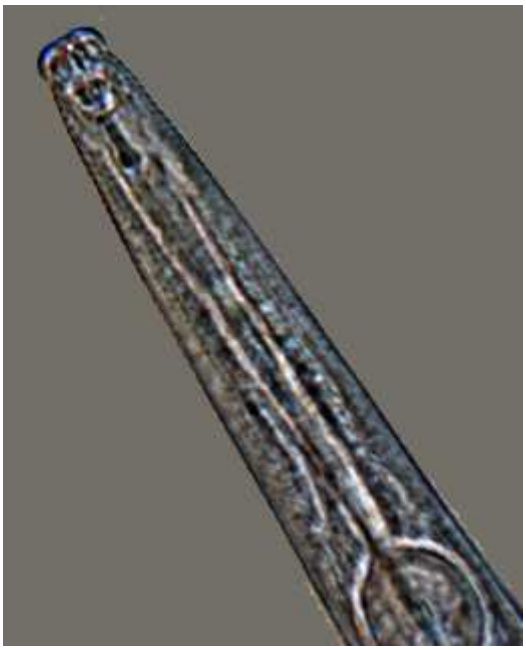
INSTYTUT SADOWNICTWA I
KWIACIARSTWA im. SZCZEPANA
PIENIĄZKA



Diagnostyka nicieni liściowych z rodzaju *Aphelenchoides*

Instrukcja wykrywania nicieni za pomocą metod morfologiczno-metrycznych i molekularnych

SKIERNIEWICE 2010

Autorzy opracowania: mgr ANETA CHAŁAŃSKA

prof. dr hab. GABRIEL ŁABANOWSKI

dr hab. TADEUSZ MALEWSKI

Recenzenci: prof. dr hab. Małgorzata Korbin
prof. dr hab. Remigiusz Olszak

Opracowanie redakcyjne: Mgr Teresa Ligocka

Autorzy fotografii:

mgr Aneta Chałańska

Program Wieloletni 2008-2014

1.4 Wykrywanie i oznaczanie nicieni kwarantannowych podlegających obowiązkowi zwalczania, określenie ich występowania na terenie kraju oraz zapobieganie ich rozprzestrzenianiu się

ISBN 978-83-60573-46-4

Copyright by Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa im. Szczepana Pieniążka

Nakład: 150 egz.

Opracowanie graficzne: Agencja Reklamowo-Wydawnicza Estet

SPIS TREŚCI

1. Przygotowanie materiału do diagnostyki metodą klasyczną
   I. Pobieranie prób i wykrywanie nicieni …….4
   II. Izolacja i utrwalanie materiału biologicznego ……...5
   III. Opracowanie utrwalonego materiału biologicznego …….……6
2. Identyfikacja rodzaju *Aphelenchoides* metodą mikroskopową
   I. Cechy diagnostyczne ……7
   II. Dane morfometryczne ……..……..17
3. Wykrywanie nicieni z rodzaju *Aphelenchoides* na podstawie analizy molekularnej
   I. Metodyka testów molekularnych ……..….18
   II. Ocena przydatności metody qRT-PCR do wykrywania wybranych gatunków nicieni z rodzaju *Aphelenchoides* dla potrzeb oznaczeń ilościowych ……...……...20
4. Literatura ……..……24

1. Przygotowanie materiału do diagnostyki metodą klasyczną

I. POBIERANIE PRÓB I WYKRYWANIE NICIENI

W rodzaju *Aphelenchoides* status organizmu kwarantannowego posiada obecnie jedynie węgorek ryżowiec (*Aphelenchoides besseyi*). Przepisy fitosanitarne obejmują wykrywanie tego gatunku w nasionach ryżu (*Oryza sativa*) oraz w roślinach z rodzaju *Fragaria* przeznaczonych do sadzenia. Nicień ten żeruje i może dawać podobne objawy na roślinach jak inne węgorki liściowe: węgorek chryzantemowiec (*A. ritzemabosi*) oraz węgorek truskawkowiec (*A. fragariae*). Wszystkie wymienione gatunki nicieni są polifagami i mogą zasiedlać rośliny należące do różnych rodzin botanicznych. Ilustracje uszkodzeń krzewów ozdobnych i bylin powodowane przez nicienie z rodzaju *Aphelenchoides* zamieszczono w 'Instrukcji wykrywania nicieni na podstawie uszkodzeń roślin ozdobnych' (Chałańska, Łabanowski 2010).

W celu wykrycia nicieni z podejrzanych roślin należy pobrać do badań minimum 5g liści uszkodzonych. W laboratorium liście należy pociąć na fragmenty w o szerokości około centymetra i umieścić na sicie o średnicy oczek 1 cm, z podstawką (np. duża szalka Petriego), do której wlewamy wodę. Materiał roślinny zanurzony w wodzie należy pozostawić na co najmniej kilka godzin, a najlepiej na całą dobę. Po tym czasie wodę z naczynia zlewamy na sito o średnicy oczek 20-30 µm. Zawartość sita spłukujemy na szalkę i umieszczamy pod mikroskopem stereoskopowym. W świetle przechodzącym i przy powiększeniu 40-krotnym sprawdzamy, czy są nicienie.

II. IZOLACJA I UTRWALANIE MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO

Do badań mikroskopowych nicienie utrwalamy w 4-6% roztworze formaldehydu lub mieszaninie TAF, a następnie przygotowujemy preparaty stałe. Do badań molekularnych przeznaczamy nicienie żywe lub zakonserwowane w mieszaninie DESS.

SKŁAD UTRWALACZA TAF

7 ml 40% formaldehydu

2 ml trietyloaminy — Składniki należy wymieszać

91 ml wody destylowanej

Postępowanie z próbą

Pozyskane z liści nicienie przekładamy do fiolki, zbierając pipetą nadmiar wody. Nicienie zabijamy przez podgrzanie fiolki nad palnikiem spirytusowym (nie dopuszczając do wrzenia) lub przez kąpiel w gorącej wodzie o temp 60-70 °C i umieszczamy w zimnym utrwalaczu TAF. Nicienie utrwalone w ten sposób można przechowywać przez kilka lat.

SKŁAD UTRWALACZA DESS

0.25M kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA) o pH 7.5

20% dimetylosulfotlenku (DMSO)

roztwór nasycony NaCl

A. W celu przygotowania 250 ml roztworu odmierzamy 23.265g EDTA. Dodajemy 50 ml dejonizowanej wody i mieszamy. Mieszanina ma odczyn kwaśny (pH 3-4).
B. Dodajemy do roztworu A, około 50 ml 1M NaOH do uzyskania odczynu EDTA o pH 7,5.
C. Dodajemy do roztworu B, 50 ml DMSO i uzupełniamy do objętości 250 ml dejonizowaną wodą.
D. Dodajemy do roztworu C, NaCl aż przestanie się w nim rozpuszczać.

Z przygotowanego roztworu może wytrącać się osad NaCl.

Postępowanie z próbą

Pozyskane z liści nicienie przenosimy do utrwalacza DESS, w którym mogą być przechowywane zarówno w temperaturze pokojowej jak i w chłodziarce. Przed wykonaniem analiz molekularnych nicienie wyjęte z utrwalacza DESS należy przepłukać kilka minut w zwykłej wodzie. Nicienie utrwalone w ten sposób można przechowywać około roku.

III. OPRACOWANIE UTRWALONEGO MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO

Nicienie utrwalone w TAF można opracowywać podobnie jak utrwalone w formalinie.

METODA I

Opracowana na podstawie metodyki Seinhorsta (Wilski, 1973). Nicienie utrwalone w TAF (próba) przenosimy do krystalizatora lub innego szklanego naczynia z **mieszaniną 1** (20 ml metanolu, 1 ml gliceryny, 79 ml wody destylowanej). Wstawiamy krystalizator lub inne naczynie szklane z próbą do eksykatora z czystym alkoholem 96%. Po 24 godzinach uzupełniamy próbę **mieszaniną 2** (95 ml metanolu, 5 ml gliceryny) i umieszczamy w suszarce w temp 40°C. Podczas suszenia próbę uzupełniamy **mieszaniną 2** 4-5-krotnie co 20 minut, a następnie 5-8-krotnie co 30 minut. Krystalizator lub inne naczynie szklane przykrywamy szkiełkiem i pozostawiamy na noc w suszarce. Następnego dnia, po wyjęciu z suszarki, nicienie są gotowe do wykonania preparatów trwałych.

METODA II

Nicienie utrwalone w TAF przenosimy najpierw do 5% roztworu gliceryny w wodzie ze śladowymi ilościami utrwalacza TAF, po czym roztwór ten odparowujemy przez około 10 dni z użyciem powolnej metody odparowywania w temperaturze 40°C, do chwili uzyskania gliceryny bezwodnej (Hooper 1986).

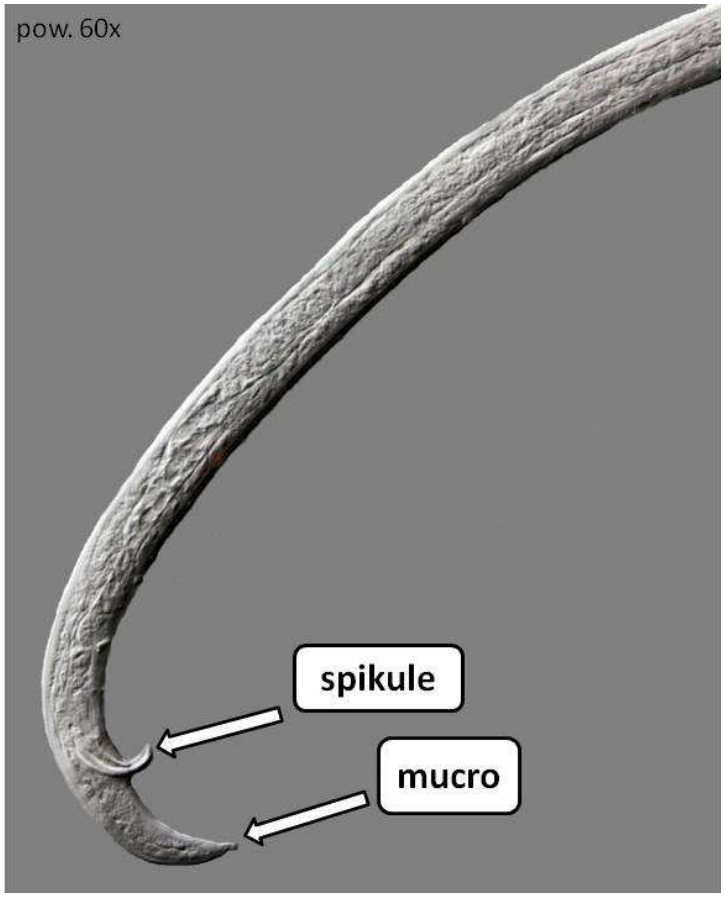
Trwałe preparaty nicieni wykonujemy w glicerynie bezwodnej.

2. Identyfikacja rodzaju *Aphelenchoides* metodą mikroskopową

I. CECHY DIAGNOSTYCZNE

Rodzaj: *Aphelenchoides*

Przedstawiciele tego rodzaju są małych bądź bardzo małych rozmiarów, ich długość waha się między 0,2 a 1,3 mm. Pierścieniowanie oskórka na ciele delikatne. Pole boczne złożone zwykle z 2-4 linii (Fig.2). Głowa lekko oddzielona od reszty ciała. Sztylet cienki, zwykle z małymi guzami przy podstawie. Środkowe rozszerzenie gardzieli duże, owalne. Gruczoł gardzieli zachodzi na przedni odcinek jelita od strony grzbietowej. Otworek wydalniczy mały, położony za rozszerzeniem środkowym gardzieli (Fig. 1). Jego położenie często określane jest także wobec węzła nerwowego (obrączki nerwowej)*. U samic narządy rozrodcze pojedyncze. Woreczek zapochwowy zwykle obecny. U samców szczecinki kopulacyjne (spikule) są krótkie (10-25 µm) i nie ma torebki kopulacyjnej. Ogon u większości gatunków stożkowaty, zakończony wyrostkiem (mucro) o różnym kształcie (Fot. 1, Fig.3).



Fot.1 Spikule samca z rodzaju *Aphelenchoides* na przykładzie *A. besseyi*

*** - węzeł nerwowy**: płaski pas, zawierający komórki neuronów ułożone wokół gardzieli. Położony jest za rozszerzeniem środkowym gardzieli. U węgorków wąski i słabo widoczny.

Rodzaj *Aphelenchoides* można odróżnić na od innych rodzajów z rzędu Aphelenchoidea na podstawie wyglądu gardzieli, wyglądu pola bocznego i liczby linii bocznych, kształcie ogona (Tab.1)

Porównanie cech diagnostycznych rodzaju *Aphelenchus* i *Aphelenchoides*

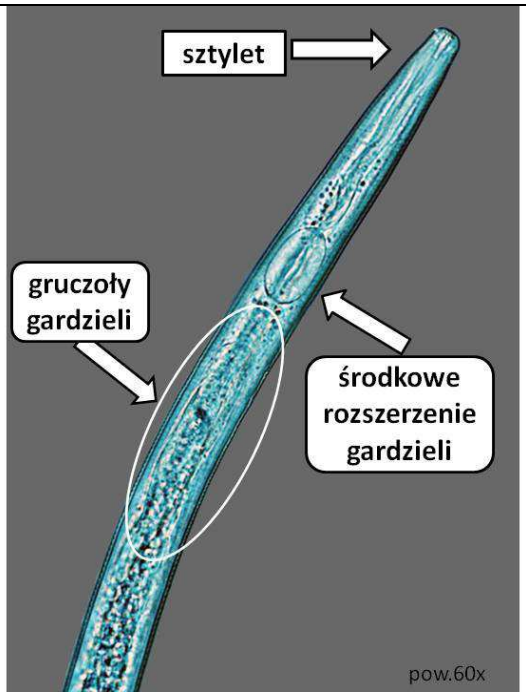
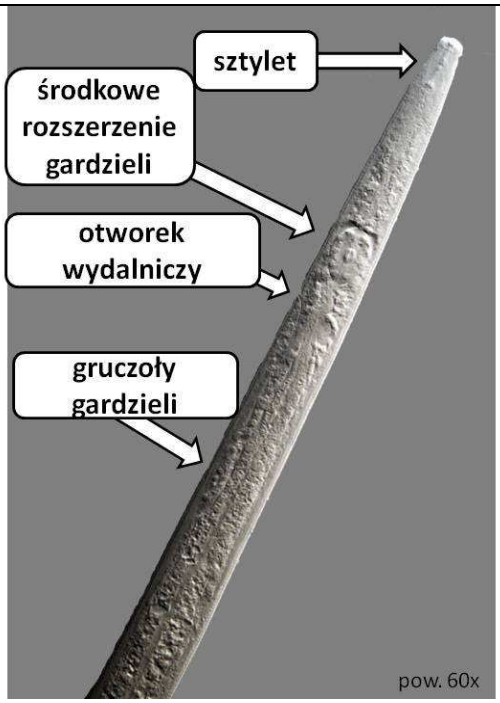
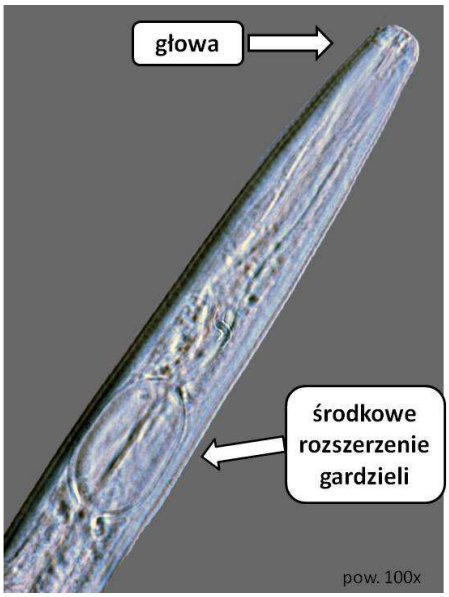
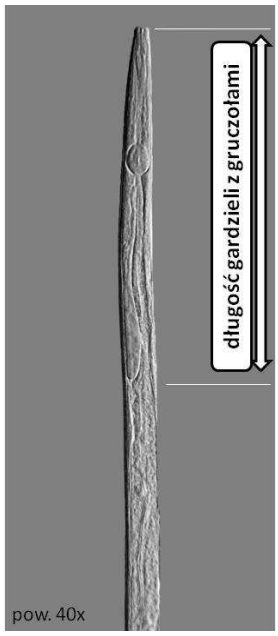
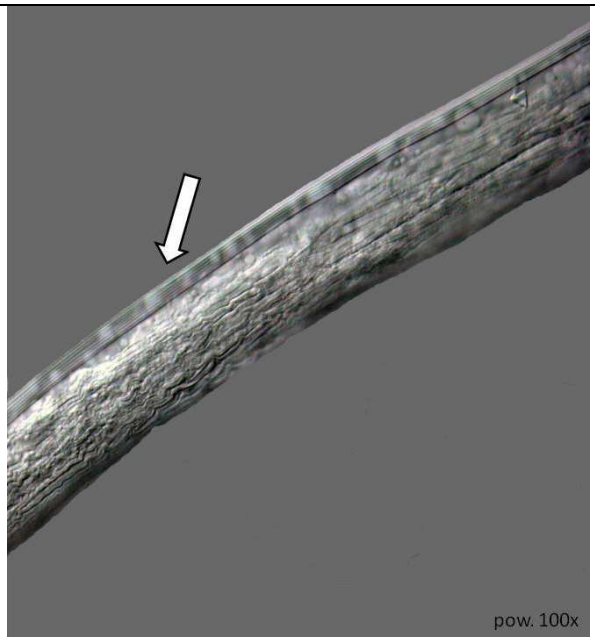
Aphelenchus	*Aphelenchoides*
Fig 1. PRZEDNIA CZĘŚĆ CIAŁA	
	
	

Fig. 2 POLE BOCZNE WRAZ Z LINIAMI BOCZNYMI



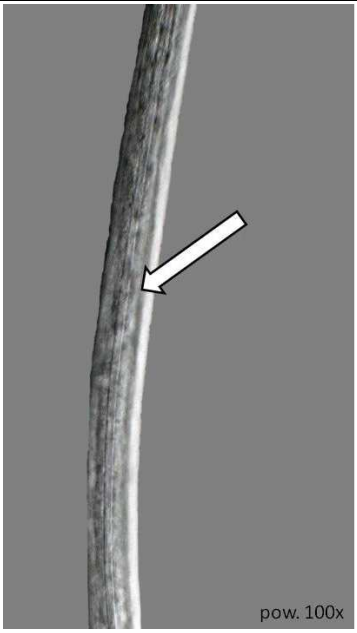


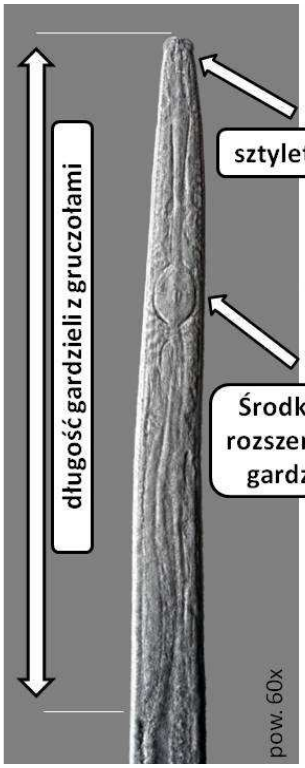
Fig. 3 OGON

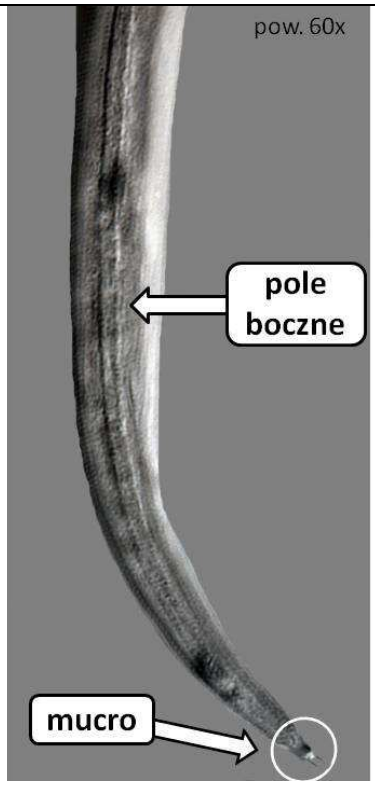
WĘGOREK CHRYZANTEMOWIEC – *APHELENCHOIDES RITZEMABOSI* (SCHWARZ, 1911) STEINER & BUHRER, 1932

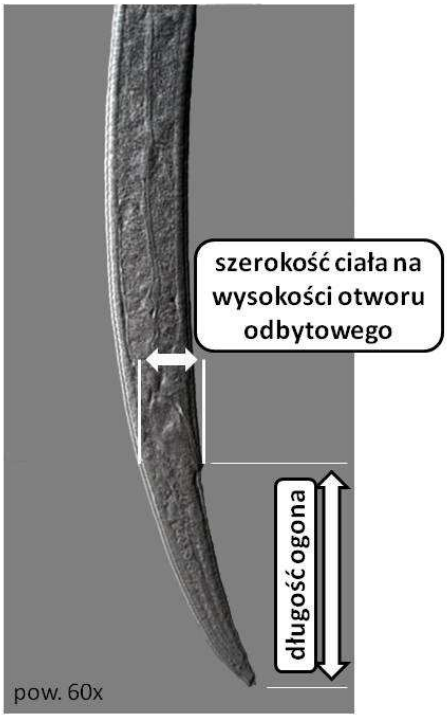
Samica (Fig. 4): ciało smukłe, długości 680-1200 µm (Wilski 1967, Tab.2). Głowa widocznie wyodrębniona od reszty ciała, trochę szersza niż ciało u nasady głowy. Pod mikroskopem świetlnym pierścieniowanie oskórka ciała niewidoczne. Sztylet z niedużymi, ale wyraźnymi guzami przy podstawie. Rozszerzenie środkowe gardzieli duże, w zarysie owalne, mocno umięśnione. Otworek wydalniczy umieszczony poniżej brzegu węzła nerwowego, w dużej odległości od środkowego rozszerzenia gardzieli: 0,5-2-krotności szerokości ciała. Pole boczne 1/6-1/5 szerokości ciała, z 4 liniami. Woreczek zapochwowy dłuższy niż 5-krotna szerokość ciała lub połowa odległości między wulwą a otworem odbytowym. Woreczek często wypełniony jest spermą. Ogon wydłużony, stożkowaty. Na końcu ogona wyrostek (mucro) z 2-4 szczecinkami, w formie pędzelka.

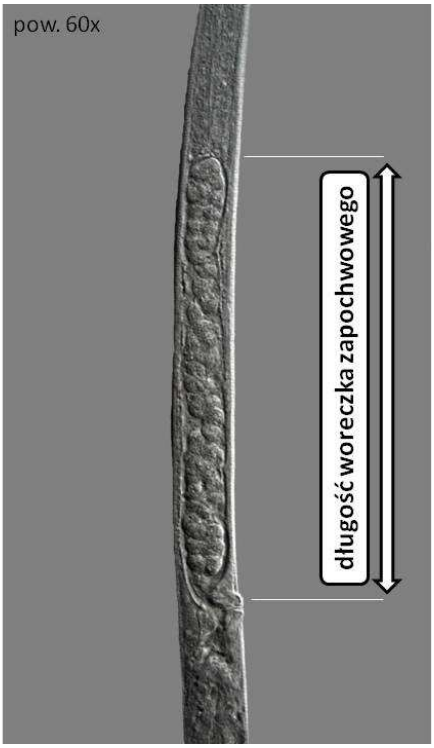
Samce: często spotykane. Po uśmierceniu tylna część ciała zwykle wygina się do 90 stopni. Głowa, sztylet i gardziel podobne jak u samicy. Szczecinki kopulacyjne (spikule) delikatnie zagięte.

Fig 4. CECHY DIAGNOSTYCZNE WĘGORKA CHRYZANTEMOWCA







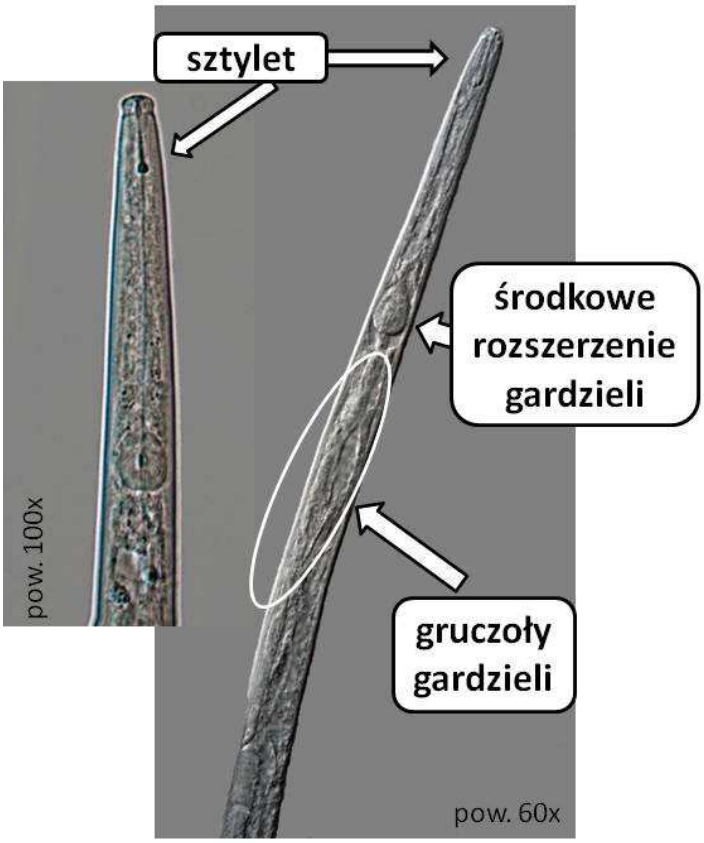


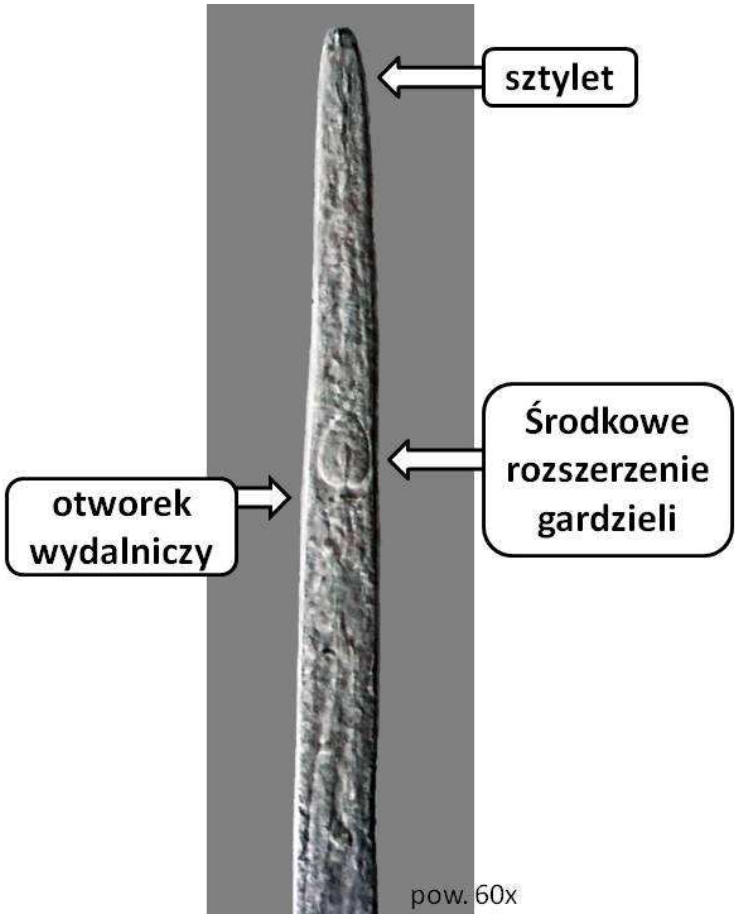
WĘGOREK TRUSKAWKOWIEC – *APHELENCHOIDES FRAGARIAE* (RITZEMA-BOS, 1891) CHRISTIE, 1932

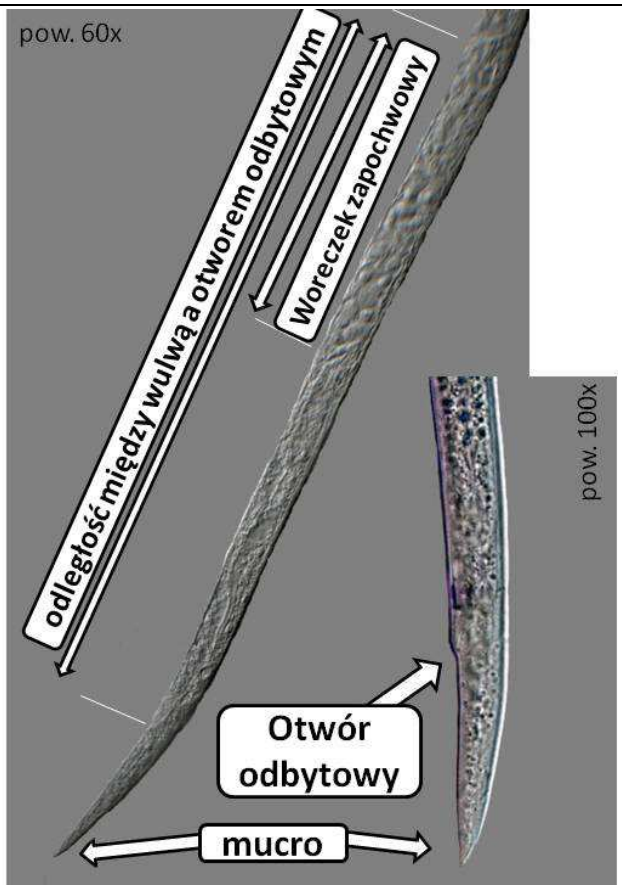
Samica (Fig. 5): ciało smukłe, długości 450-895 µm (Khan i inni 2007, Wilski 1967, Tab.2), po uśmierceniu wyprostowane lub łukowato wygięte. Głowa nieznacznie szersza niż ciało u nasady głowy i słabo wyodrębniona. Guzy sztyletu małe, ale wyraźne. Otworek wydalniczy umiejscowiony w niedużej odległości od środkowego rozszerzenia gardzieli: na wysokości węzła nerwowego lub tuż za nim. Węzeł nerwowy położony jest w odległości jednej szerokości ciała za środkowym rozszerzeniem gardzieli. Środkowe rozszerzenie gardzieli owalne, mocno umięśnione. Pole boczne wąskie, 1/7 szerokości ciała, złożone z 2 linii. Wargi wulwy lekko wydęte. Woreczek zapochwowy dłuższy niż 5-krotna szerokość ciała lub połowa odległości między wulwą a otworem odbytowym, często wypełniony spermą. Ogon wydłużony, stożkowaty, zakończony pojedynczym wyrostkiem (mucro) tępo zakończonym.

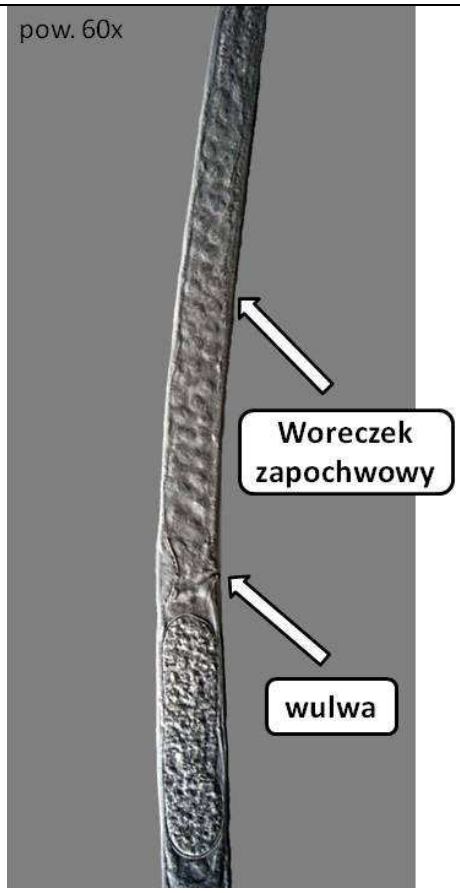
Samce: liczne, podobne do samic. Ogon z pojedynczym wyrostkiem tępo zakończonym. Po uśmierceniu wygina się łukowato pod kątem 45-90 stopni. Szczecinki kopulacyjne (spikule) o wyglądzie kolca róży.

Fig. 5 CECHY DIAGNOSTYCZNE WĘGORKA TRUSKAWKOWCA







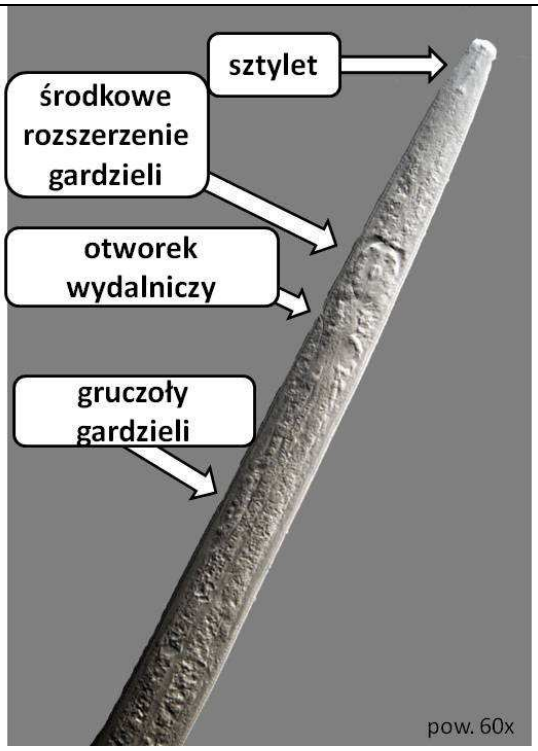


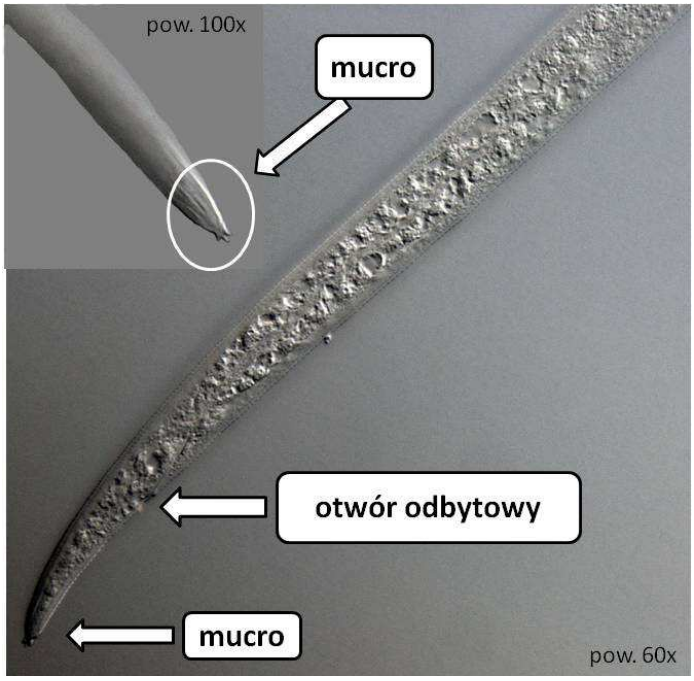
WĘGOREK RYŻOWIEC – *APHELENCHOIDES BESSEYI* CHRISTIE, 1942

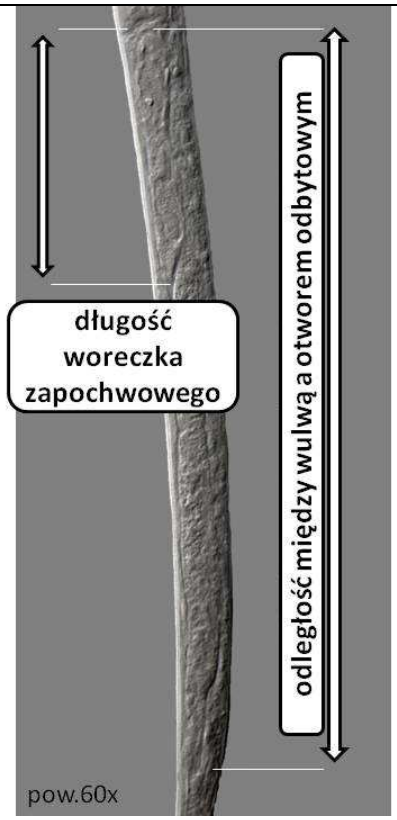
Samica (Fig. 6): ciało długości 400-880 µm (Fortuner 1970, Tab.2). Głowa zaokrąglona, trochę szersza od ciała u nasady głowy. Wysokość głowy mniejsza niż jej szerokość. Sztylet z niewielkimi guzami u podstawy. Środkowe rozszerzenie gardzieli kształtu owalnego. Otworek wydalniczy umiejscowiony na wysokości węzła nerwowego lub przed nim, w niewielkiej odległości od środkowego rozszerzenia. Boczne pola stanowią około ¼ szerokości ciała, z 4 liniami. Woreczek zapochwowy dość krótki, mniej niż 4-krotna szerokość ciała, wąski. Ogon stożkowaty z wyrostkiem (mucro) w kształcie gwiazdy z 3-4 szczecinkami ostro zakończonymi.

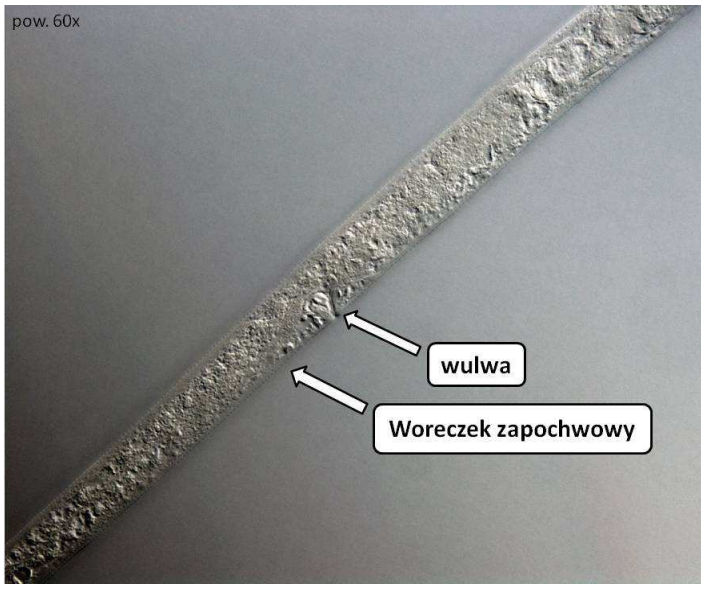
Samce: często spotykane. Podobne do samic. Na końcu ogona wyrostek (mucro) z 2-4 szczecinkami.

Fig. 6. CECHY DIAGNOSTYCZNE WĘGORKA RYŻOWCA









II. DANE MORFOMETRYCZNE

Morfometrię wykonano na 10 samicach każdego z gatunków węgorka przy powiększeniu 100x. Osobniki *Aphelenchoides ritzemabosi* ekstrahowano z próbek liści *Budleia dawidii* 'Peakeep' zebranych w Końskowoli 1 czerwca 2010 r. Osobniki *A. fragariae* z liści truskawki pochodziły ze zbiorów prof. A. Szczygła z 1976 r. Osobniki *A. besseyi* pochodziły z Veracruz (Hiszpania) z ryżu z 2010 r. i oznaczone zostały przez Lee Robertsona.

Tabela 1. Dane morfometryczne nicieni z rodzaju *Aphelenchoides*. W tabeli zakres wartości (X_1-X_{10}) poszczególnych cech, średnia ($X_{śr.}$) ± odchylenie standardowe (SD) przy n = 10

Cecha		*A. ritzemabosi*	*A. fragariae*	*A.besseyi*
Długość ciała w µm	X_1-X_{10} Xśr.±SD	680,1-944,3 826,6±77,7	598,4-835,0 752,0±90,2	538,2-711,1 651,5±65,8
Długość sztyletu w µm	X_1-X_{10} Xśr.±SD	12,2-13,0 12,5±0,3	10,2-11,5 10,7±0,4	10,2-12,3 11,3±0,6
Długość ogona w µm	X_1-X_{10} Xśr.±SD	32,1-46,9 40,5±4,4	34,6-52,8 44,2±6,3	32,1-40,9 36,2±3,2
PUS%	X_1-X_{10} Xśr.±SD	35,3-66,2 52,0±0,1	33,3-73,5 57,7±0,1	11,8-23,6 16,5±0,04
a	X_1-X_{10} Xśr.±SD	45,2-51,3 48,3±2,0	48,2-58,6 53,1±3,0	39,0-44,1 41,6±1,6
b'	X_1-X_{10} Xśr.±SD	4,4-5,4 5,0±0,4	4,4-6,3 5,2±0,6	3,9-6,1 5,4±0,6
c	X_1-X_{10} Xśr.±SD	16,7-23,7 20,6±2,5	12,6-19,3 17,2±1,9	15,5-20,0 18,1±1,6
c'	X_1-X_{10} Xśr.±SD	3,0-4,3 3,8±0,4	4,3-5,9 4,9±0,4	3,3-4,7 3,8±0,4
VA/T	X_1-X_{10} Xśr.±SD	4,2-6,5 5,1±0,7	2,9-5,1 4,2±0,7	3,7-5,2 4,4±0,5
V%	X_1-X_{10} Xśr.±SD	66,9-71,0 69,6±1,2	61,0-72,7 68,2±3,4	68,0-72,0 69,9±1,1

Objaśnienia:

- **a** – stosunek długości ciała do szerokości ciała
- **b'** – stosunek długości ciała do długości gardzieli wraz z płatem gruczołowym
- **c** – stosunek długości ciała do długości ogona
- **c'** – stosunek długości ogona do szerokości ciała na wysokości otworu odbytowego
- **PUS%** – stosunek długości woreczka zapochwowego do odległości od wulwy do otworu odbytowego (V/A) x 100
- **V%** – stosunek odległości od przodu ciała do wulwy do długości ciała x 100
- **VA/T** – stosunek odległości od wulwy do otworu odbytowego do długości ogona

Tabela 2. Wartości t-Studenta dla dwóch średnich porównywanych cech – wartość tabelaryczna $t_{0,05}$ przy d.f. 18 = 1,734; $t_{0,01}$ przy d.f. 18 = 2,552

	A. ritzemabosi	*A. fragariae*
Długość ciała		
A. besseyi	43,02*	23,70*
A. fragariae	16,95*	
Długość sztyletu		
A. besseyi	3,75*	1,77
A. fragariae	6,43*	
Długość ogona		
A. besseyi	4,57*	7,62*
A. fragariae	3,33*	
PUS%		
A. besseyi	273,1*	316,9*
A. fragariae	38,0*	
a		
A. besseyi	10,47*	15,75*
A. fragariae	6,32*	
b’		
A. besseyi	1,18	0,54
A. fragariae	0,59	
c		
A. besseyi	3,62*	1,43
A. fragariae	4,79*	
c’		
A. besseyi	0,00	3,67*
A. fragariae	3,67*	
VA/T		
A. besseyi	1,89	0,54
A. fragariae	2,25	
V%		
A. besseyi	0,59	0,69
A. fragariae	1,92	

* różnica statystycznie istotna

Aphelenchoides besseyi łatwo odróżnić od *A. ritzemabosi* po takich cechach jak: długość ciała, długość sztyletu, długość ogona, PUS %, wartości „a” i „c”, a od *A. fragariae* po takich cechach jak: długość ciała, długość ogona, PUS %, wartości „a” i „c’” , gdyż uzyskano istotne zróżnicowanie wartości średnich wymienionych cech.

Do rozróżniania *Aphelenchoides besseyi* od *A. ritzemabosi* nie należy brać takich cech jak: b’, c’, VA/T, V%, a od *A. fragariae* takich cech jak długość sztyletu, b’, c, VA/T i V%, gdyż nie uzyskano istotnego zróżnicowania wartości średnich wymienionych cech.

3. Wykrywanie nicieni z rodzaju *Aphelenchoides* na podstawie analizy molekularnej

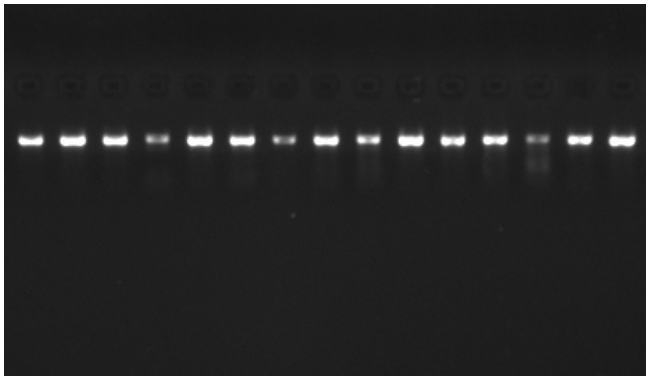
I. METODYKA TESTÓW MOLEKULARNYCH

Etap I. Izolacja DNA na kolumienkach z dwutlenkiem krzemu

Tkanki nicieni należy rozgnieść tak, aby przynajmniej częściowo je zmacerować. Izolację DNA na kolumienkach z dwutlenkiem krzemu przeprowadza się w oparciu o zestawy komercyjne firm np.: Sigma-Aldrich (GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit); Qiagen (DNeasy Isolation Kit), A & A Biotechnology (Genomic Mini), Promega (Vizard Genomic DNA).

Do rozgniecionych nicieni dodaje się bufor do lizy (wg. instrukcji producenta), a następnie proteinazę K, która trawi białka w temperaturze 55 ^{0}C. Trawienie trwa około 4 godzin (zgodnie z zaleceniami producenta enzymu). Można także pozostawić próbkę do trawienia na całą noc. Następnie do lizatu dodaje się odczynniki zapewniające optymalne wiązanie DNA z dwutlenkiem krzemu wg. instrukcji producenta. Lizat nanosi się na uprzednio przygotowaną kolumienkę ze złożem dwutlenku krzemu i wiruje. Podczas wirowania roztwór jest sączony przez złoże, które wiąże DNA. W następnym etapie na kolumienkę dodawany jest roztwór do odpłukania substancji niewiążących się ze złożem. Oczyszczone DNA wymywane jest ze złoża 100 µl wody lub roztworu do elucji.

Kwasy nukleinowe selektywnie pochłaniają światło UV z maksimum przypadającym na 260 nm. Stężenie wydzielonego DNA mierzy się spektrofotometrycznie przy długości fali 260 nm (1OD = 50 µg/ml). Czystość preparatów DNA określa się spektrofotometrycznie przy długości fali A220, A260, A280. Wartość współczynnika A260/A280 dla preparatu zawierającego DNA bez zanieczyszczeń białkowych powinna wynosić 1,8-2. Niskie wartości A220/A260 wskazują na brak zanieczyszczeń preparatu polisacharydami.
Jakość wyizolowanego DNA można także ocenić za pomocą elektroforezy w 1% żelu agarozowym wybarwionym bromkiem etydyny (stęż. 0,5 µg/ml). Jeden prążek migrujący w pobliżu miejsca naniesienia preparatu na żel świadczy o tym, że DNA nie zostało zdegradowane przez DNazy (Fot. 2). Wyizolowany DNA należy przechowywać w temperaturze -20°C lub -70°C.



Fot. 2. Przykład elektroforezy preparatów DNA w żelu agarozowym

Etap II. Reakcja real-time PCR

Standardowym markerem do identyfikacji gatunków nicieni jest gen I podjednostki oksydazy cytochromowej (COI). Gatunkowo-specyficzną parę starterów można zaprojektować korzystając z odpowiedniego oprogramowania (np. AlleleID, PremierBiosoft).

Do przeprowadzenia analizy potrzebny jest aparat do Real Time PCR obecnie produkowany przez wiele firm (np. seria Rotorgene, CorbettResearch; SmartCycler, Cepheid; MiniOpticon, MyiQ2, CFX, Biorad; OneStepPlus, 7500, 7900HT, AppliedBiosystems), para starterów, dezoksyrybonukleotydy, jony magnezu, bufor, Taq polimeraza, barwniki (SYBR, EvaGreen, LCgreen i inne) lub znakowane sondy.

Podstawą reakcji Real Time PCR jest klasyczna łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR), obejmującej trzy etapy: denaturacja, przyłączanie starterów i wydłużanie nici DNA. Denaturacja jest prowadzona w temperaturze 94-95^{0}C, a przyłączanie starterów w temperaturze o 5^{0}C niższej od oznaczonej temperatury topnienia starterów. Wydłużanie łańcucha DNA następuje w temperaturze 72^{0}C. Ilość syntezowanego amplikonu mierzona jest w trakcie reakcji (zastosowanie w dalszych etapach badań do oznaczania ilościowego poszczególnych gatunków w próbie).

W każdej analizie powinny być obecne dwie próby kontrolne:
- pozytywna (zawierająca DNA nicienia, którego obecność próbujemy stwierdzić)
- negatywna (bez matrycy DNA, *ang.* non template control - NTC).

W próbach ujemnych brak jest krzywej amplifikacji lub pojawia się ona późno (> 35 cyklu), a wartości fluorescencji są niskie w porównaniu z wartościami w kontroli dodatniej (< 10%).

II. OCENA PRZYDATNOŚCI METODY qRT-PCR DO WYKRYWANIA WYBRANYCH GATUNKÓW NICIENI Z RODZAJU *APHELENCHOIDES* DLA POTRZEB OZNACZEŃ ILOŚCIOWYCH

1. Nicienie trawimy proteinazą K w ciągu nocy. DNA wymywamy 100 µl wody i przenosimy na kolumienki (np. GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit) (Sigma-Aldrich) zgodnie z instrukcją producenta.

2. Stężenie wydzielonego DNA mierzymy na spektrofotometrze.

3. Startery do identyfikacji nicieni wybranych gatunków

Aktualnie w GenBank dostępne są sekwencje COI czterech gatunków - *Aphelenchoides ritzemabosi* (GU367869.1); *A. xylocopae* (AB252222.1); *A. besseyi* (AY508072.1, EU325686.1, EU983281.1) i *A. fragariae* (AB067761.1). Gatunkowo-specyficzne pary starterów [forward (fw) i reverse (rw)] do amplifikacji COI zaprojektowano w programie AlleleID (PremierBiosoft).

A. ritzemabosi – Arifw (5'-GGGCTGGAACTAGTTGGGTA-3') i
Arirw (5'-TCTTTGCCTGTCTTAGCTGGA-3')

A.xylopae - Axyfw (5'-GTTGTGGTACAAGTTGAGTT-3') i
Axyrw (5'-TCTTTACCTGTTTTAGCTGGT-3')

A.besseyi - Abefw (5'-GGGCTGGGACTAGGTGGGTT-3') i
Aberw (5'-TCTTTACCTGTTTTGGCGGGA-3')

A.fragariae - Afrfw (5'-GGTGTGGAACTAGTTGGGTT-3') i
Afrrw (5'-TCTTTACCGGTCTTAGCTGGT-3')

W celu uzyskania kontrolnych preparatów DNA do identyfikacji wszystkich czterech gatunków należy zsyntetyzować DNA o sekwencjach opisanych w GenBanku (długość produktu ok. 250 par zasad, synteza np. w Sigma-Aldrich).

4. Real Time PCR

Reakcję Real-Time PCR przeprowadzamy przy użyciu odpowiedniej aparatury (np. aparatu RotorGene 6000) (Corbett Research), w probówkach o pojemności 0,2 ml. Reakcję należy przeprowadzać w sterylnych warunkach, w 20 µl mieszaniny reakcyjnej w składzie:

- 10 µl LuminoCt SYBR Green qPCR ReadyMix (Sigma-Aldrich)
- 4 µl 5 mM odpowiedniej pary starterów
- 10 ng wyizolowanego DNA
- dopełnić wodą do 20 µl

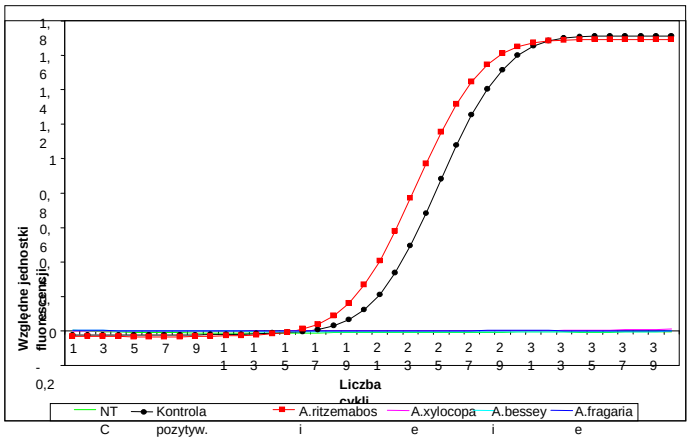
Optymalny profil termiczny reakcji jest następujący:

- Wstępna denaturacja 95°C, 3 min
- Właściwa reakcja:
    - denaturacja 95°C, 10 sek
    - przyłączanie starterów 50°C, 15 sek
    - amplifikacja w 72°C, 20 sek.

Wyniki reakcji Real Time PCR

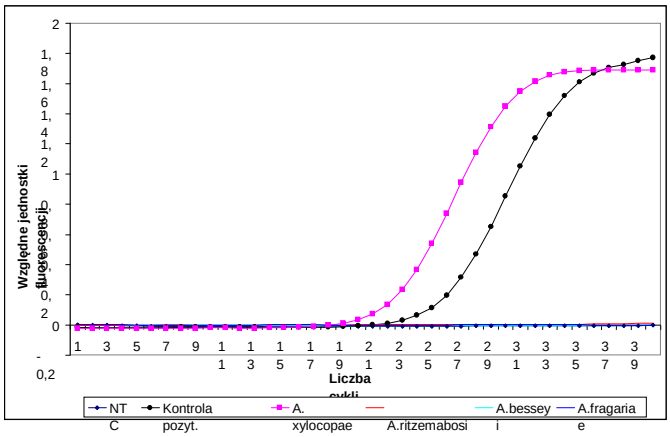
Identyfikacja *A. ritzemabosi*

Reakcja przeprowadzona z parą starterów Arifw – Arirw. Krzywa amplifikacji jest widoczna tylko w kontroli dodatniej i *A. ritzemabosi*. W próbce NTC oraz próbach zawierających DNA *A. xylocopae*, *A. besseyi* i *A. fragariae* brak krzywej amplifikacji.



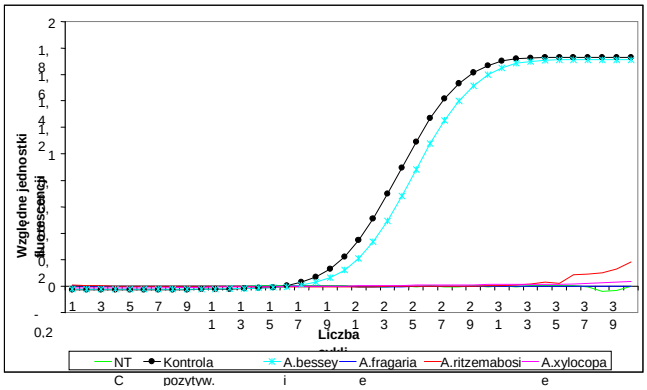
Identyfikacja *A. xylocopae*

Reakcja przeprowadzona z parą starterów Axyfw – Aaxyrw. Krzywa amplifikacji jest widoczna tylko w kontroli dodatniej i *A. xylocopae*. Brak krzywej amplifikacji w próbce NTC oraz próbach zawierających DNA *A. ritzemabosi*, A. *besseyi* i *A. fragariae*.



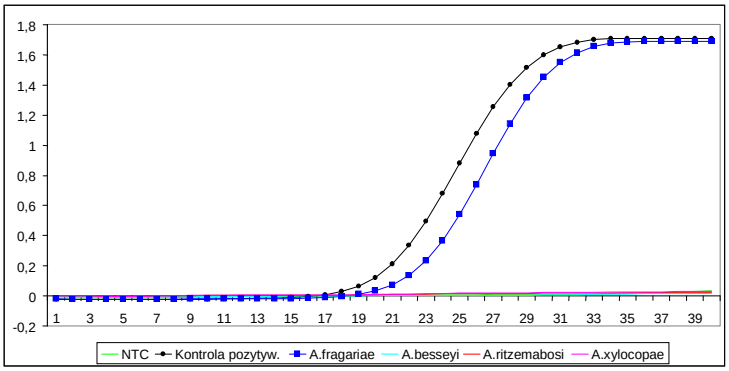
Identyfikacja *A. besseyi*

Reakcja przeprowadzona z parą starterów Abefw – Aberw. Krzywa amplifikacji jest widoczna tylko w kontroli pozytywnej i *A. besseyi*. Brak krzywej amplifikacji w próbce NTC oraz próbach zawierających DNA *A. xylocopae*, *A. ritzemabosi* i *A. fragariae*.



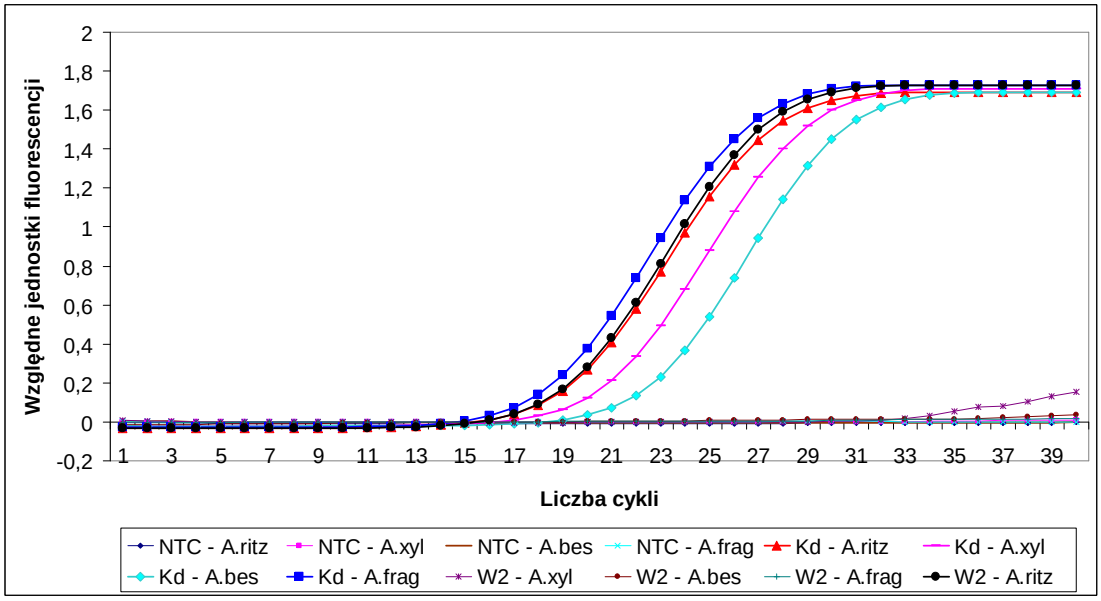
Identyfikacja *A. fragariae*

Reakcja przeprowadzona z parą starterów Afrfw – Afrrw. Krzywa amplifikacji jest widoczna tylko w kontroli dodatniej i *A. fragariae*. Brak krzywej amplifikacji w próbce NTC oraz próbach zawierających DNA *A. xylocopae*, *A. besseyi* i *A. ritzemabosi*.



Identyfikacja przynależności gatunkowej danej próby na podstawie reakcji Real Time PCR przeprowadzonej z kilkoma z parami starterów

Reakcja Real Time PCR przeprowadzona może być ze wszystkimi podanymi parami starterów: Arifw – Arirw, Axyfw – Axyrw, Abefw – Aberw i Afrfw – Afrrw. Wyniki przedstawione są poniżej:



Brak krzywej amplifikacji w kontrolach NTC. Pozytywna reakcja w próbkach z kontrolami dodatnimi. Brak krzywej amplifikacji próby ze starterami do identyfikacji *A. xylocopae*, *A.besseyi* i *A. fragariae* oraz obecność krzywej ze starterami do *A.ritzemabosi*.

NTC-A.ritz – kontrola NTC ze starterami do identyfikacji *A.ritzemabosi*

NTC-A.xyl – kontrola NTC ze starterami do identyfikacji *A.xylocopae*

NTC-A.bes – kontrola NTC ze starterami do identyfikacji *A.besseyi*

NTC-A.frag – kontrola NTC ze starterami do identyfikacji *A.fragariae*

Kd-A.ritz – kontrola dodatnia ze starterami do identyfikacji *A.ritzemabosi*

Kd-A.xyl – kontrola dodatnia ze starterami do identyfikacji *A.xylocopae*

Kd-A.bes – kontrola dodatnia ze starterami do identyfikacji *A.besseyi*

Kd-A.frag – kontrola dodatnia ze starterami do identyfikacji *A.fragariae*

Wnioski: Na podstawie badań przeprowadzonych na nicieniach gatunku *Aphelenchoides ritzemabosi* oraz DNA specyficznego dla nicieni z 3 innych gatunków zsyntetyzowanego sztucznie, określono warunki przeprowadzenia testów dla przyszłych analiz ilościowych.

4. Literatura

Dawson, Mike N., Raskoff, Kevin A., and Jacobs, David K. (1998) Field preservation of marine invertebrate tissue for DNA analyses. Molecular Marine Biology and Biotechnology 7(2): 145-152.

Dillon, N., Austin, A.D., and Bartowsky, E. (1996) Comparison of preservation techniques for DNA extraction from hymenopterus insects. Insect Molecular Biology 5(1): 21-24.

Fortuner R. 1970. On the morphology of *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942 and *A. siddiqii* n. sp. (Nematoda, Aphelenchoidea). J. Heminthology, vol. 49, no. 2: 141-152.

Hooper D.J. 1986. Handling. fixing. staining and mounting nematodes. s. 59–81.W: "Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes" (J.F. Southey, red.). MAFF, London.

Kilpatrick, C. William. (2002) Noncryogenic Preservation of Mammalian Tissues for DNA Extraction: An Assessment of Storage Methods. Biochemical Genetics 40(1/2): 53-62.

Seutin, G., White, B.N., Boag, P.T. (1991) Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie 69 (1): 82-90.

Wilski A. 1973. Nicienie Szkodniki Roślin Uprawnych. PWRiL, Warszawa: 334pp.