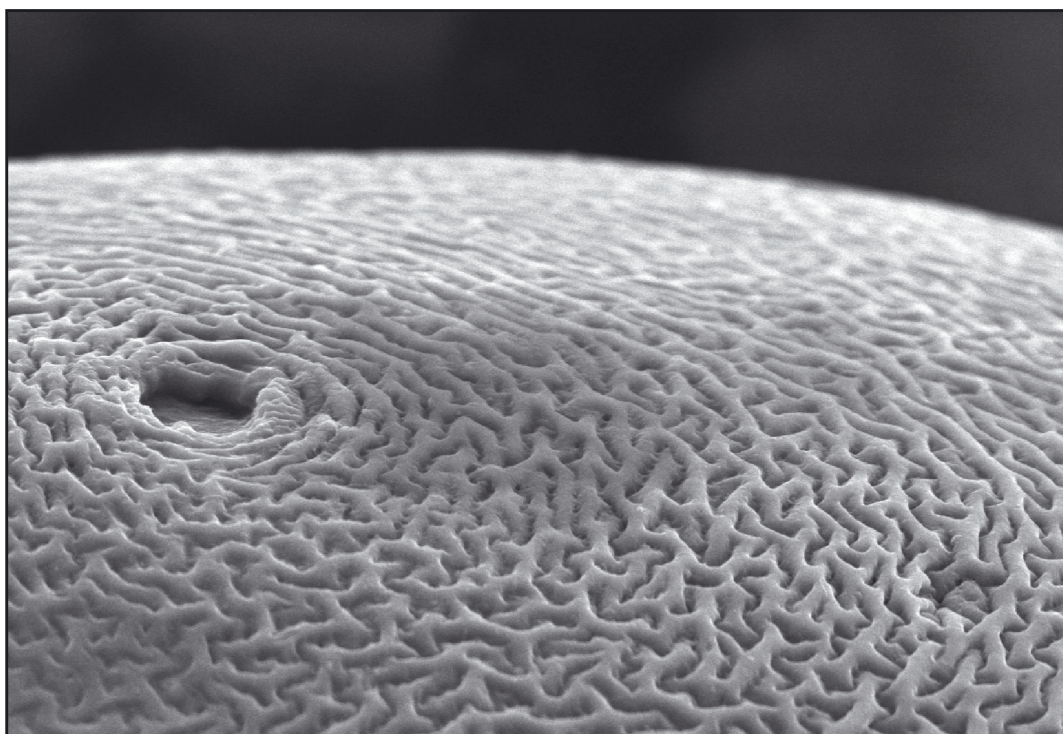


**INSTYTUT OCHRONY ROŚLIN
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY**



Diagnostyka Nicieni

pasożytów roślin objętych regulacjami prawnymi



**Instrukcja rozpoznawania gatunków
z rodzaju *Globodera***

POZNAŃ 2013

**INSTYTUT OCHRONY ROŚLIN
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY**

Dyrektor – prof. dr hab. Danuta SOSNOWSKA

ZAKŁAD TRANSFERU WIEDZY I INNOWACJI

Kierownik – dr Stefan WOLNY

ul. Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań

tel: 61 864 90 27, fax: 61 867 63 01

e-mail: upowszechnianie@iorpib.poznan.pl

**Redaktor wydawnictw
upowszechnieniowych i wdrożeniowych:**

Dr Stefan Wolny

Recenzent:

Prof. dr hab. Marek Tomalak

Autorzy opracowania:

Dr Renata Dobosz

Mgr Marta Budziszewska

Mgr Katarzyna Nowaczyk

Dr hab. Aleksandra Obrepalska-Stęplowska

Autorzy fotografii:

Dr Renata Dobosz

Mgr Magdalena Gawlak

Program Wieloletni 2011–2015

2.3. Określanie zakresu zmienności morfologicznej i molekularnej nicieni-
pasożytów roślin w celu identyfikacji gatunków objętych regulacjami prawnymi

ISBN 978-83-89867-92-6

© Copyright by Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy

Wydanie II – poprawione i uzupełnione

Nakład: 150 egz.

Opracowanie graficzne oraz projekt okładki: mgr inż. Dominik Krawczyk

Druk: TOTEM, Jacewska 89, 88-100 Inowrocław, tel. 52 354 00 40,

<http://www.totem.com.pl>

SPIS TREŚCI

1. IDENTYFIKACJA NA PODSTAWIE CECH MORFOLOGICZNYCH ORAZ WSKAŹNIKÓW MORFOMETRYCZNYCH	5
1.1. Selekcja cyst należących do <i>Globodera</i>	5
1.2. Identyfikacja gatunku	7
Charakterystyka gatunków	9
2. IDENTYFIKACJA Z WYKORZYSTANIEM METOD BIOLOGII MOLEKULARNEJ	13
2.1. Identyfikacja <i>G. rostochiensis</i> i <i>G. artemisiae</i> metodą real-time PCR	13
2.1.1. Izolacja DNA	13
2.1.2. Reakcja real-time PCR	14
2.1.3. Analiza wyników	15
2.2. Identyfikacja <i>G. pallida</i> i <i>G. artemisiae</i> metodą real-time PCR	16
2.2.1. Izolacja DNA	16
2.2.2. Reakcja real-time PCR	17
2.2.3. Analiza wyników	20
2.2.4. Minimalizacja materiału do detekcji <i>G. pallida</i> i <i>G. artemisiae</i> oraz walidacja metody	20
2.3. Identyfikacja <i>G. rostochiensis</i> i <i>G. pallida</i> metodą PCR	22
2.3.1. Detekcja PCR z zastosowaniem metody Bulmana i Marshalla (1997)	22
2.3.2. Detekcja PCR z zastosowaniem metody Zouhara i wsp. (2000)	23
2.3.3. Analiza wyników	23
3. LITERATURA	24

Spośród opisanych dotąd 14 gatunków należących do rodzaju *Globodera*, regulacjami prawnymi objęte zostały jedynie mątwik ziemniaczany (*G. rostochiensis*) oraz mątwik agresywny (*G. pallida*); pasożyty roślin należących do rodziny *Solanaceae*. Dla skutecznego zapobiegania rozprzestrzenianiu się obu tych gatunków niezbędne jest prawidłowe rozpoznanie każdego z nich, które w praktyce oparte jest na obserwacji diagnostycznych cech budowy zewnętrznej i wewnętrznej oraz identyfikacji z zastosowaniem technik biologii molekularnej. Niniejsze opracowanie dostarcza narzędzi służących identyfikacji obu tych kwarantannowych gatunków nicieni oraz wyodrębnieniu ich spośród gatunków, które nie podlegają regulacjom prawnym: *G. millefolii* (Kirjanowa et Krall, 1965) oraz *G. artemisiae* (Eroshenko et Kazachenko, 1972).

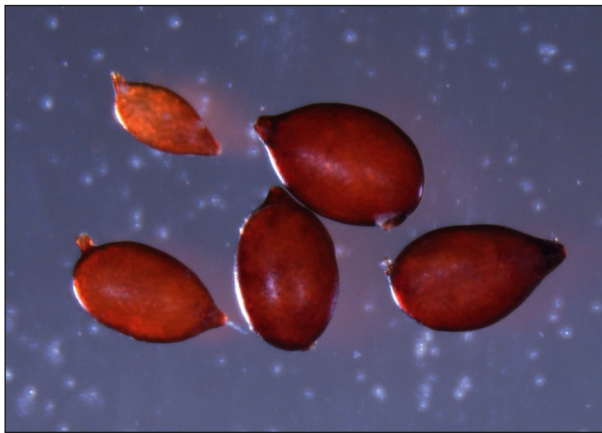
1. IDENTYFIKACJA NA PODSTAWIE CECH MORFOLOGICZNYCH ORAZ WSKAŹNIKÓW MORFOMETRYCZNYCH

1.1. Selekcja cyst należących do rodzaju *Globodera*

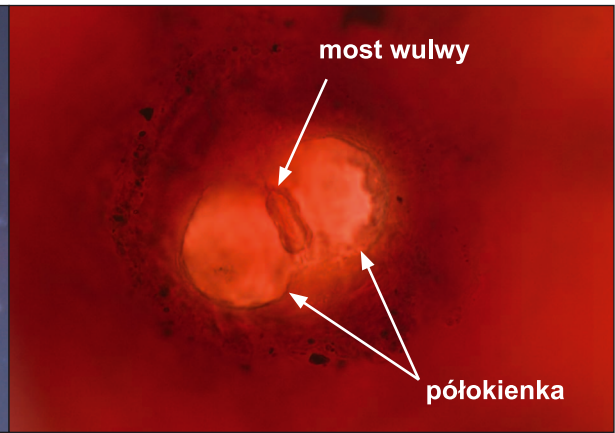
Zaszeregowanie wyizolowanych cyst do rodzaju odbywa się na podstawie kształtu cysty oraz budowy okolicy wulwy. Obserwacja typu okienka jest ważnym etapem identyfikacji w jego początkowej fazie, gdyż cysty w kształcie jaja można znaleźć zarówno w rodzaju *Globodera* jak i *Punctodera*. Typ okienka można prawidłowo rozróżnić przy odpowiednim ułożeniu cysty, już przy powiększeniu 40x, uzyskiwanym przy pracy z mikroskopem stereoskopowym.

Klucz do rozpoznawania rodzajów nicieni, pasożytów roślin tworzących cysty występujących w glebach Rzeczypospolitej Polskiej

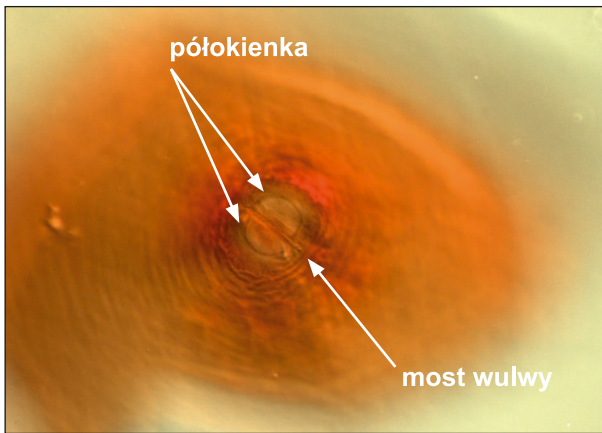
- Cysta w kształcie cytryny, tylna część cysty – stożek wulwy dobrze wykształcony, okienko typu bifenestralnego lub ambifenestralnego ***Heterodera*** (fot. 1–3)
- Cysta w kształcie jaja, określana również workowata, tylna część cysty zaokrąglona (brak wyraźnie wykształconego stożka wulwalnego), okienko typu circumfenestralnego z wyraźnym okienkiem otworu odbytowego ***Punctodera*** (fot. 4–5)
- Cysta okrągła, w kształcie jaja lub o kształcie nieregularnym, brak wyraźnie wykształconego stożka wulwy, okienko typu circumfenestralnego, otwór odbytowy w formie punktu ***Globodera*** (fot. 6–7)



Fot. 1. Cysty *Heterodera schachtii*



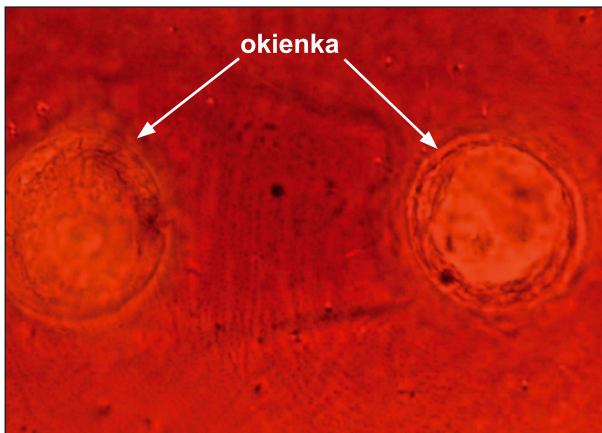
Fot. 2. Okienko typu bifenestralnego *H. avenae*



Fot. 3. Okienko typu ambifenestralnego *H. schachtii*



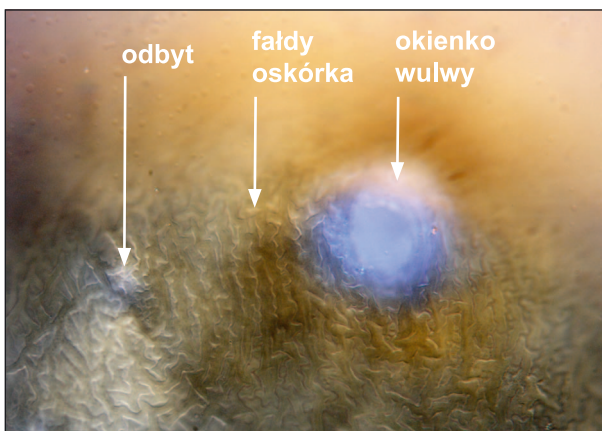
Fot. 4. Cysty *Punctodera* sp.



Fot. 5. Okienko typu circumfenestralnego *Punctodera* sp.



Fot. 6. Cysty *Globodera artemisiae*



Fot. 7. Okienko typu circumfenestralnego *Globodera rostochiensis*

1.2. Identyfikacja gatunku

Prawidłowe rozpoznanie gatunku *Globodera* umożliwia obserwacja zestawu cech morfologicznych i wskaźników morfometrycznych cyst i osobników młodocianych drugiego stadium oraz analizy DNA.

Diagnostyczne cechy budowy cyst:

- indeks/wskaźnik Graneka (odległość odbytu do najbliższej krawędzi okienka wulwnego podzielona przez średnicę tego okienka);
- liczba fałdów oskórka między okienkiem wulwalnym i odbytem.

Diagnostyczne cechy budowy osobników młodocianych drugiego stadium:

- długość sztyletu oraz kształt jego guzów, a także długość ciała, długość ogona oraz długość hyalinowej (przezroczystej) części ogona. Zestawienie cech diagnostycznych oraz zakresy ich zmienności przedstawia tabela 1.

Tabela 1. Cechy diagnostyczne oraz zakresy zmienności cech wykorzystywanych w diagnostyce gatunków z rodzaju *Globodera*

Stadium	Cecha*	Gatunek			
		<i>G. millefolii</i>	<i>G. artemisiae</i>	<i>G. rostochiensis</i>	<i>G. pallida</i>
Cysty	indeks Graneka	0,3–1,9 (1,2–1,6)	0,6–3,5 (1–1,4)	1,3–9,5 (3,0–4,7)	1, 2–3,6 (2,1–2,5)
	liczba fałdów oskórka między okienkiem wulwalnym a odbytem	4–7 (6)	5–16 (7–8)	8–31 (17–20)	6–19 (10–12)
Larwy inwazyjne	długość sztyletu	24–27 (25)	18–29 (21–24)	19–23 (20–22)	23–25 (23–24)
	kształt guzów sztyletu	zaokrąglone	od zaokrąglonych do lekko wygiętych w części wierzchołkowej	od zaokrąglonych do lekko wygiętych w części wierzchołkowej	zwężone w szczytowej części, przypominające kotwicę

* w tabeli podano zakresy zmienności cech; w nawiasach umieszczono minimalne i maksymalne średnie. Dane morfometryczne przygotowano w oparciu o dane literaturowe oraz badania własne

- okienko bifenestralne: podzielone mostem wulwy na dwa okrągłe półokienka;
- okienko ambifenestralne: podzielone mostem wulwy na dwa półokienka półokrągłe;
- okienko circumfenestralne występujące u *Punctodera*: wulwa i odbytu znajdują się w okienkach o zbliżonej średnicy;
- okienko circumfenestralne występujące u *Globodera*: okienko wulwy okrągłe, odbytu w formie punktu.

Klucz do rozpoznawania gatunków nicieni pasożytów roślin z rodzaju *Globodera* występujących w glebach Rzeczypospolitej Polskiej

1. Średnia liczba fałdów oskórka ścianki cysty, znajdujących się między otworem odbytowym i najbliższą jemu krawędzią okienka wulwy < 10; średnia wartość indeksu Graneka w populacji < 2 2
–. Średnia liczba fałdów oskórka ścianki cysty, znajdujących się między otworem odbytowym i najbliższą jemu krawędzią okienka wulwy ≥ 10; średnia wartość indeksu Graneka w populacji > 2 3

2. Średnia długość sztyletu osobników młodocianych drugiego stadium w populacji ≥ 25 μm, guzy sztyletu zaokrąglone ***G. millefolii***
–. Średnia długość sztyletu osobników młodocianych drugiego stadium w populacji < 25 μm, guzy sztyletu zaokrąglone lub w kształcie kotwicy ***G. artemisiae***

3. Średnia długość sztyletu osobników młodocianych drugiego stadium w populacji > 23 μm, guzy szkieletu w kształcie kotwicy ***G. pallida***
–. Średnia długość sztyletu osobników młodocianych drugiego stadium w populacji < 23 μm, guzy sztyletu zaokrąglone lub w kształcie kotwicy ***G. rostochiensis***

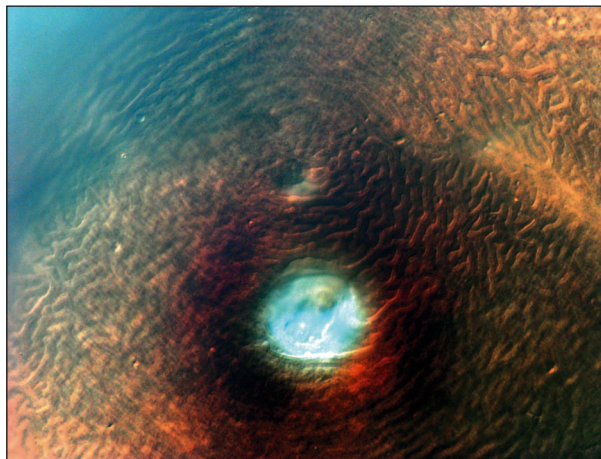
CHARAKTERYSTYKA GATUNKÓW

Globodera millefolii

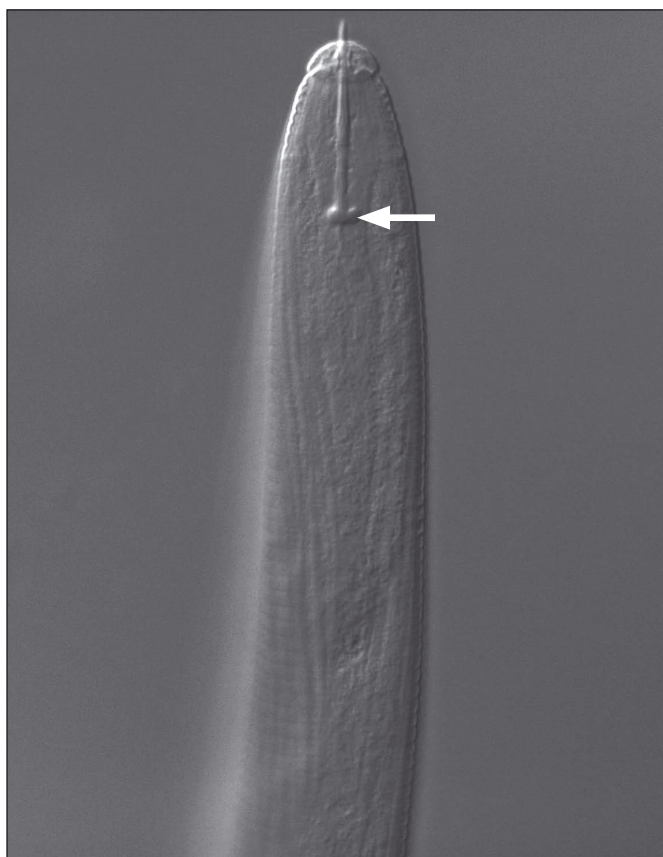
(Kirjanowa et Krall, 1965)

Cysty barwy od jasno do ciemnobrazowej, okrągłe, jajowate lub nieregularnych kształtów, długości od 0,38 do 0,85 mm i szerokości od 0,32 do 0,6 mm. Na ściance cysty widoczne liczne punkty ułożone w regularne rzędy. Pomiedzy okienkiem wulwalnym i odbytem fałdy oskórka (fot. 8).

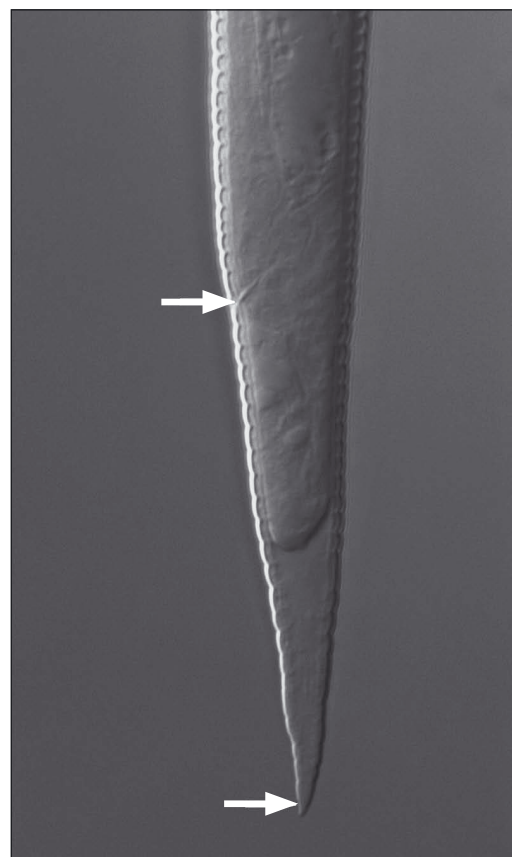
Osobniki młodociane drugiego stadium. Długość ciała w zakresie od 0,42 do 0,59 mm (obserwowana średnia minimalna: 0,49 mm; obserwowana średnia maksymalna: 0,52 mm). Szkielet głowy silnie załamujący światło. Guzy sztyletu zaokrąglone (fot. 9). Ogon 41–63 μm długi (obserwowana średnia minimalna: 49 μm ; obserwowana średnia maksymalna: 55 μm). Przezroczysta (hyalinowa) część długości od 15 do 39 μm (obserwowana średnia minimalna: 23 μm ; obserwowana średnia maksymalna: 30 μm). Koniec ogona zaokrąglony (fot. 10).



Fot. 8. Ścianka cysty *G. millefolii*



Fot. 9. *G. millefolii* – głowa z widocznymi guzami sztyletu osobnika młodocianego J2



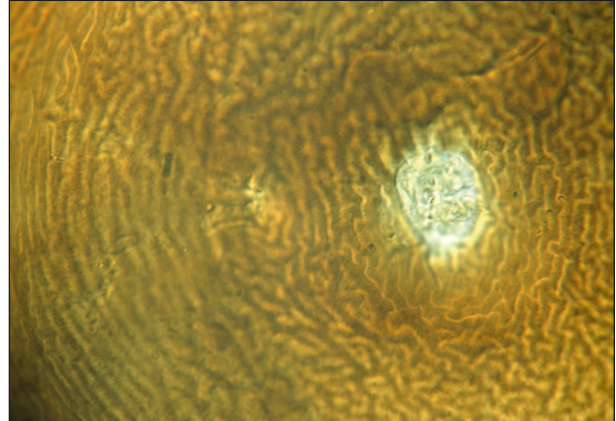
Fot. 10. *G. millefolii* – ogon osobnika młodocianego J2

Globodera artemisiae

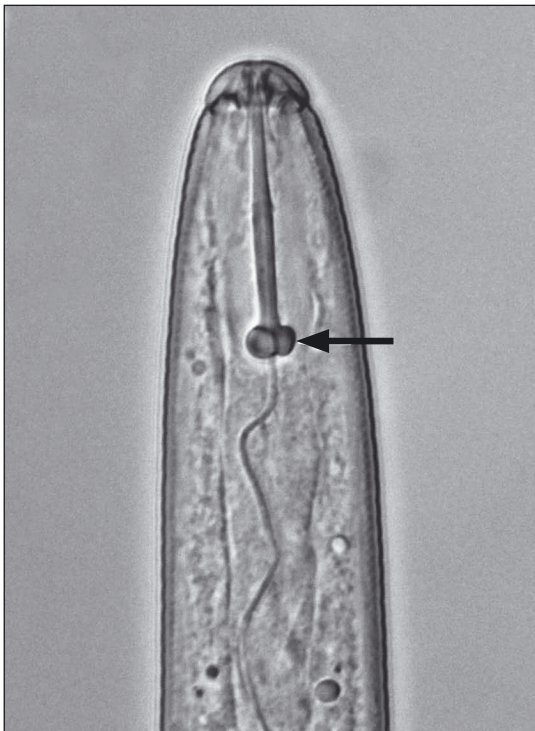
(Eroshenko et Kazachenko 1972)

Cysty koloru od jasno do ciemnobrazowego, okrągłe, jajowate lub nieregularnych kształtów, długości od 0,38 do 0,85 mm (obserwowana średnia minimalna: 0,45 mm; obserwowana średnia maksymalna: 0,49 mm) i szerokości od 0,32 do 0,6 mm (obserwowana średnia minimalna: 0,36 mm; obserwowana średnia maksymalna: 0,46 mm) (fot. 11). Między okienkiem wulwalnym a odbytem widoczne fałdy oskórka. Na ścianie cysty widoczne punkty ułożone w regularne rzędy lub rozmieszczone nieregularnie.

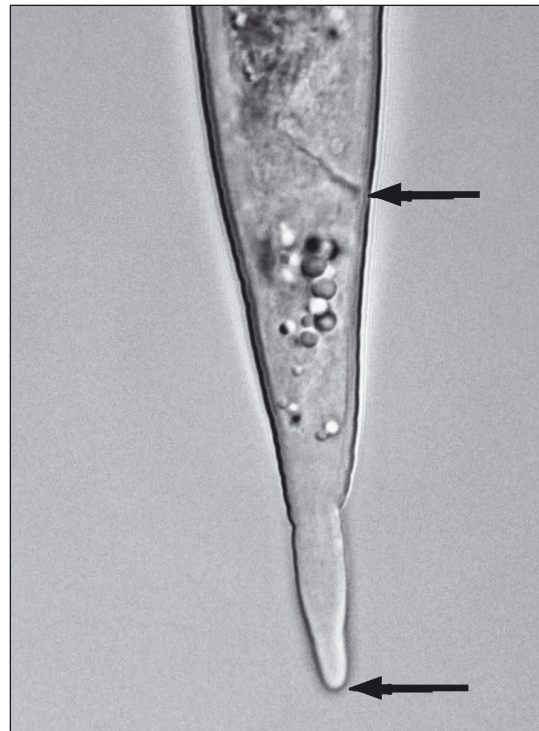
Osobniki młodociane drugiego stadium. Długość ciała od 0,36 do 0,52 mm (obserwowana średnia minimalna: 0,41 mm; obserwowana średnia maksymalna: 0,52 mm). Szkielet głowy silnie załamujący światło. Obserwowana zmienność kształtu guzów sztyletu: od zaokrąglonych do lekko wygiętych w części wierzchołkowej (fot. 12). Ogon długości od 33 do 69 μ m (obserwowana średnia minimalna: 40 μ m; obserwowana średnia maksymalna: 55 μ m). Około 50–55% długości ogona stanowi część przezroczysta (hyalinowa); (18–42 μ m; obserwowana średnia minimalna: 23 μ m; obserwowana średnia maksymalna: 26 μ m). Koniec ogona zaokrąglony (fot. 13).



Fot. 11. *G. artemisiae* – fragment ścianki cysty z widocznym okienkiem wulwy i odbytem



Fot. 12. *G. artemisiae* – głowa osobnika młodocianego J2 z widocznymi guzami sztyletu



Fot. 13. *G. artemisiae* – ogon osobnika młodocianego J2

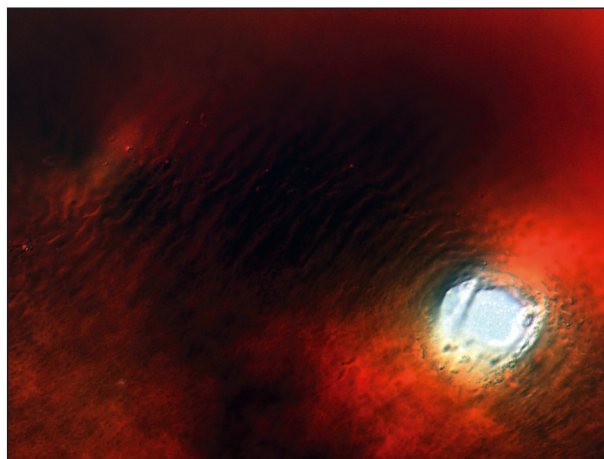
Globodera rostochiensis

(Wollenweber, 1923)

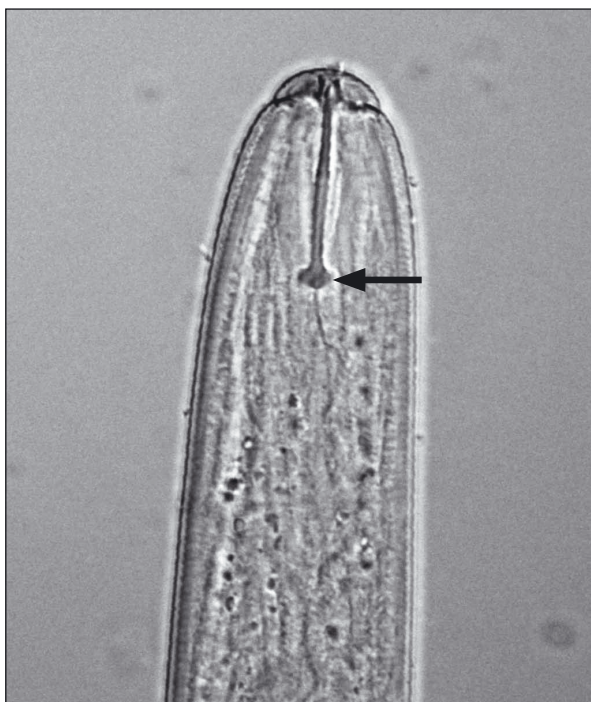
Cysty koloru od jasnego do ciemnobrazowego, okrągłe lub nieregularne i w kształcie zbliżonym do jajka, długości od 0,45–0,9 mm. (obserwowana średnia minimalna: 0,45 mm; obserwowana średnia maksymalna: 0,69 mm) oraz szerokości od 0,25–0,81 mm. (obserwowana średnia minimalna: 0,38 mm; obserwowana średnia maksymalna: 0,56 mm). Ścianka cysty z wyraźnymi rzędami punków lub punktami ułożonymi w nieregularne wzory. Fałdy oskórka widoczne między okienkiem wulwalnym a odbytem (fot. 14).

Osobniki młodociane drugiego stadium.

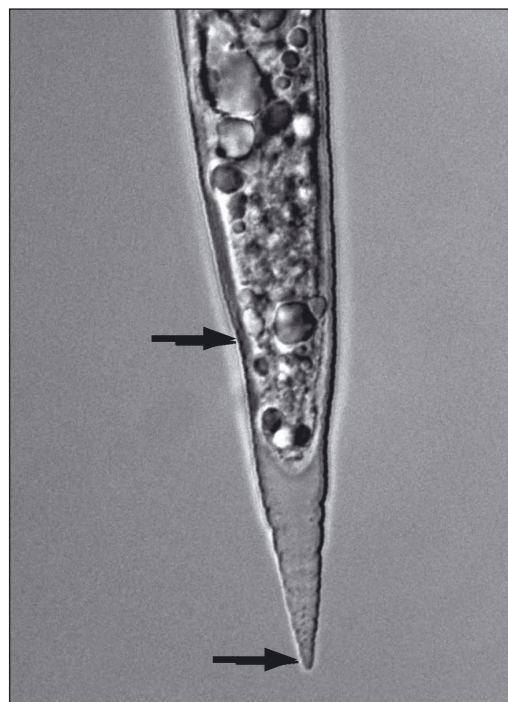
Ciało długości 0,37–0,56 mm. (obserwowana średnia minimalna: 0,39 mm; obserwowana średnia maksymalna: 0,49 mm). Szkielet głowy silnie odbijający światło. Guzy sztyletu od zaokrąglonych po lekko wygięte w części wierzchołkowej (fot. 15). Długość ogona w zakresie 36–70 μm (obserwowana średnia minimalna: 44 μm ; obserwowana średnia maksymalna: 51 μm). Część przezroczysta ogona (hyalinowa) stanowi 42–56% długości całego ogona, (długości 18–42 μm ; obserwowana średnia minimalna: 20 μm ; obserwowana średnia maksymalna: 27 μm). Koniec ogona zaokrąglony (fot. 16).



Fot. 14. Cysta *G. rostochiensis* z widocznym okienkiem wulwy i odbytem



Fot. 15. *G. rostochiensis* – głowa osobnika młodocianego J2 z widocznymi guzami sztyletu



Fot. 16. *G. rostochiensis* – ogon osobnika młodocianego J2

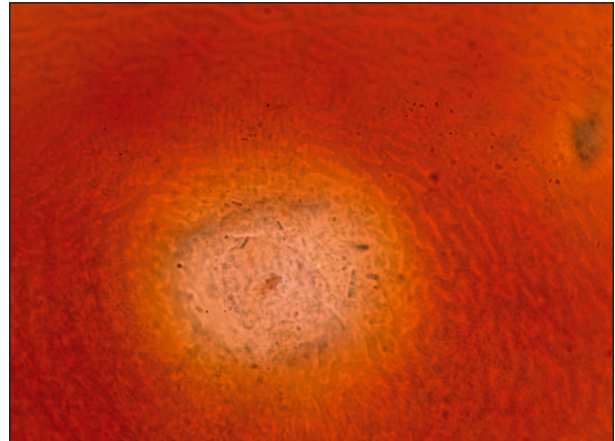
Globodera pallida

(Stone, 1973)

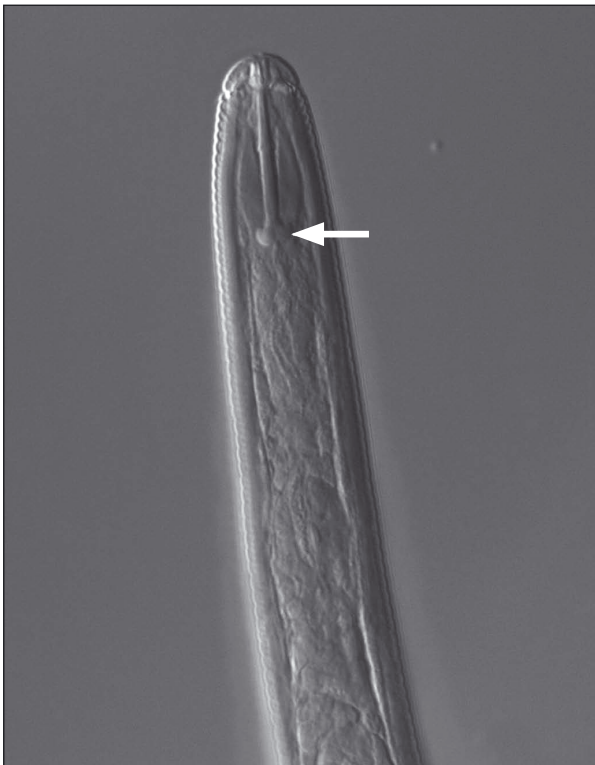
Cysty brązowe, okrągłe (choć wyizolowanie cyst o kształtach spotykanych u wymienionych wyżej gatunków jest prawdopodobne), długości 0,42–0,75 mm. Na ściankach cysty można zaobserwować punkty. Pomiędzy okienkiem wulwalnym i odbytem fałdy oskórka (fot. 17).

Osobniki młodociane drugiego stadium. Długość ciała w zakresie od 0,38 do 0,53 mm (obserwowana średnia minimalna: 0,39 mm; obserwowana średnia maksymalna: 0,49 mm). Szkielet głowy silnie załamujący światło. Guzy sztyletu zwężone w szczytowej części, przypominające kotwicę (fot. 18). Ogon 40–60 μm długi (obserwowana średnia minimalna: 50 μm ; obserwowana średnia maksymalna: 53 μm). Część przezroczysta (hyalinowa) stanowi około 40–53% całkowitej długości ogona.

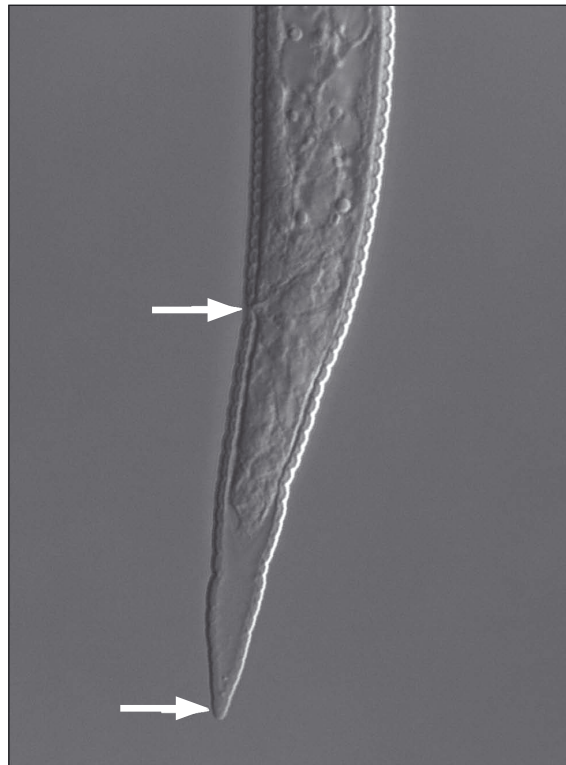
(długości 18–32 μm ; obserwowana średnia minimalna: 20 μm ; obserwowana średnia maksymalna: 27 μm). Koniec ogona zaokrąglony (fot. 19).



Fot. 17. Cysta *G. pallida* z widocznym okienkiem wulwy i odbytem



Fot. 18. *G. pallida* – głowa osobnika młodocianego J2 z widocznymi guzami sztyletu



Fot. 19. *G. pallida* – ogon osobnika młodocianego J2

2. IDENTYFIKACJA Z WYKORZYSTANIEM METOD BIOLOGII MOLEKULARNEJ

2.1. Identyfikacja *G. rostochiensis* i *G. artemisiae* metodą real-time PCR

Metoda ta została opublikowana (Nowaczyk i wsp. 2008) i jest dostosowana do wykrywania i różnicowania polskich populacji obu gatunków. Wymaga trzech etapów: izolacji DNA, przeprowadzenia reakcji real-time PCR z sondą typu TaqMan oraz analizy wyniku (która odbywa się już w czasie trwania reakcji).

2.1.1. Izolacja DNA

Cysty (1 lub więcej) należy rozgnieść tak, aby uwolnić larwy i jaja oraz przynajmniej częściowo zmacerować ich tkanki. Następnie stosuje się jedną z poniższych procedur:

– przy pomocy gotowych zestawów:

najlepiej przeprowadzić izolację przy pomocy gotowych zestawów do izolacji DNA z tkanek zwierzęcych, dostępnych komercyjnie (np. DNeasy Isolation Kit, Qiagen). W pierwszym etapie rozgniecione cysty zalewa się niewielką ilością buforu lizującego (dokładna objętość wg instrukcji producenta) zawierającym proteinazę K. Etap ten należy wydłużyć do ok. 4 godzin, w celu dokładnej lizy tkanek. Później przemywa się materiał genetyczny związany na błonie kolumnienek z zestawu, a procedurę kończy się wymyciem oczyszczonego DNA z błony i zawieszeniem w wodzie lub 10 mM roztworze TrisCl (pH 7.5).

– izolacja metodą ekstrakcji fenolowej:

rozgniecione cysty należy zmieszać z ok. 100 μ l buforu do izolacji DNA (50 mM TrisCl pH 7,5; 50 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5% SDS) z dodatkiem proteinazy K, o stężeniu 50 μ g/ml i trawić przez noc w 37°C lub 56°C. Następnie dodać do próby równą objętość mieszaniny fenol/chloroform (1:1) i przeprowadzić kilkakrotnie ekstrakcję fenolową, aż do zaniku interfazy, po czym wykonać ekstrakcję chloroformem (1 raz). DNA z fazy wodnej wytrącać etanolem (2,5 objętości) w obecności octanu amonu (1/3 objętości, 7,5 M) w –80°C przez 20 min. Osad zbierać przez wirowanie przy 14 000 rpm, 20 min. w 4°C, a następnie przemyć 70% etanolem, suszyć i rozpuścić w wodzie lub buforze 1xTE (10 mM TrisCl pH 7,5; 1mM EDTA).

UWAGA!

- Jakość wyizolowanego DNA sprawdzić w świetle UV po rozdiale elektroforetycznym w 0,8% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny (stęż. 0,5 μ g/ml). Stężenie uzyskanego DNA można ocenić spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda = 260$ nm, natomiast czystość preparatu można ocenić na podstawie wartości A_{260}/A_{280} (wartość pomiędzy 1,7–1,9 świadczy o jego czystości).
- Wyizolowany DNA należy przechowywać w –20°C.

2.1.2. Reakcja real-time PCR

Reakcję real-time PCR przeprowadza się w aparacie do tego typu reakcji. W zależności od jego typu stosuje się odpowiednie probówki – zwykle o pojemności 0,2 ml, z wieczkiem optycznym.

W trakcie przygotowywania i mieszania odczynników probówki powinny być przechowywane w lodzie. Należy zapewnić sterylność w miejscu nastawiania reakcji (wysterylizowane komory z laminarnym przepływem powietrza).

W opracowanej metodzie reakcję przeprowadza się w 10 µl, które powinny zawierać:

a) do detekcji *G. artemisiae*:

- 0.25 µM starterów qGa1 (5'CACTGCGCCAACAGAGGTAG3') oraz qGa2 (5' TAGCACACAACGCCGACATG 3'),
- 0,3 µm sondy TaqMan TibA (5' Cy5-TGCTGACATGGAGTGTGTAGGCTTC – BHQ3 3'),
- polimerazę oraz bufor – zazwyczaj dostępną w zestawach do reakcji real-time PCR (np. Novazym) – ilość wg wskazań producenta,
- oraz ok. 15 ng wyizolowanego DNA.

Profil termiczny reakcji jest następujący:

- wstępna denaturacja 95°C przez 10 min
- 40 cykli amplifikacji składających się z:
 - denaturacji 95°C przez 30 s,
 - przyłączenia starterów i amplifikacji w 59°C przez 1 min.

b) do detekcji *G. rostochiensis*:

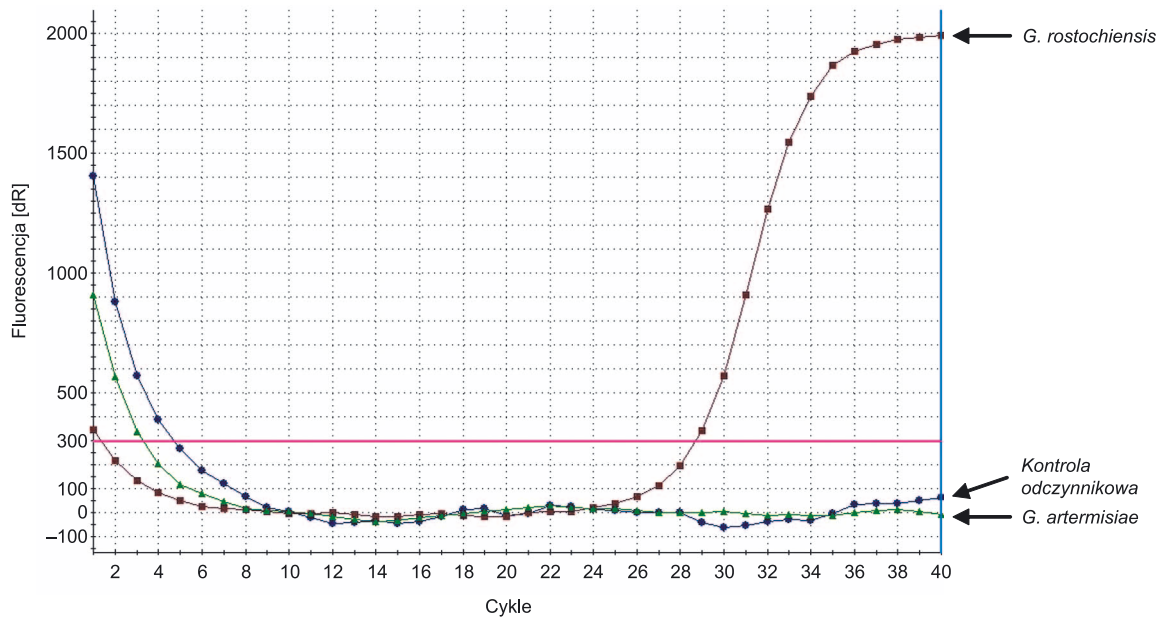
- 0.75 µM starterów qGr1 (5'GTTGTTGCGCCTTGCGTAGA3') oraz qGr2 (5' TAGCACACAAGCGCAGACATG 3'),
- 0,3 µm sondy TaqMan TibR (5' Cy3-CTAACATGGAGTGTAGCTGCTACTC – BHQ2 3'),
- polimerazę oraz bufor – zazwyczaj dostępną w zestawach do reakcji real-time PCR (np. Novazym) – ilość wg. wskazań producenta,
- oraz ok. 15 ng wyizolowanego DNA.

Profil termiczny reakcji jest następujący:

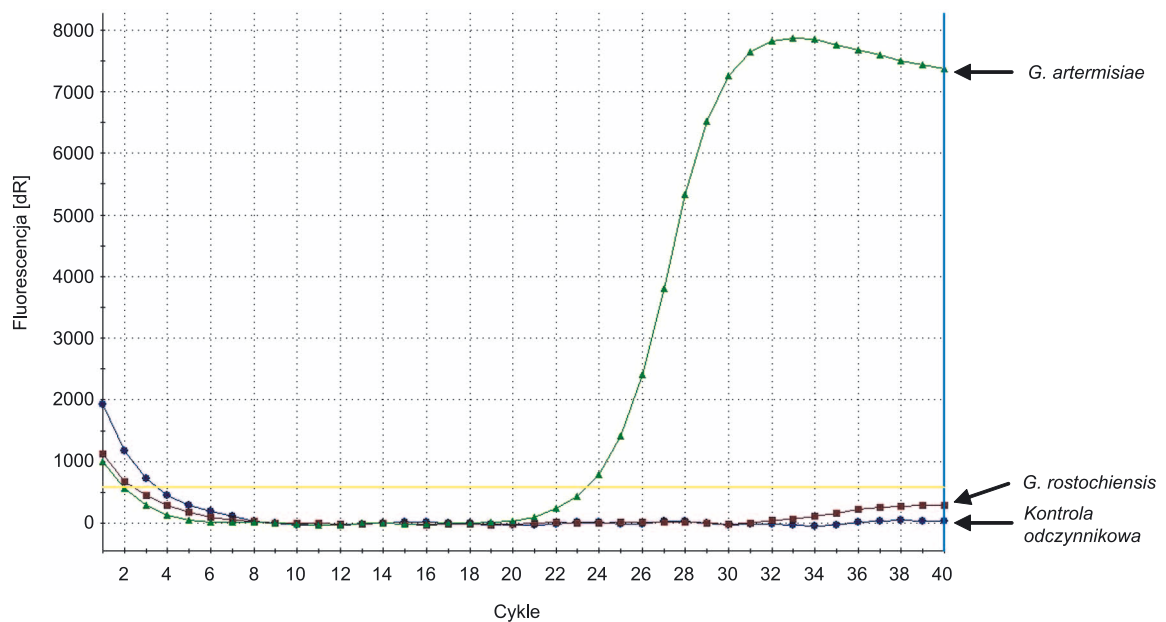
- wstępna denaturacja 95°C przez 10 min,
- 40 cykli amplifikacji składających się z:
 - denaturacji 95°C przez 30 s,
 - przyłączenia starterów i amplifikacji w 58°C przez 1 min.

2.1.3. Analiza wyników

Wyniki analizuje się przy pomocy programów dostarczonych przez producenta aparatu do real-time PCR i mają one postać krzywych, jak na rysunkach 1 i 2.



Rys. 1. Wyniki identyfikacji cyst *G. rostockiensis* w reakcji real-time PCR ze starterami qGr1, qGr2 i sondą TaqMan TibR. Brak krzywej amplifikacji dla próby zawierającej DNA izolowany z *G. artemisiae* i próby odczynnikowej (bez DNA)



Rys. 2. Wyniki identyfikacji cyst *G. artemisiae* w reakcji real-time PCR ze starterami qGa1, qGa2 i sondą TaqMan TibA. Brak krzywej amplifikacji dla próby zawierającej DNA izolowany z *G. rostockiensis* i próby odczynnikowej (bez DNA)

UWAGA!

- W każdej analizie powinny być nastawione trzy reakcje kontrolne: pozytywna (zawierająca pewny materiał genetyczny pochodzący z nicienia, którego obecność próbujemy stwierdzić, np. DNA z *G. artemisiae* przy identyfikacji cyst *G. artemisiae*), negatywna (zawierająca DNA izolowany z innego nicienia), kontrola odczynnikowa (czyli próba zawierająca wszystkie odczynniki użyte do w/w analiz, bez DNA).

Próby b i c powinny wyjść negatywnie, tzn. nie powinna powstać krzywa amplifikacji w reakcji real-time PCR.

- Opisana metoda nadaje się również do zastosowania bez izolacji DNA. Zamiast materiału genetycznego dodajemy do mieszaniny reakcyjnej tylko rozgniecioną cystę (wg wskazań cytowanej publikacji).

2.2. Identyfikacja *G. pallida* i *G. artemisiae* metodą real-time PCR

Kolejne protokoły diagnostyczne umożliwiają wykrywanie i różnicowanie gatunków *G. pallida* i *G. artemisiae* z wykorzystaniem reakcji real-time PCR z barwnikiem Eva Green. Test opiera się na amplifikacji różnicujących fragmentów kodujących rDNA w genomie obu gatunków. Przeprowadzono również optymalizację reakcji, opracowano warunki dla użycia małych ilości materiału genetycznego oraz wykonano walidację.

2.2.1. Izolacja DNA

DNA izolowano z uzyskanych populacji trzech gatunków *Globodera*: *G. pallida*, *G. artemisiae*, *G. rostochiensis* (jako kontrola negatywna).

Uzyskane cysty należy rozgnieść przy użyciu mikrołuczka, w celu maceracji tkanek larw oraz jaj, a następnie prowadzić izolację DNA z wykorzystaniem komercyjnego zestawu przeznaczonego do izolacji DNA z tkanek zwierzęcych (np. DNeasy Isolation Kit, Qiagen). W tym celu, do uzyskanego, zmacerowanego materiału dodaje się bufor lizujący z proteinazą K i poddaje przedłużonej inkubacji (ok. 16 h), w temp. 56°C. Po tym czasie, uwolniony DNA należy nałożyć na dostarczone przez producenta kolumnienki, celem związania DNA do membrany, a następnie przemyć odpowiednią ilością buforu z dodatkiem etanolu, po czym oczyszczony materiał genetyczny uwalnia się z membrany przez przepłukanie sterylną wodą lub buforem do elucji (Tris-Cl, pH 7,5), zgodnie z instrukcjami producenta.

Jakość uzyskanego DNA sprawdza się po rozdiale elektroforetycznym w 0,8% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika interkalującego do DNA (np. Midori Green, Nippon Genetics), w świetle UV. Należy określić stężenie wyizolowanego DNA metodą spektrofotometryczną, przy długości fali 260 nm. Wyizolowany materiał genetyczny należy przechowywać w temp. -20°C.

W opracowanej metodzie, można pominąć całą procedurę izolacji DNA i w kolejnym etapie – reakcji real-time PCR – użyć zawiesinę (zawierającą nieoczyszczony materiał genetyczny) uzyskaną z rozgniecenia jednej, bądź kilku cyst w 10 µl sterylnej wody.

UWAGA!

Czystość preparatu DNA ocenia się na podstawie stosunku wartości A260/A280. Wartości pomiędzy 1,7–1,9 świadczą o czystości analizowanego materiału DNA .

2.2.2. Reakcja real-time PCR

Reakcję real-time PCR prowadzi się w termocyklerze z funkcją analizy amplifikacji w czasie rzeczywistym (termocykler do real-time PCR, np. Corbett Rotor Gene (Qiagen)).

Poniżej opisane testy prowadzono ze starterami specyficznymi (zaprojektowanymi dla poszczególnych gatunków w oparciu o sekwencje dostępnych w Banku Genów (www.Ncbi.nlm.nih.gov/GenBank) fragmentów rDNA dla populacji analizowanych gatunków) oraz z barwnikiem interkalującym Eva Green (Biotium).

a) do detekcji *G. pallida*

Reakcję przeprowadza się w 10 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej:

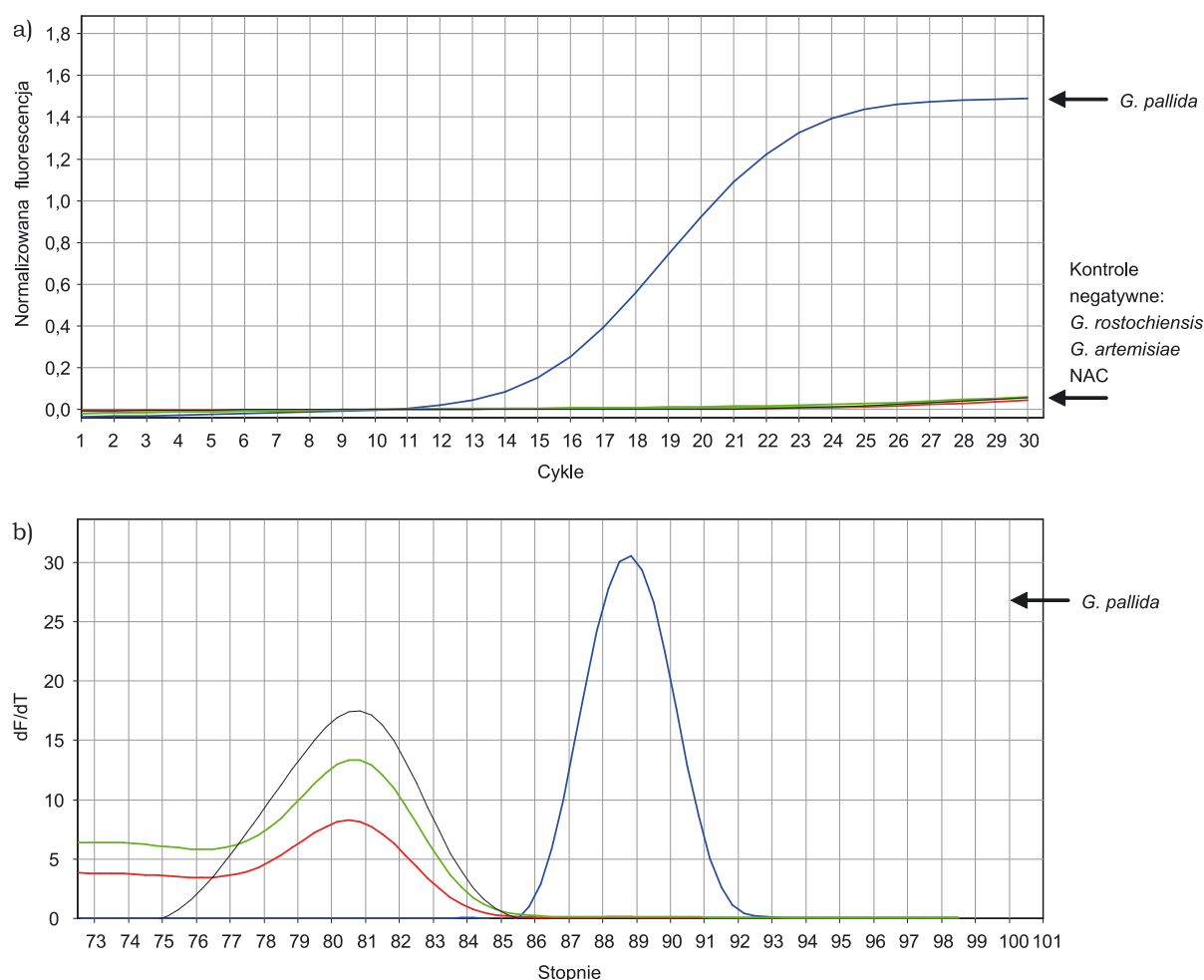
- 1x Allegro Taq bufor z 2,5 mM MgCl₂,
- 0,5 µM każdego ze starterów specyficznymi dla *G. pallida*: TaqGpaF (5'GCTATGTTTGGGCTGGCACATTGA3') i TaqGpaR (5'ACGACAACAGCA-ATCGTCGAGTCA3')
- 1x Eva Green Dye (Biotium),
- 0,5 U polimerazy Allegro Taq (Novazym),
- 200 µM mieszaniny dNTP,
- 10–20 ng wyizolowanego DNA (lub alternatywnie 1 µl zawiesiny uzyskanej z rozgniecionej cysty w 10 µl sterylnej wody).

Profil termiczny reakcji jest następujący:

- Denaturacja wstępna 95°C przez 10 min.,
- 30–35 cykli amplifikacji składających się z:
 - denaturacji 95°C przez 10 s,
 - przyłączania starterów w temp. 64°C przez 10 s,
 - elongacji w temp. 72°C przez 15 s.
- Dodatkowy etap topnienia produktów typu primer-dimer w temp. 81,5°C przez 10 s.

Kontrole pozytywne stanowiły próby z DNA *G. pallida*, kontrole negatywne próby z DNA *G. artemisiae* oraz *G. rostochiensis*. Dodatkowo przeprowadzono negatywną kontrolę amplifikacji (NAC) bez dodawania DNA.

Wyniki reakcji real-time PCR przedstawione zostały przykładowo na rysunku 3.



Rys. 3. Wyniki identyfikacji cyst z gatunku *G. pallida* ze starterami specyficznymi TaqGpaF/R metoda real time PCR

a) krzywa amplifikacji widoczna dla próby pozytywnej, dla pozostałych prób negatywnych z DNA *G. artemisiae*, *G. rostochiensis* oraz kontroli negatywnej amplifikacji bez DNA – brak krzywej;
 b) krzywa topnienia produktu specyficznego dla *G. pallida*, temperatura topnienia produktu wynosi $88.5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$

b) do detekcji *G. artemisiae*

Reakcje przeprowadza się w 10 μl mieszaniny zawierającej:

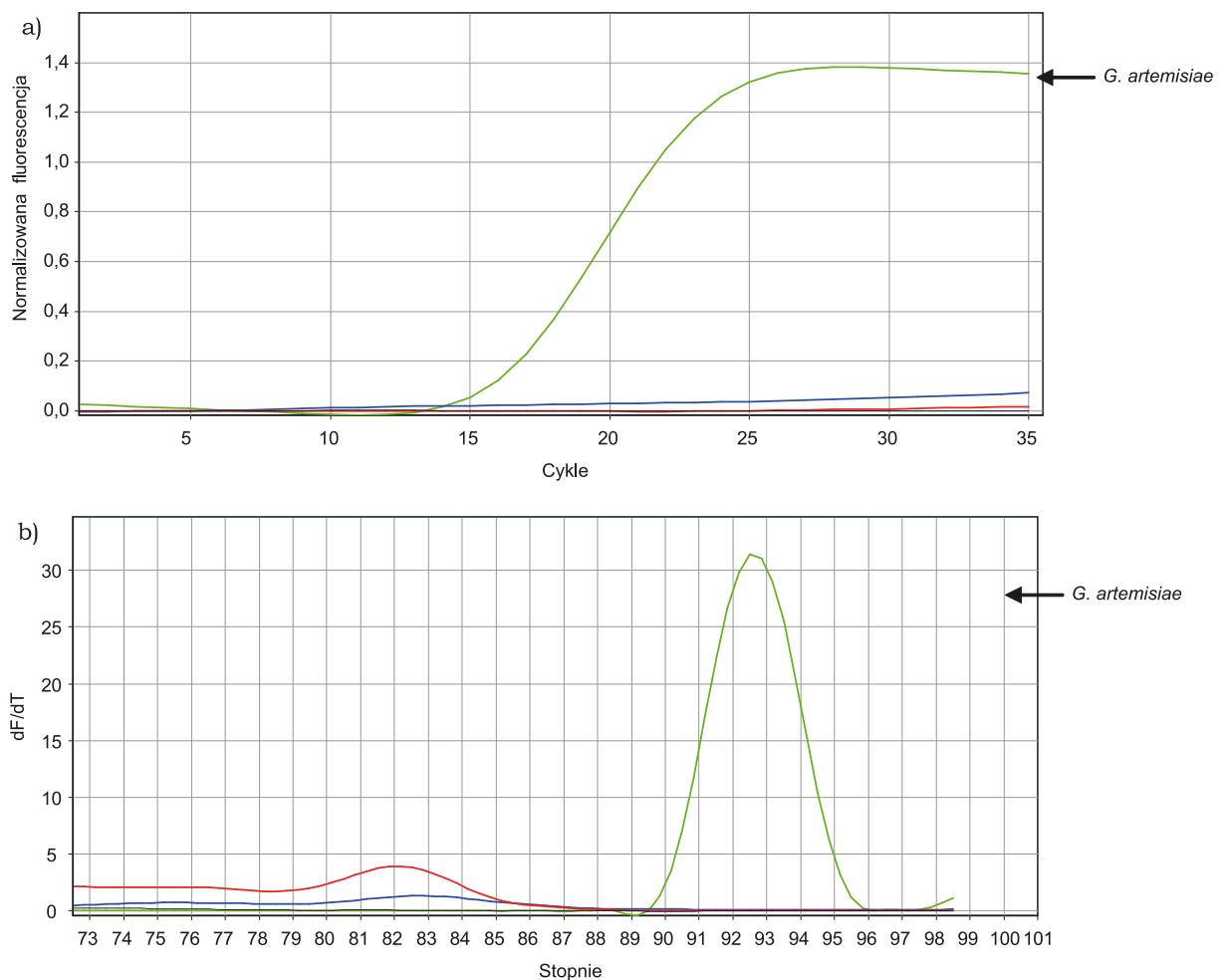
- 1X Allegro Taq bufor z 2,5 mM MgCl_2 (Novazym),
- 0,3 μM każdego ze starterów specyficznym dla *G. artemisiae*: qGA1 (5'-CACTGCGCCAACAGAGGTAG-3') i qGA2 (5'-TAGCACACAAACGCCGACATG-3') (startery opisane przez Nowaczyk i wsp. 2008, ale zmodyfikowane warunki reakcji),
- 1X Eva Green Dye (Biotium),
- 0,5 U polimerazy Allegro Taq (Novazym),
- 200 μM dNTP,
- oraz 10–20 ng wyizolowanego DNA (lub alternatywnie 1 μl zawiesiny z rozgniecionej cysty w 10 μl sterylnej wody).

Profil termiczny reakcji jest następujący:

- Denaturacja wstępna w 95°C przez 10 min.,
- 30–35 cykli amplifikacji składających się z:
 - denaturacji w 95°C przez 10 s,
 - przyłączania starterów w temp. 64°C przez 15 s,
 - elongacji w temp. 72°C przez 15 s.
- Przeprowadza się również dodatkowy etap topnienia produktów typu primer-dimer w temp. 83°C przez 10 s.

Kontrole pozytywne stanowiły próby z DNA *G. artemisiae*, kontrole negatywne próby z DNA *G. pallida* oraz *G. rostochiensis*, oraz dodatkowo przeprowadzono negatywną kontrolę amplifikacji (NAC) bez dodawania DNA.

Przykładowy wynik reakcji real-time PCR mającej na celu wykrywanie *G. artemisiae* przedstawia rysunku 4.



Rys. 4. Wyniki identyfikacji cyst z gatunku *G. artemisiae* ze starterami specyficznymi qGa1/2 metodą real-time PCR

- a) krzywa amplifikacji widoczna dla próby pozytywnej, dla pozostałych prób negatywnych z DNA *G. pallida*, *G. rostochiensis* oraz kontroli negatywnej amplifikacji bez DNA - brak krzywej;
- b) Krzywa topnienia produktu specyficznego dla *G. artemisiae*, temperatura topnienia produktu wynosi 92±0,2°C.

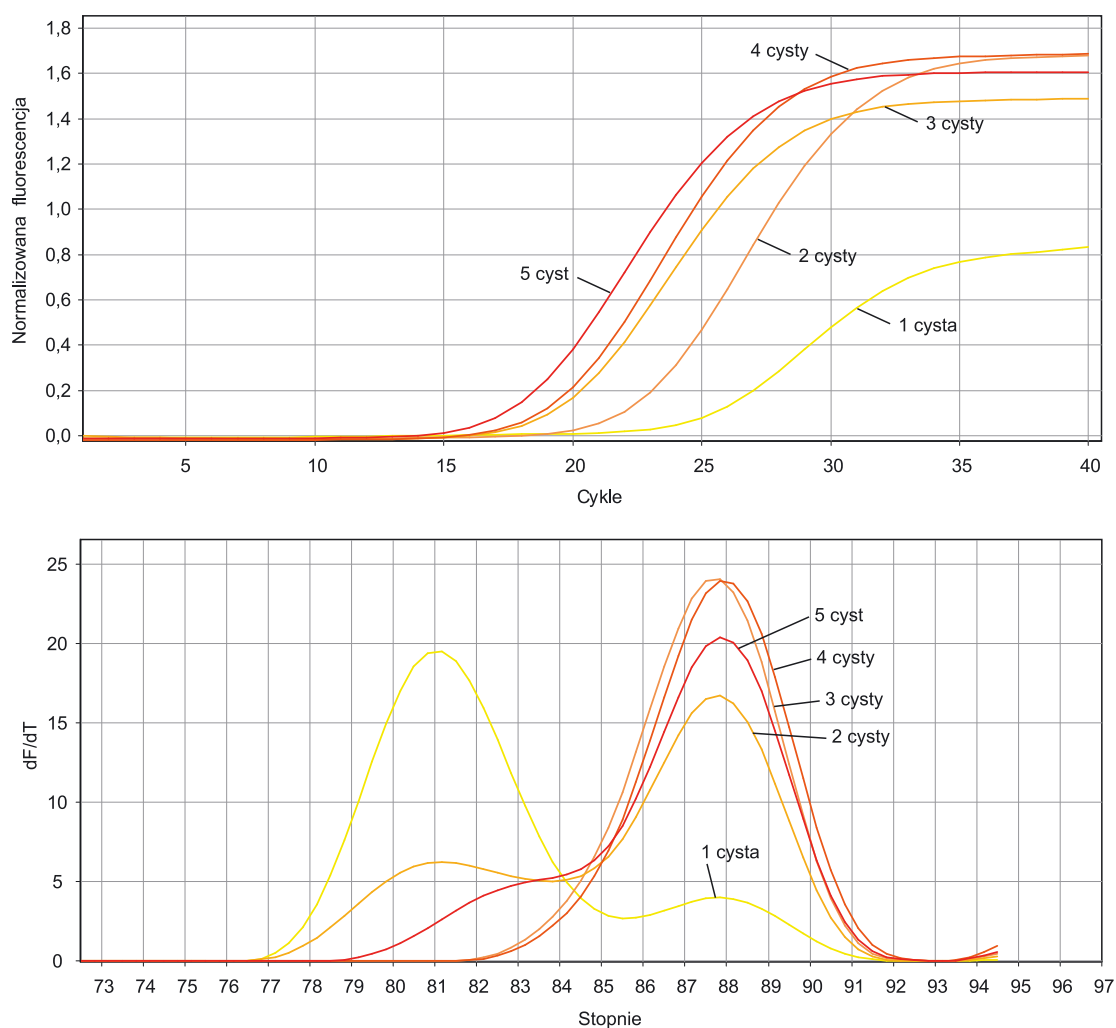
2.2.3. Analiza wyników

Analizę i interpretację wyników prowadzi się za pomocą oprogramowania sprzężonego z aparatem do prowadzenia reakcji real time PCR.

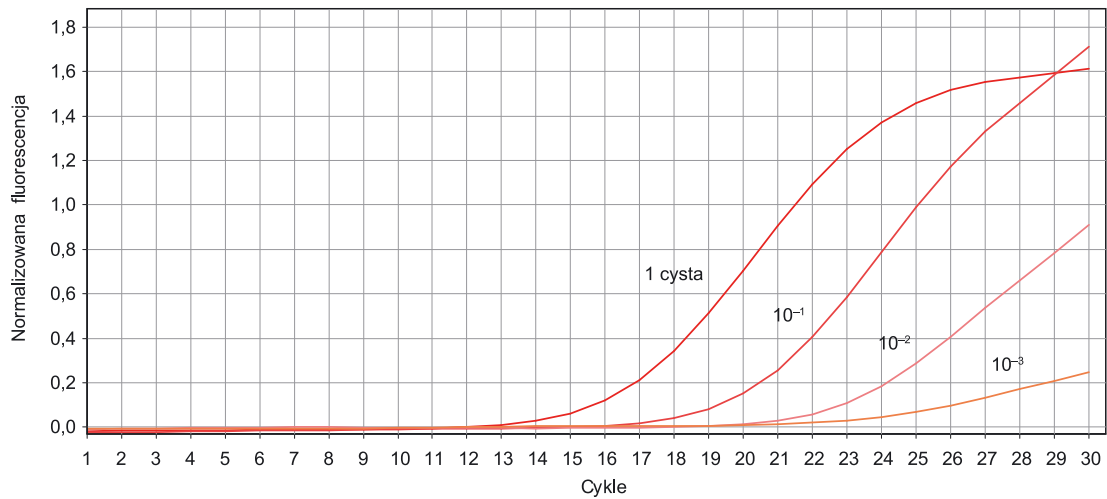
2.2.4. Minimalizacja materiału do detekcji *G. pallida* i *G. artemisiae* oraz walidacja metody

Walidację oraz określenie czułości opisaną metodyki prowadzono na materiale, który stanowiły rozgniecione cysty badanych nicieni, zawierające nieoczyszczony DNA. Reakcje real-time PCR prowadzono stosując powyżej opisane warunki, dla każdego badanego gatunku.

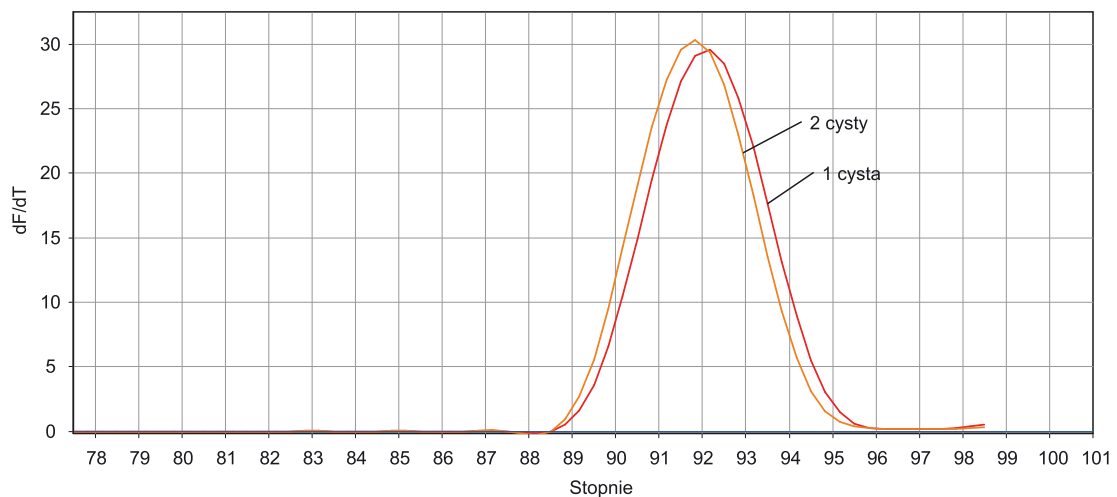
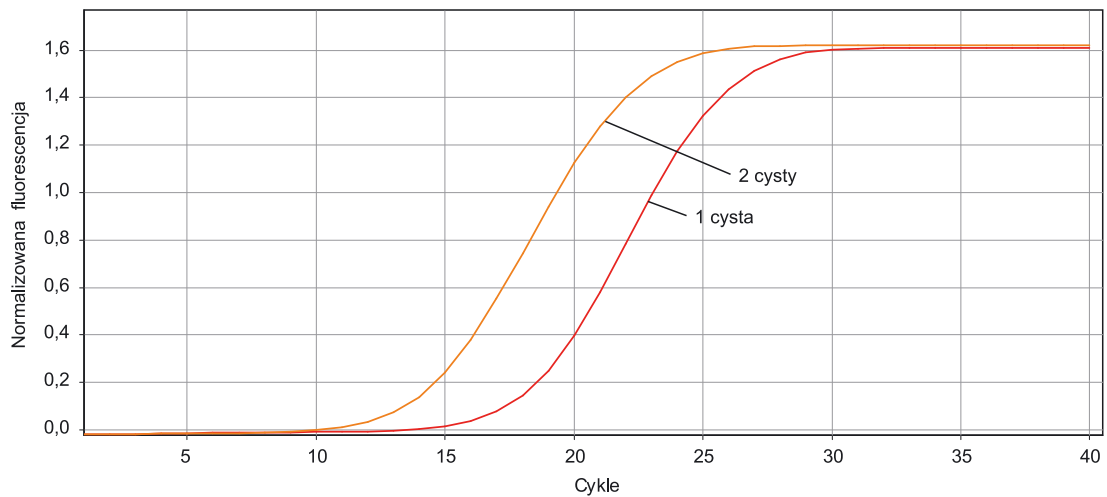
Matryce przygotowano w ten sposób, że malejącą liczbę cyst (od 5 do 1) w przypadku *G. pallida* rozgniatano w 10 μ l sterylnej wody, po czym do reakcji real-time PCR dodawano 1 μ l z uzyskanej mieszaniny (rys. 5). Dokonano również trzech dziesiętnych rozcieńczeń z zawiesiny 1 cysty (rys. 6). W przypadku *G. artemisiae* badania nad czułością detekcji prowadzono na próbach uzyskanych z rozgniecenia 2 cyst oraz 1 cysty w 10 μ l sterylnej wody, a także na trzech próbach stanowiących dziesiętne rozcieńczenie z 1 cysty zawieszanej w 10 μ l sterylnej wody (rys. 7).



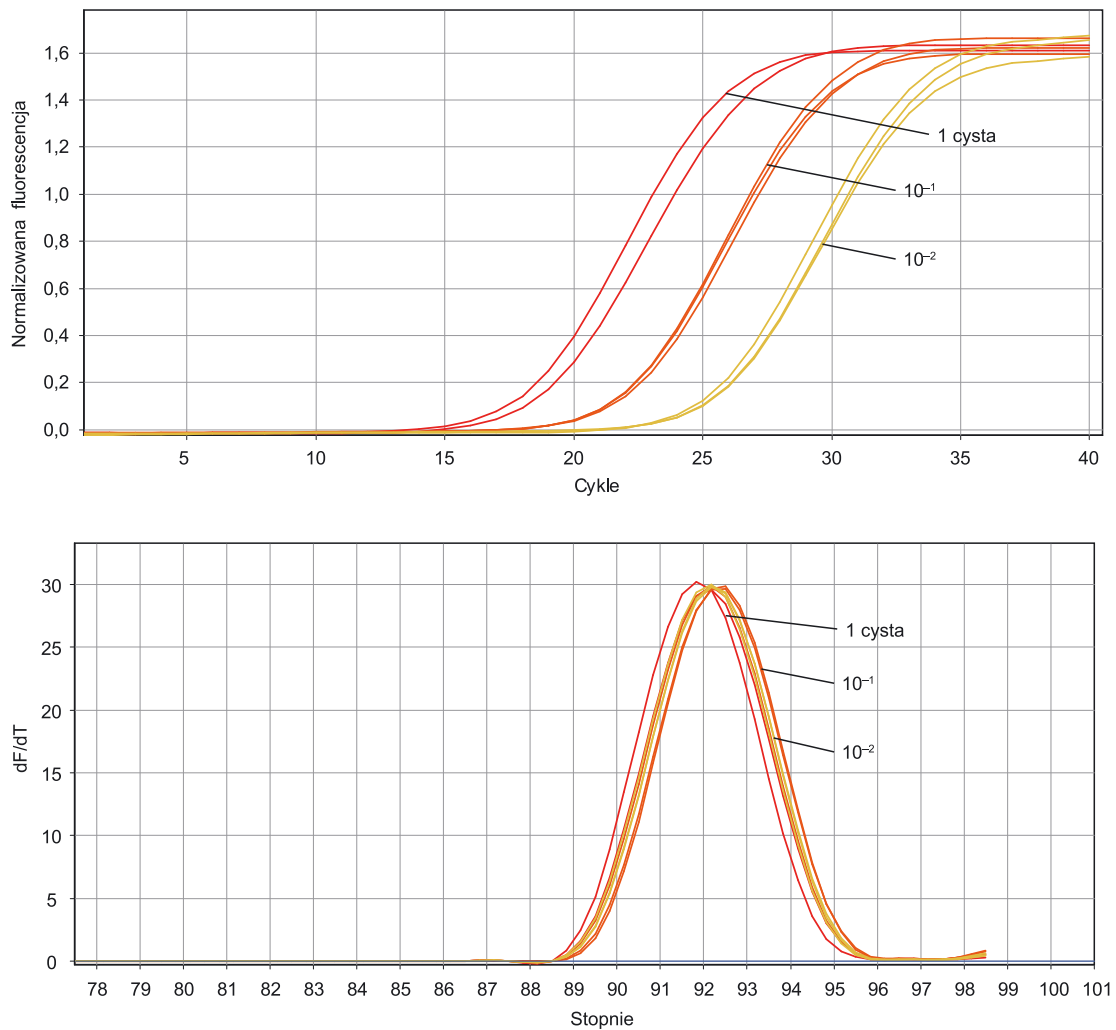
Rys. 5. Wyniki uzyskane w reakcji real-time PCR z użyciem starterów specyficznych do diagnostyki *G. pallida*. Schemat u góry przedstawia krzywe amplifikacji dla DNA z *G. pallida* z zastosowaniem malejącej liczby cyst (5–1) oraz na dole: uzyskane krzywe topnienia dla powyższych prób



Rys. 6. Schemat przedstawiające krzywe amplifikacji uzyskane w reakcji real-time PCR z wykorzystaniem starterów specyficznych dla *G. pallida*. W reakcji analizowano dziesiętne rozcieńczenia uzyskane z jednej rozgniecionej cysty rozpuszczone w 10 μ l wody. Analiza ta wykazuje, że można wykryć 10^{-2} rozcieńczenie cysty



Rys. 7. Schemat przedstawiający krzywe amplifikacji uzyskane w reakcji real-time PCR z wykorzystaniem starterów specyficznych dla *G. artemisiae*. W reakcji analizowano różną ilość cyst oraz ich dwa dziesiętne rozcieńczenia (10^{-1} oraz 10^{-2})



Rys. 7. Schemat przedstawiający krzywe amplifikacji uzyskane w reakcji real-time PCR z wykorzystaniem starterów specyficznych dla *G. artemisiae*. W reakcji analizowano różną ilość cyst oraz ich dwa dziesiętne rozcieńczenia (10^{-1} oraz 10^{-2})

2.3. Identyfikacja *G. rostochiensis* i *G. pallida* metodą PCR

Do celów wykrywania *G. pallida*, a także różnicowania z innym powszechnie występującym mątwikiem *G. rostochiensis*, zostało opracowanych wiele metod opartych głównie na standardowej reakcji PCR, w tym rekomendowana przez EPPO, metoda detekcji Bulmana i Marshalla (1997) lub inna opisana przez Zouhara i wsp. (2000)

2.3.1. Detekcja PCR z zastosowaniem metody Bulmana i Marshalla (1997)

Reakcję przeprowadza się wykorzystując 10 μ l mieszaniny reakcyjnej, która zawierać powinna:

- 0,2 U polimerazy Taq ,
- 1x stężony bufor załączony do polimerazy zawierający zwykle: 10 mM Tris-HCl pH8,8, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100,
- 1 μ M każdego ze starterów: PITSp4 (5'ACAACAGCAATCGTCGAG3') i ITS5 (White 1990) (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3'),
- 200 μ M dNTP,
- oraz wyizolowany DNA

Reakcja powinna przebiegać według podanego poniżej profilu termicznego:

- wstępna denaturacja w 94°C przez 5 min,
- 35 cykli składających się z:
 - denaturacji w 94°C przez 45 s,
 - przyłączania starterów w 60°C przez 1 min,
 - elongacji w 72°C przez 45 s.,
- końcowej elongacji w 72°C przez 3 min.

Długość produktu dla *G. pallida* z zastosowanymi starterami powinna wynosić ok. 266 nt (zastosowanie startera PITSr4 5' ACAACAGCAATCGTCGAG 3' w kombinacji z w/w starterem ITS5 umożliwia detekcję *G. rostochiensis*, a długość produktu reakcji wynosi 434 pz).

2.3.2. Detekcja PCR z zastosowaniem metody Zouhara i wsp. (2000)

Reakcję przeprowadza się wykorzystując 10 µl mieszaniny reakcyjnej, która zawierać powinna:

- 0,2 U polimerazy Taq,
- 1x stężony bufor załączony do polimerazy zawierający zwykle: 10 mM Tris-HCl pH8,8, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100,
- 1 µM każdego ze starterów: UNI (5' GCAGTTGGCTAGCGATCTTC 3') i GPA (5' GGTGACTCGACGATTGCTGT 3'),
- 200 µM dNTP,
- oraz wyizolowany DNA.

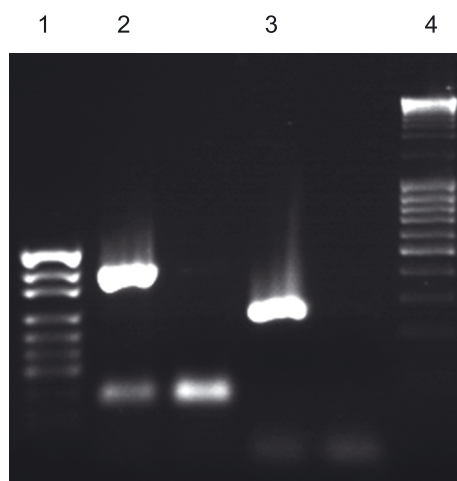
Reakcję przeprowadza się stosując podany poniżej profil termiczny reakcji:

- wstępna denaturacja w 94°C przez 5 min,
- 35 cykli składających się z:
 - denaturacji w 94°C przez 1 min,
 - przyłączania starterów w 57°C przez 30 s,
 - elongacji w 72°C przez 1 min,
- końcowej elongacji w 72°C przez 7 min.

Długość produktu dla *G. pallida* z zastosowanymi starterami powinna wynosić ok. 391 nt (zastosowanie startera GRO1 5' TGTTGTACGTGCCGTACCTT 3' w kombinacji z w/w starterem UNI umożliwia detekcję *G. rostochiensis*, a długość produktu reakcji wynosi 238 pz).

2.3.3. Analiza wyników

Wyniki reakcji PCR sprawdza się przez rozdzielenie produktów amplifikacji w 2% żelu agarozowym. Przykładowy wynik uzyskany w amplifikacji nicieni *G. pallida* oraz *G. rostochiensis* przedstawia rysunek 8.



Rys. 8. Różnicowanie *G. pallida* i *G. rostochiensis* w reakcji PCR. 1 – marker masy cząsteczkowej, 2 – *G. pallida*, 3 – *G. rostochiensis*, 4 – marker masy cząsteczkowej

UWAGA!

W związku z zachodzącymi niekiedy reakcjami krzyżowymi w detekcji z zastosowaniem w/w metod, związanymi z występującymi w niektórych populacjach *G. pallida* oraz *G. rostochiensis* zmian nukleotydowych w miejscach przyłączania się starterów, autorzy proponują oczyszczony produkt PCR poddać sekwencjonowaniu (w jednym z serwisów oferujących tego typu usługi) celem potwierdzenia otrzymanego wyniku. Do sekwencjonowania, oprócz produktu należy przesłać jeden ze starterów, dzięki któremu produkt ten otrzymano. Wyniki sekwencjonowania należy porównać z danymi zdeponowanymi w Banku Genów.

3. LITERATURA

- Bulman SR, Marshall JW (1997) Differentiation of Australian potato cyst nematode (PCN) populations using the polymerase chain reaction (PCR). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 25: 123–129.
- Nowaczyk K, Dobosz R, Kornobis S, Obrępańska-Stęplowska A (2008) TaqMan REAL-Time PCR-based approach for differentiation between *Globodera rostochiensis* (golden nematode) and *Globodera artemisiae* species. *Parasitology Research* 103(3): 577–581.
- Zouhar M, Rysanek, O, Kocova M (2000) Detection and differentiation of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* by PCR. *Plant Protection Science* 36, 81–84.