

2015/PP/TM

Sposób i zestaw do identyfikacji nicienia *Paratrichodorus pachydermus*, szkodnika roślin, metodą Real Time PCR

Przedmiotem wynalazku jest sposób i zestaw do identyfikacji nicienia *Paratrichodorus pachydermus*, szkodnika roślin metodą Real Time PCR.

Według najnowszej klasyfikacji w rodzinie Trichodoridae wykazano 11 gatunków. Wiele spośród nich to szkodniki roślin uprawnych. Porażone rośliny mają uszkodzony system korzeniowy, a zmniejszony pobór wody prowadzi do ich zamierania. 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 płytce 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.

15

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.

20
25

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

30

2015/PP/TM

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. 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. 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, AvaI, BamHI, BglII, BsiZI, BsuRI, Bsh1236I, Bsp143I, CfoI, DdeI, EcoRI, HpaII, HindIII, HinfI, KpnI, MvaI, PstI, PvuII, PsaI, Sall, SfuI, SspI, ScrFI, TaqI, Tru9I i XbaI, dzięki czemu wyodrębnili 27 różnych gatunków i typów nicieni w próbie.

2015/PP/TM

Ponadto, badania populacji nicieni z wykorzystaniem PCR-RFLP prowadzili García D., García G., Montero Z., Salazar L., Brenes A. i Gómez-Alpizar L. w pracy Morphological and molecular identification of potato cyst-forming nematode *Globodera pallida* in soil samples from Costa Rica, Revista Latinoamericana de la Papa (2009), 15 (1): 38-45.

- 5 Subbotin S. A., Halford P. D. i Perry Roland N. w swojej publikacji z 1999 roku Identification of populations of potato cyst nematodes from Russia using protein electrophoresis, rDNA-RFLPs and RAPDs, Russian Journal of Nematology (1999), 7 (1): 57-63 dodatkowo zastosowali metodę RAPD – Randomly Amplified Polymorphic DNA (metoda losowej amplifikacji polimorficznego DNA). Metoda ta wykorzystuje tylko jeden
- 10 krótki (około 10-20 nukleotydów) starter, przebiega w niższej temperaturze (około 35°C), ale jednocześnie wymaga zwiększonej ilości cykli w stosunku do standardowego PCR – aż 40-50. W wyniku analizy elektroforetycznej uzyskuje się różnej długości prążki, których układ jest charakterystyczny dla osobnika i stanowi coś w rodzaju odcisku palca (fingerprint). Metodę PCR-RAPD zastosowali również Adam M. A. M., Phillips M. S. i
- 15 Blok V. C. w pracy opisującej molekularne metody identyfikacji guzaków – Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.), Plant Pathology (2007), 56: 190-197.

Najnowsze podejście do molekularnych metod identyfikacji nicieni polega na

20 zastosowaniu łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym. Madani M., Subbotin S. A. i Moens M. w Quantitative detection of the potato cyst nematode, *Globodera pallida*, and the beet cyst nematode, *Heterodera schachtii*, using Real-Time PCR with SYBR green I dye, Molecular and Cellular Probes (2005), 19: 81-86 wykorzystali do szybkiej identyfikacji gatunku specyficzne startery i barwnik

25 fluorescencyjny SYBR Green I. Wykorzystali oni mieszanke starterów opisanych we wcześniejszych publikacjach – 0,1 µM każdego ze starterów: SH6Mod 5'-CGT GTT CTT ACG TTA CTT CAA-3', SH4 5'-AGC ATG CGA AGG ATT GG-3', PITSp4 5'-ACA ACA GCA ATC GTC GAG-3' oraz Pal3 5'-ATG TTT GGG CTG GCA C-3', 12 µl barwnika i 4 µl DNA próbki w łącznej objętości końcowej 25 µl.

30

Startery oraz enzymy restrykcyjne do identyfikacji 23 gatunków nicieni metodą PCR-RFLP należących do rodzajów *Nanidorus*, *Paratrichodorus* i *Trichodorus*, między innymi do identyfikacji gatunku *Paratrichodorus pachydermus*, opisali Kumari S i Subbotin SA w publikacji Molecular characterization and diagnostics of stubby root and virus vector

2015/PP/TM

nematodes of the family Trichodoridae (Nematoda: Triplonchida) using ribosomal RNA genes. 2012. Plant Pathology 61(6): 1021-1031.

Przy aktualnym stanie techniki istnieje nadal potrzeba dostarczenia narzędzia umożliwiającego detekcję gatunków nicieni, które dotychczas nie były identyfikowane 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 nicienia *Paratrichodorus pachydermus* z dużą czułością i specyficznością oraz dostarczenie nowych sekwencji nukleotydowych starterów i sondy, mających zastosowanie w sposobie wykrywanie 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 nicienia *Paratrichodorus pachydermus* w próbce gleby, obejmujący następujące etapy:

a) dostarczenie próbki gleby zawierające nicienie do identyfikacji;

b) wyflukanie 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 gatunku *Paratrichodorus pachydermus* w reakcji PCR, zwłaszcza, Real-Time PCR stosuje się właściwe dla danego gatunku startery 3' i 5' oraz sondę:

| Gatunek | 5' starter | | 3' starter | | Sonda | |
|------------------------------------|------------|------------------------|------------|--------------------------|-------|-----------------------------|
| | Nazwa | Sekwencja | Nazwa | Sekwencja | Nazwa | Sekwencja |
| <i>Paratrichodorus pachydermus</i> | Ppafv | GGTTGTTGCTGTC GGATA | Pparrv | CACCAAAGAACT GAGGTTTA | Ppas | CGTTATCTCTGAGCTG ATCGACC |

2015/PP/TM

Przedmiotem wynalazku jest również zestaw do identyfikacji nicienia *Paratrichodorus pachydermus*, metodą PCR, zwłaszcza Real –Time PCR, zawierający właściwe dla danego gatunku startery 3' i 5' oraz sondę:

| Gatunek | 5' starter | | 3' starter | | Sonda | |
|------------------------------------|------------|------------------------|------------|-----------------------|-------|-----------------------------|
| | Nazwa | Sekwencja | Nazwa | Sekwencja | Nazwa | Sekwencja |
| <i>Paratrichodorus pachydermus</i> | Ppafv | GGTTGTTGCTGTC GGATA | Pparrv | CACCAAAGA GAGGTTTA | Ppas | CGTTATCTCTGAGCTG ATCGACC |

5

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.

10

Fig. 1 Przedstawia krzywe amplifikacji dla *Paratrichodorus pachydermus*.

15

Poniżej podano przykład identyfikacji *Paratrichodorus pachydermus*. 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.

Przykład

20

Identyfikacja nicieni z gatunku *Paratrichodorus pachydermus*.

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 |
|---------------|-------------------------|
| Ppafv | GGTTGTTGCTGTCGGATA |
| Pparrv | CACCAAAGA GAGGTTTA |
| Ppas | CGTTATCTCTGAGCTGATCGACC |

25

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 ReadyMix (Sigma-Aldrich) w następujących ilościach:

2015/PP/TM

- H₂O wolna od nukleaz do objętości 20 µl,
- 2 µl 10,0 µM każdego ze starterów Ppafv i Pparv,
- 1µl 4,0 µM sondy Ppas znakowanej na końcu 5' barwnikiem JOE, a 3'-końcu wygaszaczem HBQ1,
- 5 - 10 µl 2X LuminoCt qPCR ReadyMix (Sigma-Aldrich),
- 2 µl DNA.

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

10

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

Kontrolę negatywną stanowiło DNA nicienia *Paratrichodorus teres*.

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

15

Rozwiązanie według wynalazku pozwala na wykrycie nicienia *Paratrichodorus pachydermus* 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 wymienionego gatunku nicienia niezależnie od rodzaju prób badanych, ich pochodzenia i przeznaczenia oraz stadium

20

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

25

Zgłaszający: Muzeum i Instytut Zoologii PAN

Pełnomocnik:

MUZEUM I INSTYTUT ZOOLOGII
POLSKA AKADEMIA NAUK
00-679 Warszawa, ul. Wileza 64
NIP: 525-000-86-89, REGON: 016912059

Dyrektor
Prof. dr hab. Wiesław Bogdanowicz