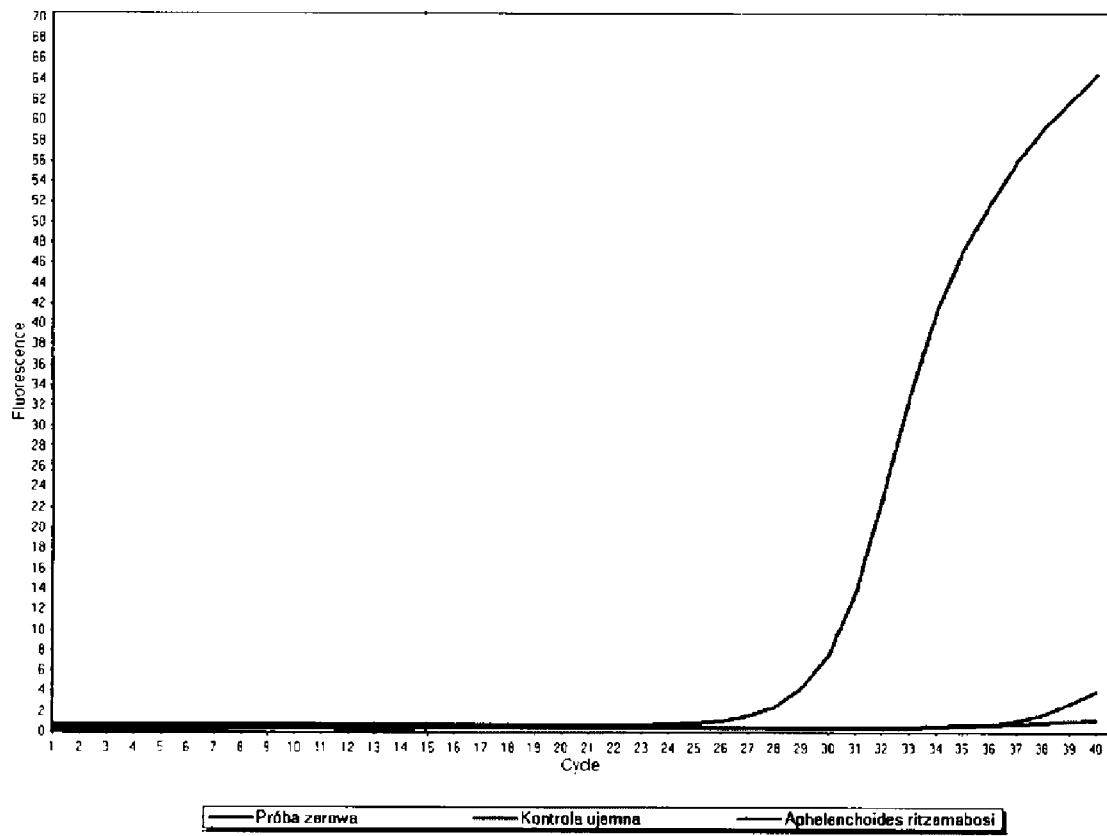


Fig. 3

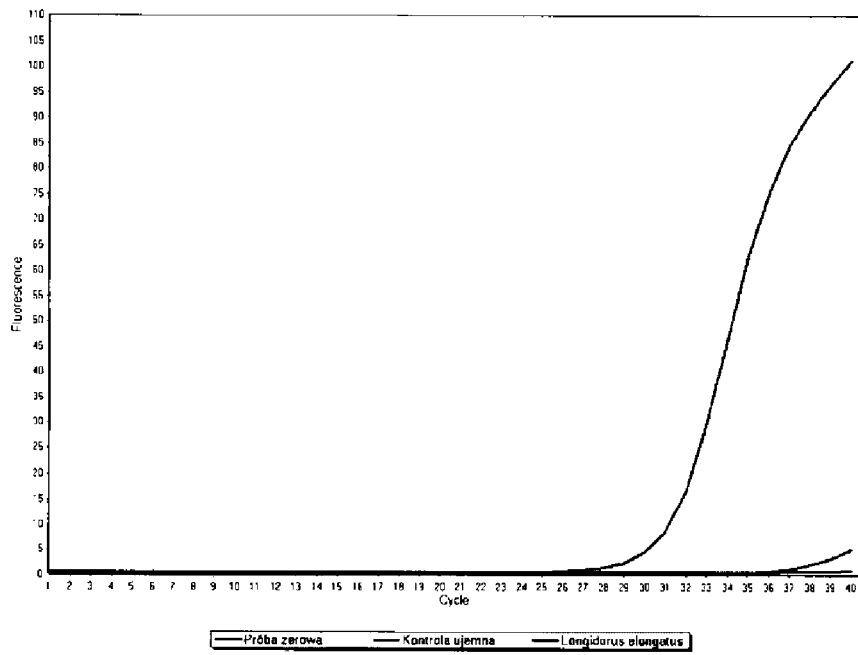


Fig. 4

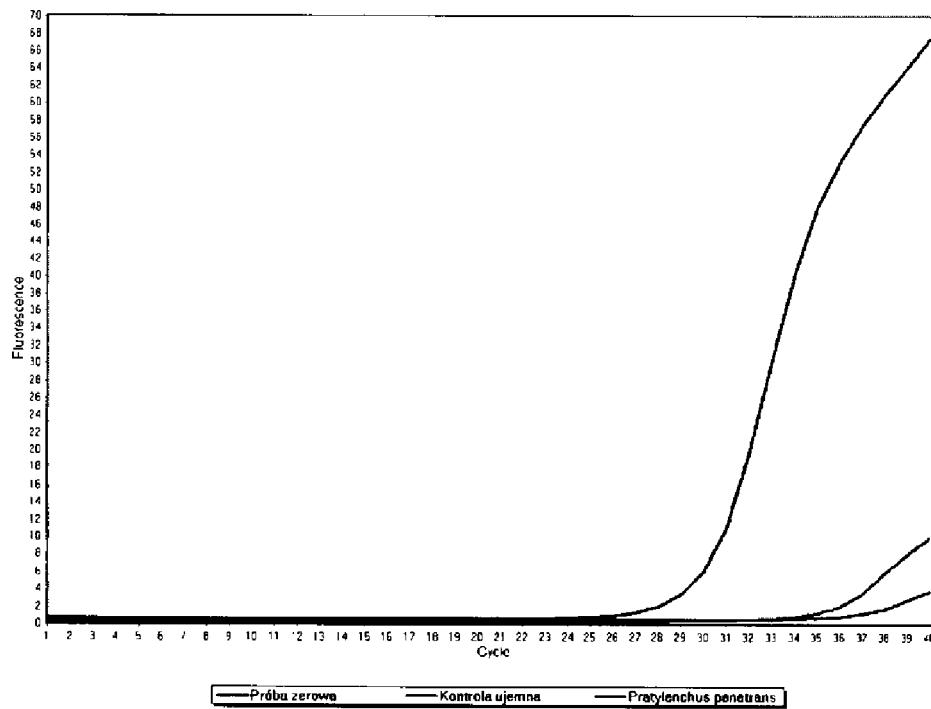


Fig. 5

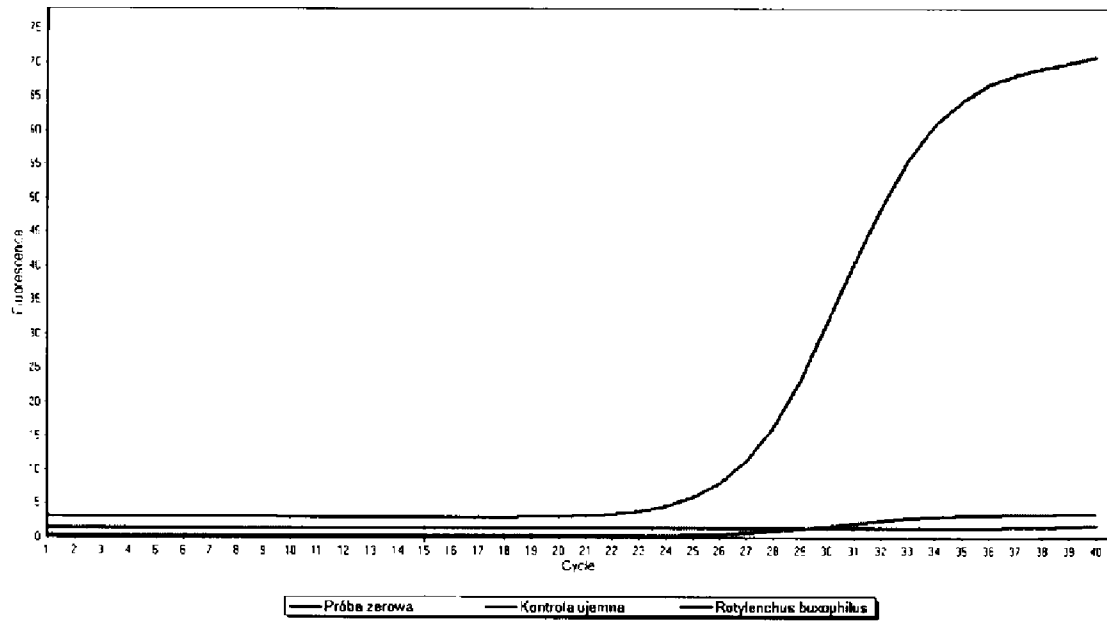


Fig. 6

