



(21) Numer zgłoszenia: **410977**

(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 upraw roślin motylkowych,
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
RENATA DOBOSZ, Poznań, PL
ŁUKASZ FLIS, Latowicz, PL
ALEKSANDRA GRALAK, Łuków, 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
OLGA WIŚNIEWSKA, Warszawa, PL
GRAŻYNA WINISZEWSKA-ŚLIPIŃSKA,
Warszawa, PL**

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób i zestaw do identyfikacji nicieni, szkodników upraw roślin motylkowych, metodą Real Time PCR, w szczególności wynalazek dotyczy sposobu i zestawu do identyfikacji nicieni wybranych z grupy obejmującej gatunki *Ditylenchus dipsaci* z rodziny Anguinidae, *Heterodera trifolii* z rodziny Heteroderidae, *Meloidogyne hapla* z rodziny Meloidogynidae, *Paratylenchus projectus* z rodziny Tylenchulidae.

Niszczyc zjadliwy (*Ditylenchus dipsaci*) powoduje zasychanie roślin. Żeruje na roślinach motylkowych, zbożach, marchwi, cebuli. Liczba pokoleń w ciągu roku: 4–6. Rozwój jednego pokolenia trwa 19–30 dni. Jaja składane są wewnątrz roślin. Zimuje larwa inwazyjna w resztkach roślin. Wiosną następuje wnikanie przez podziemne części roślin (łodygi, bulwy, cebule). Nicienie z rodzaju *Meloidogyne* są pasożytami roślin o znaczeniu gospodarczym, w uprawie których mogą powodować olbrzymie straty. Do chwili obecnej na obszarze Europy stwierdzono obecność 15 gatunków *Meloidogyne* (Karssen G., Block R.J., van Aelst A.C., van den Beld I., Kox L.F.F., Korthals G., Molendijk L., Zijstra C., van Hoof R., Cook R. 2004. Description of *Meloidogyne minor* n. sp. (Nematoda: Meloidogynine), a root – knot nematode associated with yellow patch disease in golf courses. *Nematology* 6 (1): 59–72). Występowanie 8 z nich stwierdzono na terenie Polski (Karssen G., Brzeski M.W. 1998. *Meloidogyne Goldi*, 1892. s. 242–263. W: *Nematodes of Tylenchina in Poland and Temperate Europe* (M.W. Brzeski, red.) Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Warszawa). *M. hapla* występuje powszechnie na obszarze Polski i jest szkodnikiem upraw roślin dwuliściennych (Głąba B. 1990. Występowanie guzaka północnego w uprawach ziemniaka, buraka i koniczyny w województwie gdańskim. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 391: 39–51).

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 powielenie żądanego 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. Czulość 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.

Dotychczas najczęściej stosowaną metodą molekularnej identyfikacji nicieni było PCR-RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism). Metoda polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych wykorzystuje enzymy restrykcyjne, które tną nić DNA w specyficznym dla siebie miejscu. Różnice w długości pociętych fragmentów DNA świadczą o zmienności. W pracach Wendt K.R., Vrain T.C. & Webster J.M. (1993). Separation of three species of *Ditylenchus* and some host races of *D. dipsaci* by restriction fragment length polymorphism. *Journal of Nematology* 25, 555–563 oraz Marek M., Zouhar M., Rysanek P. & Havranek P. (2005). Analysis of ITS sequences of nuclear rDNA and development of a PCR-based assay for the rapid identification of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* (Nematoda: Anguinidae) in plant tissues. *Helminthologia* 42, 49–56 zostały opisane startery i enzymy restrykcyjne do identyfikacji *Ditylenchus dipsaci*. Subbotin S.A., Waeyenberge L. i Moens M. użyli w swojej publikacji Identification of cyst forming nematodes of the genus *Heterodera* (Nematoda: Heteroderidae) based on the ribosomal DNA-RFLP, *Nematology* (2000), 2 (2): 153–164 aż 26 różnych enzymów restrykcyjnych: AluI, Aval, BamHI, BglI, BsiZI, BsuRI, Bsh1236I, Bsp143I, CfoI, DdeI, EcoRI, HpaII, HindIII, HinfI, KpnI, MvaI, PstI, PvuII, PsaI, Sall, SfiI, SspI, ScrFI, TaqI, Tru9I i XbaI, dzięki czemu wyodrębnili 27 różnych gatunków i typów nicieni w próbie, między innymi również *Heterodera trifolii*. Podobnie Amiri S., Subbotin S.A. i Moens M., Identification of the beet cyst nematode *Heterodera schachtii* by PCR, *European Journal of Plant Pathology* (2002), 108: 497–506 analizowali tą metodą łącznie prawie 60 populacji tworzących cysty nicieni i również znaleźli odpowiednie enzymy restrykcyjne do identyfikacji *Heterodera trifolii*. Wishart J., Phillips M.S., Blok V.C., Ribosomal Intergenic Spacer: A Polymerase Chain Reaction Diagnostic for *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax*, and *M. hapla*, *Phytopathology*. 2002 Aug; 92(8): 884–92 opracowali startery do identyfikacji *M. hapla*.

W 2014 Berg E., Tiedt L.R. Subbotin S.A. 2014 Morphological and molecular characterisation of several *Paratylenchus* Micoletzky, 1922 (Tylenchida: Paratylenchidae) species from South Africa and USA, together with some taxonomic notes. *Nematology* 16: 323–358 opisali startery do identyfikacji pięciu gatunków *Paratylenchus* (*P. aquaticus*, *P. dianthus*, *P. hamatus*, *P. nanus* and *P. straeleni*). Identyfikację *P. projectus* prowadzi się jednak w oparciu o cechy morfologiczne (Brzeski M., Hanel L. Paratylenchinae: evaluation of diagnostic morpho-biometrical characters of females in the genus *Paratylenchus* Micoletzky, 1922 (Nematoda: Tylenchulidae). *Nematology* 2: 253–261).

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 *Ditylenchus dipsaci*, *Heterodera trifolii*, *Meloidogyne hapla*, *Paratylenchus projectus*, obejmujący następujące etapy:

- 1) dostarczenie próbki gleby zawierającej nicienie do identyfikacji;
- 2) wypłukanie nicieni z gleby;
- 3) izolację DNA;
- 4) przeprowadzenie reakcji PCR, zwłaszcza Real-Time PCR, z zastosowaniem pary starterów 3' i 5' oraz sondy;
- 5) 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	Nazwa	5' starter Sekwencja	Nazwa	3' starter Sekwencja	Nazwa	Sonda Sekwencja
<i>Ditylenchus dipsaci</i>	Ddipfv	ctaggagtggcttacg	Ddiprv	ccacaggcagtaacagtc	Ddip	atccaccgagagcaagaag
<i>Heterodera trifolii</i>	Htrifv	acggaccaaggagttag	Htrirv	ccaggatcacacatcag	Htri	agccttcacttcattacgcttgg
<i>Meloidogyne hapla</i>	Mhafv	cggaccaaggagttaic	Mharv	gcacatcagactctaaaga	Mhas	tcatttacttcatttcgcttctaggt
<i>Paratylenchus projectus</i>	Pprfv	ctggatacctgggtaa	Pprfv	atgcatcagcttagtta	Ppr	caccgaagttgttcctgcg

Przedmiotem wynalazku jest również zestaw do identyfikacji nicieni wybranych z grupy obejmującej gatunki *Ditylenchus dipsaci*, *Heterodera trifolii*, *Meloidogyne hapla*, *Paratylenchus projectus*, metodą PCR, zwłaszcza Real-Time PCR, zawierający właściwe dla danego gatunku startery 3' i 5' oraz sondę wybrane z listy:

Gatunek	Nazwa	5' starter Sekwencja	Nazwa	3' starter Sekwencja	Nazwa	Sonda Sekwencja
<i>Ditylenchus dipsaci</i>	Ddipfv	ctaggagtggcttacg	Ddiprv	ccacaggcagtaacagtc	Ddip	atccaccgagagcaagaag
<i>Heterodera trifolii</i>	Htrifv	acggaccaaggagttag	Htrirv	ccaggatcacacatcag	Htri	agccttcacttcattacgcttgg
<i>Meloidogyne hapla</i>	Mhafv	cggaccaaggagttaic	Mharv	gcacatcagactctaaaga	Mhas	tcatttacttcatttcgcttctaggt
<i>Paratylenchus projectus</i>	Pprfv	ctggatacctgggtaa	Pprrv	atgcatcagcttagtta	Ppr	caccgaagttgttcctgcg

Mieszanina reakcyjna zawiera bufor, termostabilną Taq polimerazę, jony magnezu, startery i sondę. Stężenie starterów w mieszaninie reakcyjnej wynosi 1–2 μ M, 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 μ l, 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: Ddipfv (SEKW NR ID: 1), Ddiprv (SEKW NR ID: 2), Ddip (SEKW NR ID: 3), Htrifv (SEKW NR ID: 4), Htrirv (SEKW NR ID: 5), Htri (SEKW NR ID: 6), Mhafv (SEKW NR ID: 7), Mharv (SEKW NR ID: 8), Mhas (SEKW NR ID: 9), Pprfv (SEKW NR ID: 10), Pprrv (SEKW NR ID: 11), Ppr (SEKW NR ID: 12).

Fig. 1 przedstawia krzywe amplifikacji dla *Paratylenchus projectus*.

Fig. 2 przedstawia krzywe amplifikacji dla *Heterodera trifolii*.

Fig. 3 przedstawia krzywe amplifikacji dla *Meloidogyne hapla*.

Fig. 4 przedstawia krzywe amplifikacji dla *Ditylenchus dipsaci*.

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 *Paratylenchus projectus*

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
Pprfv	CTTGGATACCTGTGGTAA
Pprrv	ATGCGATCAGCTTAGTTA
Ppr	CACCGAAGTTGTTCCTTGCG

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 Pprfv i Pprrv,

- 1 μ l 4,0 μ M sondy Ppr 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	-
	przytaczanie	55	30	pojedynczy
	synteza	72	30	-
Chłodzenie		40	20	-

Powyższym warunkom izolacji i amplifikacji poddawano próbę zerową (dejonizowana H₂O wolna od nukleaz), kontrolę negatywną (DNA nicieni *Meloidogyne hapla*), oraz kontrolę pozytywną (DNA *Paratylenchus projectus*).

Badane próby:

- próba 1. Do reakcji dodano po 2 μ l DNA każdego z gatunków nicieni: *D. dipsaci*, *H. trifolii*, *M. hapla* i *P. projectus*.
- próba 2. Do reakcji dodano 2 μ l DNA otrzymanego z mieszanki równych objętości DNA *D. dipsaci*, *H. trifolii*, *M. hapla* i *P. projectus*.
- próba 3. Do reakcji dodano 2 μ l DNA otrzymanego z mieszanki równych objętości DNA *D. dipsaci*, *H. trifolii*, *M. hapla* i 0,2 μ l *P. projectus*.

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

Przykład 2

Identyfikacja nicieni z gatunku *Heterodera trifolii*

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

Starter/sonda	Sekwencja
Htrifv	acggaccaaggagttag
Htrirv	ccagggatcacacatcag
Htri	agccttcacttcattacgccttg

Kontrolę negatywną stanowiła mieszanka równych objętości roztworów DNA: *Heterodera avenae*, *Heterodera humuli*, *Heterodera schachtii*.

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

Przykład 3

Identyfikacja nicieni z gatunku *Meloidogyne hapla*

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

Starter/sonda	Sekwencja
Mhafv	cggaccaaggagttag
Mharv	gcacatcagactctaaaga
Mhas	tcattacttcatttcgcttaggt

Kontrolę negatywną stanowiło DNA nicienia *Aphelenchoides ritzemabosi*, *Longidorus elongatus*, *Mesocriconema xenoplax*.

Badane próby:

- próba 1. Do reakcji dodano po 2 μ l DNA każdego z gatunków nicieni: *Aphelenchoides ritzemabosi*, *Longidorus elongatus*, *Mesocriconema xenoplax* i *Meloidogyne hapla*.
- próba 2. Do reakcji dodano 2 μ l DNA otrzymanego z mieszanki równych objętości DNA *Aphelenchoides ritzemabosi*, *Longidorus elongatus*, *Mesocriconema xenoplax* i *Meloidogyne hapla*.
- próba 3. Do reakcji dodano 2 μ l DNA otrzymanego z mieszanki równych objętości DNA *Aphelenchoides ritzemabosi*, *Longidorus elongatus*, *Mesocriconema xenoplax* i 0,2 μ l *Meloidogyne hapla*.

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

Przykład 4

Identyfikacja nicieni z gatunku *Ditylenchus dipsaci*

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

Starter/sonda	Sekwencja
Ddipfv	ctaggagtgtggcttacg
Ddiprv	ccacaggcagtaacagtc
Ddip	atccaccgcagagcaagaag

Kontrolę negatywną stanowił roztwór DNA *Ditylenchus destructor*.

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

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 *Ditylenchus dipsaci*, *Heterodera trifolii*, *Meloidogyne hapla* i *Paratylenchus projectus* w próbce gleby, obejmujący następujące etapy:
 - a) dostarczenie próbki gleby zawierającej nicienie do identyfikacji;
 - b) wyplukanie 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>Ditylenchus dipsaci</i>	Ddipfv	ctaggagtgtggcttacg	Ddiprv	ccacaggcagtaacagtc	Ddip	atccaccgcagagcaagaag
<i>Heterodera trifolii</i>	Htrifv	acggaccaaggagtttag	Htrirv	ccaggatcacacatcag	Htri	agccttcacttcattacgcctttg
<i>Meloidogyne hapla</i>	Mhafv	cggaccaaggagttatc	Mharv	gcacatcagactctaaaga	Mhas	tcatttacttcttctcgttctaggt
<i>Paratylenchus projectus</i>	Pprfv	cttgatacc:gtggtaa	Pprfv	atgcgatcagcttagtta	Ppr	caccgaagtgttcttctg

2. Zestaw do identyfikacji gatunków nicieni *Ditylenchus dipsaci*, *Heterodera trifolii*, *Meloidogyne hapla* i *Paratylenchus projectus* 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>Ditylenchus dipsaci</i>	Ddipfv	ctaggagtgtggcttacg	Ddiprv	ccacaggcagtaacagtc	Ddip	atccaccgcagagcaagaag
<i>Heterodera trifolii</i>	Htrifv	acggaccaaggagttag	Htrirv	ccaggatcacacacag	Htri	agccttcacttcattacgccttig
<i>Meloidogyne hapla</i>	Mhafv	cggaccaaggagttatc	Mharv	gcacatcagactctaaaga	Mhas	tcatttactttcatttcgcttaggt
<i>Paratylenchus projectus</i>	Pprfv	cttgatcctgtggtaa	Pprfv	atgcatcagcttagta	Ppr	caccgaagttgttccttgcg

Rysunki

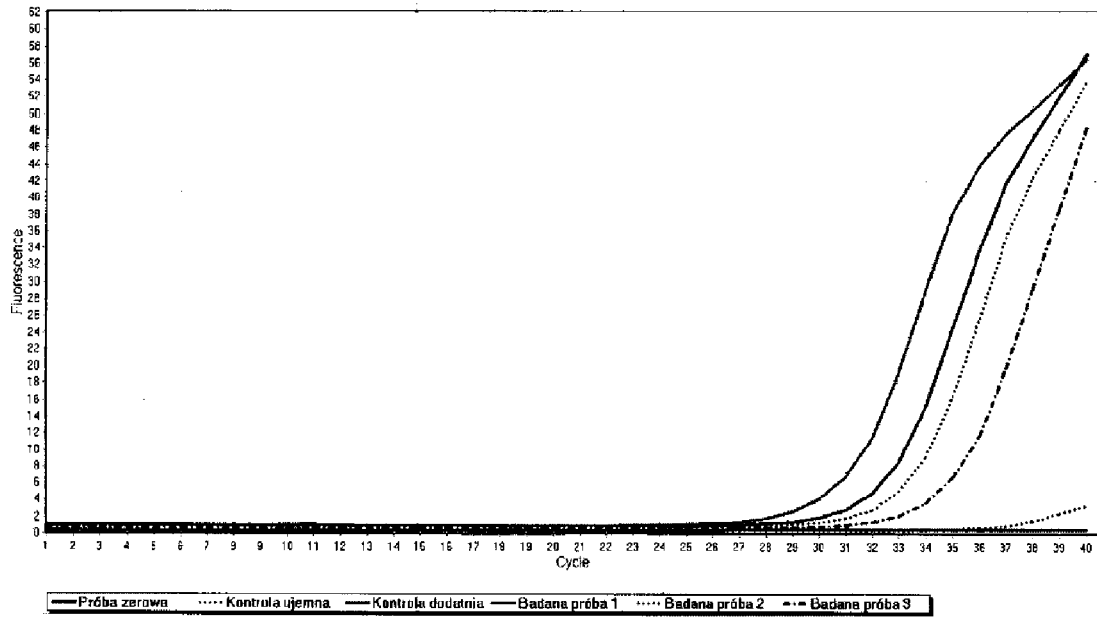


Fig. 1

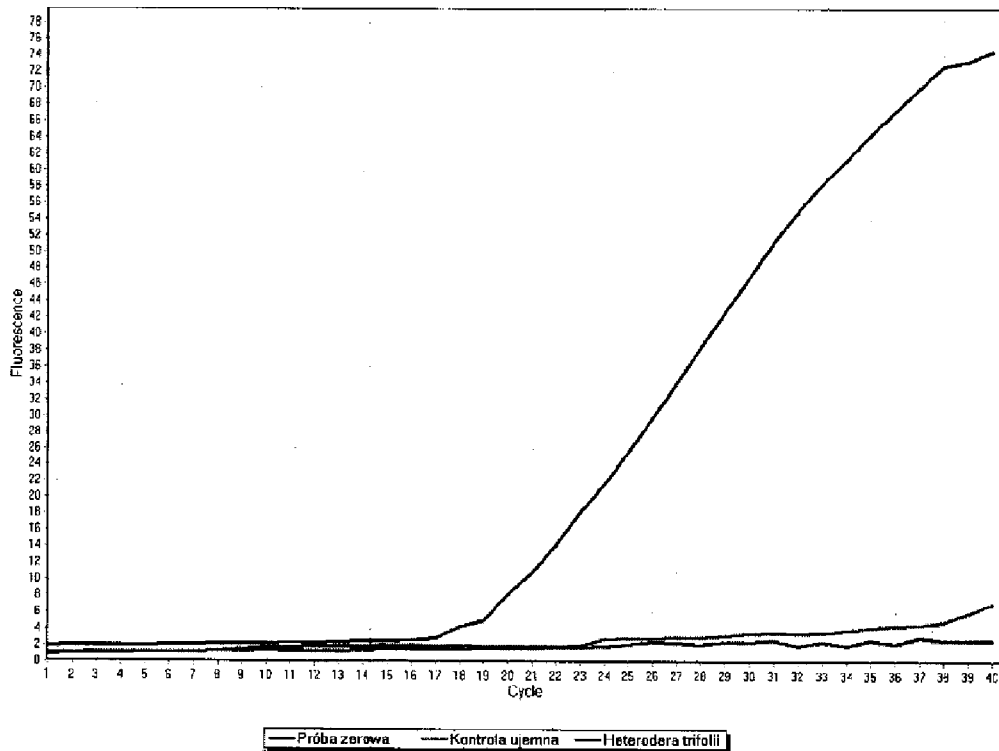


Fig. 2

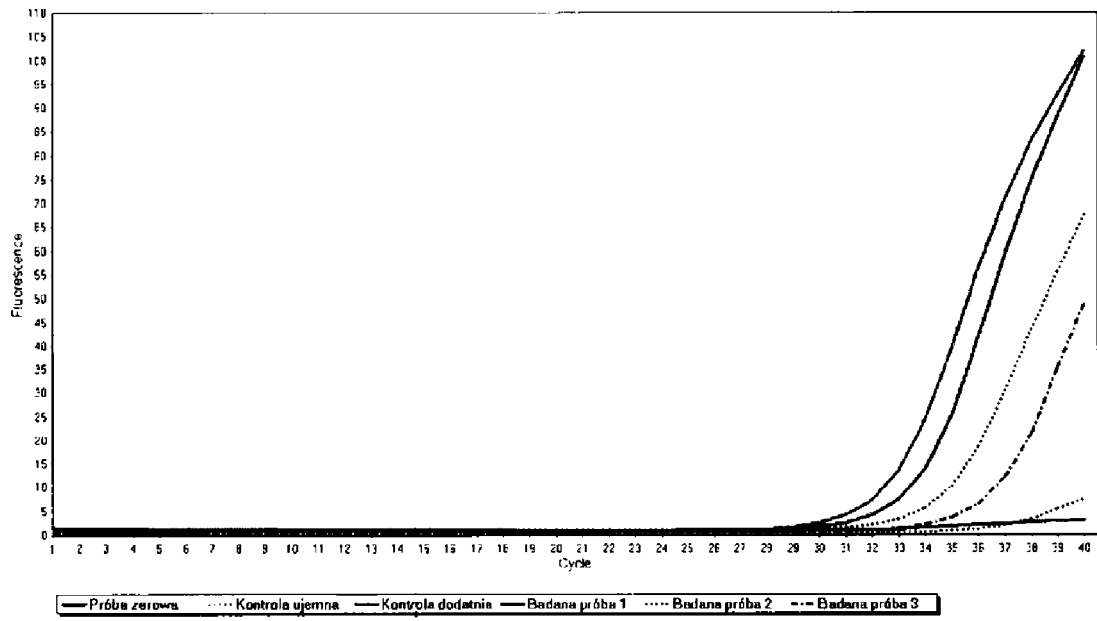


Fig. 3

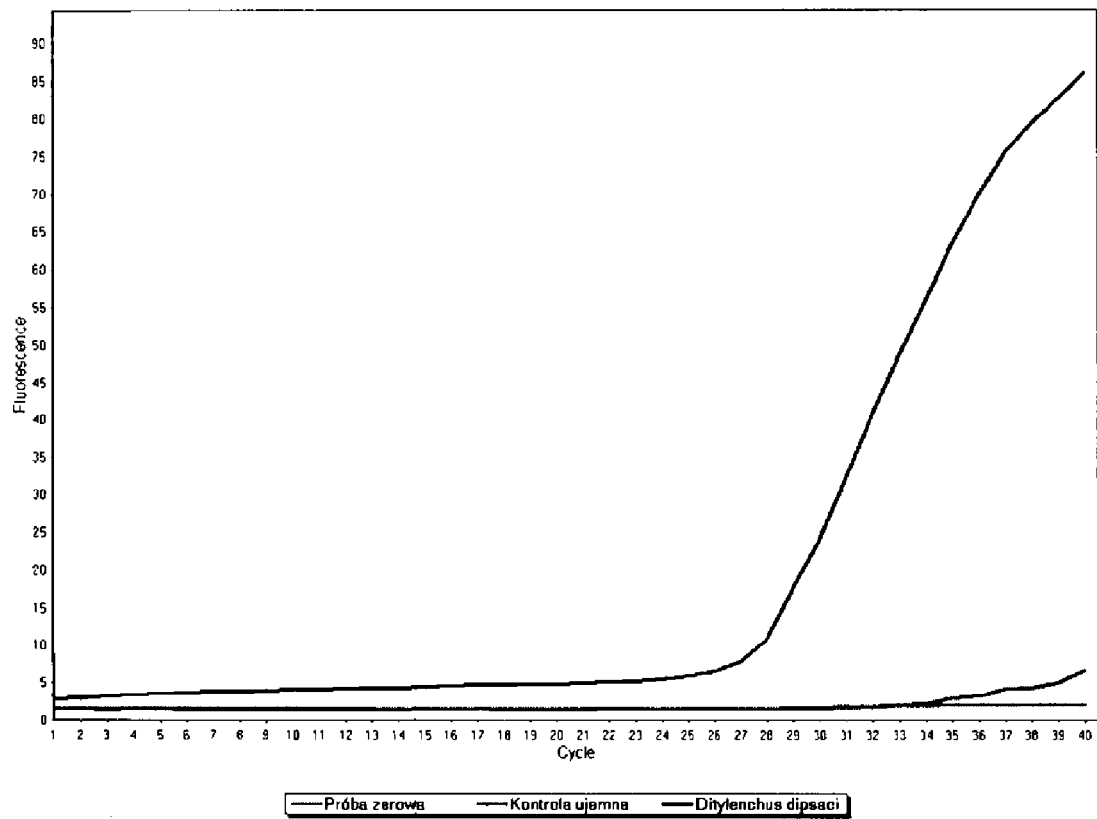


Fig. 4

