



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(21) Numer zgłoszenia: **410976**

(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 szkodzących drzewom
i krzewom owocowym 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, Łatowicz, PL
ALEKSANDRA GRALAK, Łuków, PL
KRASSIMIRA ILIEVA-MAKULEC, Warszawa, PL
FRANCISZEK KORNOBIS, Puszczykowo, PL
KATARZYNA KOWALEWSKA, Warszawa, PL
MARTA ŁOŚ, Warszawa, PL
TADEUSZ MALEWSKI, Warszawa, PL
EDYTA RYCHLICKA, Piła, PL
ANDRZEJ SKWIERCZ, Gdynia, PL
ANNA TEREBA, Komorów, PL
GRAŻYNA WINISZEWSKA-ŚLIPIŃSKA,
Warszawa, PL
ROBERT TURLEJ, Warszawa, PL
KATARZYNA WIŚNIEWSKA, Warszawa, PL
OLGA WIŚNIEWSKA, Warszawa, PL**

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób i zestaw do identyfikacji nicieni, szkodników drzew i krzewów owocowych, metodą Real Time PCR, w szczególności wynalazek dotyczy sposobu i zestawu do identyfikacji nicieni wybranych z grupy obejmującej gatunki *Longidorus attenuatus*, *Longidorus diadecturus*, *Paralongidorus maximus*, *Xiphinema brevicollum* i *Xiphinema californicum* z rodziny Longidoridae.

W Europie wykazano obecność 79 gatunków Longidoridae, z których 13 występuje w Polsce. Przedstawiciele tej rodziny zaliczani są do pasożytów roślin, są również wektorami wirusów atakujących rośliny. Rozmnażają się w glebie. Okres ich rozwoju jest długi i może trwać nawet kilka miesięcy. Mogą pasożytować na wielu roślinach użytkowych. Porażone rośliny są karłowate lub zamierają, szczególnie gdy porażone zostaną we wczesnym stadium swego rozwoju. *Longidorus attenuatus*, *L. elongatus* i *L. macrosoma* mogą przenosić wirusa czarnej plamistości pierścieniowej pomidorów i wirusa pierścieniowej plamistości malin. Identyfikacja gatunków nicieni oparta jest na analizie cech morfologicznych i morfometrycznych, w tym diagnozowane są m.in.: zabarwienie samicy na poszczególnych etapach rozwojowych, kształt cysty, długość i kształt guzów szytletu, 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.

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

Udoskonaleniem łańcuchowej reakcji polimerazy jest Real Time PCR, to jest reakcji PCR z pomiarem ilości powielonego fragmentu w każdym cyklu reakcji. Do pomiaru ilości powielonego fragmentu wykorzystuje się fluorochromy (barwniki fluorescencyjne), np.: SYBR Green I, SYTO9, Eva Green, SYBR Gold, których fluorescencja jest proporcjonalna do ilości powielonego fragmentu. Identyfikację powstałych produktów przeprowadza się poprzez pomiar wielkości fluorescencji oraz analizę krzywej topnienia produktów reakcji bez elektroforezy. 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.

Wang X., Bosselut N., Castagnone C., Voisin R., Abad P., Esmenjaud D. Multiplex polymerase chain reaction identification of single individuals of the Longidorid nematodes *Xiphinema index*, *X. diversicaudatum*, *X. vuittenezi*, and *X. italiae* using specific primers from ribosomal genes. *Phytopathology*. 2003; 93: 160–166 opisali sekwencje starterów do identyfikacji czterech gatunków *Xiphinema*.

Metoda polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych PCR-RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism) wykorzystuje enzymy restrykcyjne, które tną nić DNA w specyficznym dla siebie

miejsu. Różnice w długości pociętych fragmentów DNA świadczą o zmienności, co pozwoliło autorom opracować metodę do identyfikacji 11 gatunków: *Longidorus aetnaeus*, *L. africanus*, *L. andalusicus*, *L. artemisiae*, *L. caespiticola*, *L. distinctus*, *L. elongatus*, *L. euonymus*, *L. intermedius*, *L. leptocephalus* i *L. lignosus* (Subbotin S.A., Rogozhin E.A., Chizhov V.N. Molecular characterisation and diagnostics of some *Longidorus* species (Nematoda: Longidoridae) from Russia and other countries using rRNA genes. 2014 Eur J Plant Pathol 138: 377–390).

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

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 precyzji 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 *Longidorus attenuatus*, *Longidorus diadecturus*, *Paralongidorus maximus*, *Xiphinema brevicollum* i *Xiphinema californicum*, obejmujący następujące etapy:

- dostarczenie próbki gleby zawierającej nicienie do identyfikacji;
- wyplukanie nicieni z gleby;
- izolację DNA;
- przeprowadzenie reakcji PCR, zwłaszcza Real-Time PCR, z zastosowaniem pary starterów 3' i 5' oraz sondy;
- porównanie krzywej amplifikacji badanej próby z krzywymi amplifikacji próby zerowej oraz kontroli negatywnej,

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

Gatunek	5' starter		3' starter		Sonda	
	Nazwa	Sekwencja	Nazwa	Sekwencja	Nazwa	Sekwencja
<i>Longidorus attenuatus</i>	Lattfv	tggagcttcattagttc	Lattfv	ctacggaaacctgtgtac	Latt	cgaactacgttatctatagg
<i>Longidorus diadecturus</i>	Ldiafv	gaacgaaagctcgttgg	Ldiarv	gctcaatgctaactgtcta	Ldia	tctgaagctgcgttcgttc
<i>Paralongidorus maximus</i>	Pmaxfv	ccagttcgttgcgtata	Pmaxrv	aacgggaataaacgtaac	Pmax	ctttccaccgcctcgaacga
<i>Xiphinema brevicollum</i>	Xbfcv	gtcgagttgaggtcgaac	Xberv	gatgctttatattagatccgaca	Xbe	tctaccgaacgagctggttac
<i>Xiphinema californicum</i>	Xcafvc	ctcgattcattatcagac	Xcarvc	cgactctttaaactcgcc	Xca	aactaacgctaattccactacggc

Przedmiotem wynalazku jest również zestaw do identyfikacji nicieni wybranych z grupy obejmującej gatunki *Longidorus attenuatus*, *Longidorus diadecturus*, *Paralongidorus maximus*, *Xiphinema brevicollum* i *Xiphinema californicum*, metodą PCR, zwłaszcza Real-Time PCR, zawierający właściwe dla danego gatunku startery 3' i 5' oraz sondę wybrane z listy:

Gatunek	5' starter		3' starter		Sonda	
	Nazwa	Sekwencja	Nazwa	Sekwencja	Nazwa	Sekwencja
<i>Longidorus attenuatus</i>	Lattfv	tggagcttcattagttc	Lattfv	ctacggaaacctgtgtac	Latt	cgaactacgttatctatagg
<i>Longidorus diadecturus</i>	Ldiafv	gaacgaaagctcgttgg	Ldiarv	gctcaatgctaactgtcta	Ldia	tctgaagctgcgttcgttc
<i>Paralongidorus maximus</i>	Pmaxfv	ccagttcgttgcgtata	Pmaxrv	aacgggaataaacgtaac	Pmax	ctttccaccgcctcgaacga
<i>Xiphinema brevicollum</i>	Xbfcv	gtcgagttgaggtcgaac	Xberv	gatgctttatattagatccgaca	Xbe	tctaccgaacgagctggttac
<i>Xiphinema californicum</i>	Xcafvc	ctcgattcattatcagac	Xcarvc	cgactctttaaactcgcc	Xca	aactaacgctaattccactacggc

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: Lattfv (SEKW NR ID: 1), Lattrv (SEKW NR ID: 2), Latt (SEKW NR ID: 3), Ldiafv (SEKW NR ID: 4), Ldiarv (SEKW NR ID: 5), Ldia (SEKW NR ID: 6), Pmaxfv (SEKW NR ID: 7), Pmaxrv (SEKW NR ID: 8), Pmax (SEKW NR ID: 9), Xbefv (SEKW NR ID: 10), Xberv (SEKW NR ID: 11), Xbe (SEKW NR ID: 12), Xcafv (SEKW NR ID: 13), Xcarv (SEKW NR ID: 14), Xca (SEKW NR ID: 15).

Fig. 1 przedstawia krzywe amplifikacji dla *Longidorus attenuatus*.

Fig. 2 przedstawia krzywe amplifikacji dla *Longidorus diadecturus*.

Fig. 3 przedstawia krzywe amplifikacji dla *Paralongidorus maximus*.

Fig. 4 przedstawia krzywe amplifikacji dla *Xiphinema brevicollum*.

Fig. 5 przedstawia krzywe amplifikacji dla *Xiphinema californicum*.

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 *Longidorus attenuatus*

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
Lattfv	tggagctttcatlagttc
Lattrv	ctacggaacctgtgtac
Latt	cgaactacgttatctatagg

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:

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

Mieszaninę reakcyjną umieszczano w probówce 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	-
	przylączenie	55	30	pojedynczy
	synteza	72	30	-
Chłodzenie		40	20	-

Kontrolę negatywną stanowiła mieszanina równych objętości roztworów DNA: *Longidorus diadecturus*, *Longidorus elongatus*, *Longidorus poessneckensis*.

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

Przykład 2

Identyfikacja nicieni z gatunku *Longidorus diadecturus*

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

Starter/sonda	Sekwencja
Ldiafv	gaacgaaagctctggttgg
Ldiarv	gctcaatgctaactgcta
Ldia	ttcgtaagctgcgttcgttc

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

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

Przykład 3

Identyfikacja nicieni z gatunku *Paralongidorus maximus*

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

Starter/sonda	Sekwencja
Pmaxfv	ccagttcgttggtctata
Pmaxrv	aacgggaataaacgtaac
Pmax	ctttccaccgcctcgaacga

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

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

Przykład 4

Identyfikacja nicieni z gatunku *Xiphinema brevicollum*

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

Starter/sonda	Sekwencja
Xbefv	gtcgagttgaggtcgaac
Xberv	gatgctttatattagatccgaca
Xbe	tctaccgaacgagctggttac

Kontrolę negatywną stanowiła mieszanka równych objętości roztworów DNA: *Xiphinema californicum*, *Xiphinema diversicaudatum*.

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

Przykład 5

Identyfikacja nicieni z gatunku *Xiphinema californicum*

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

Starter/sonda	Sekwencja
Xcaf	ctgcgattcattatcagac
Xcarv	cgactctttaaatctgcc
Xca	aactaacgctaataccactacggc

Kontrolę negatywną stanowiła mieszanka równych objętości roztworów DNA: *Xiphinema brevicollum*, *Xiphinema diversicaudatum*.

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

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 *Longidorus attenuatus*, *Longidorus diadecturus*, *Paralongidorus maximus*, *Xiphinema brevicollum* i *Xiphinema californicum* w próbce gleby, obejmujący następujące etapy:
 - 1) dostarczenie próbki gleby zawierającej nicienie do identyfikacji;
 - 2) wypłukanie nicieni z gleby;
 - 3) izolację DNA;
 - 4) przeprowadzenie reakcji 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 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>Longidorus attenuatus</i>	Lattfv	tggagcttcattagttc	Lattrv	ctacggaaacctgttac	Latt	cgaactacgttatctatagg
<i>Longidorus diadecturus</i>	Ldiafv	gaacgaaagtctggttg	Ldiarv	gctcaatgctaactgcta	Ldia	ttcgttaagctgcgttcgttc
<i>Paralongidorus maximus</i>	Pmaxfv	ccagttcgttggtctata	Pmaxrv	aacgggaataaacgtaac	Pmax	cttccaccgcctcgaacga
<i>Xiphinema brevicollum</i>	Xbelfv	gtcgagttgaggtcgaac	Xberv	gatgctttatattagatccgaca	Xbe	tctaccgaacgagctggttac
<i>Xiphinema californicum</i>	Xcafvl	ctgcgattcattatcagac	Xcarv	cgactctttaaatctgcc	Xca	aactaacgctaataccactacggc

2. Zestaw do identyfikacji gatunków nicieni *Longidorus attenuatus*, *Longidorus diadecturus*, *Paralongidorus maximus*, *Xiphinema brevicollum* i *Xiphinema californicum* 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>Longidorus attenuatus</i>	Lattfv	tggagcttcattagttc	Lattrv	ctacggaaacctgttac	Latt	cgaactacgttatctatagg
<i>Longidorus diadecturus</i>	Ldiafv	gaacgaaagtctggttg	Ldiarv	gctcaatgctaactgcta	Ldia	ttcgttaagctgcgttcgttc
<i>Paralongidorus maximus</i>	Pmaxfv	ccagttcgttggtctata	Pmaxrv	aacgggaataaacgtaac	Pmax	cttccaccgcctcgaacga
<i>Xiphinema brevicollum</i>	Xbelfv	gtcgagttgaggtcgaac	Xberv	gatgctttatattagatccgaca	Xbe	tctaccgaacgagctggttac
<i>Xiphinema californicum</i>	Xcafvl	ctgcgattcattatcagac	Xcarv	cgactctttaaatctgcc	Xca	aactaacgctaataccactacggc

Rysunki

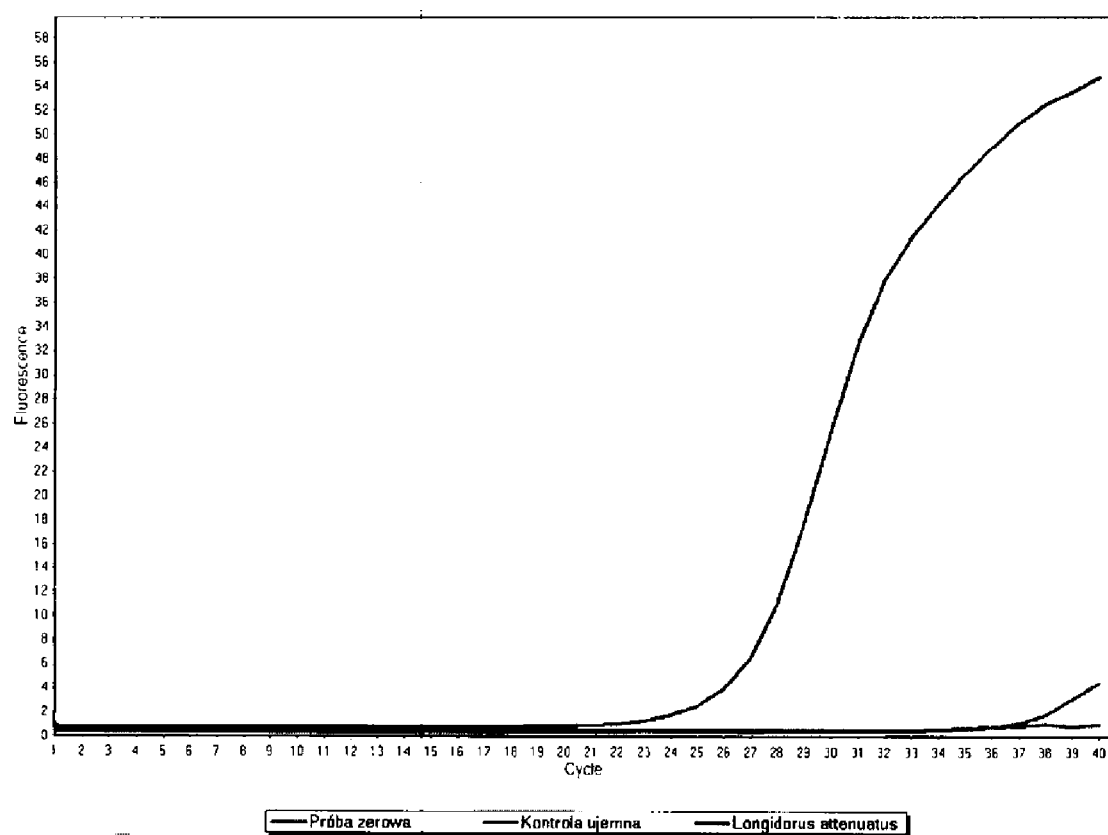


Fig. 1

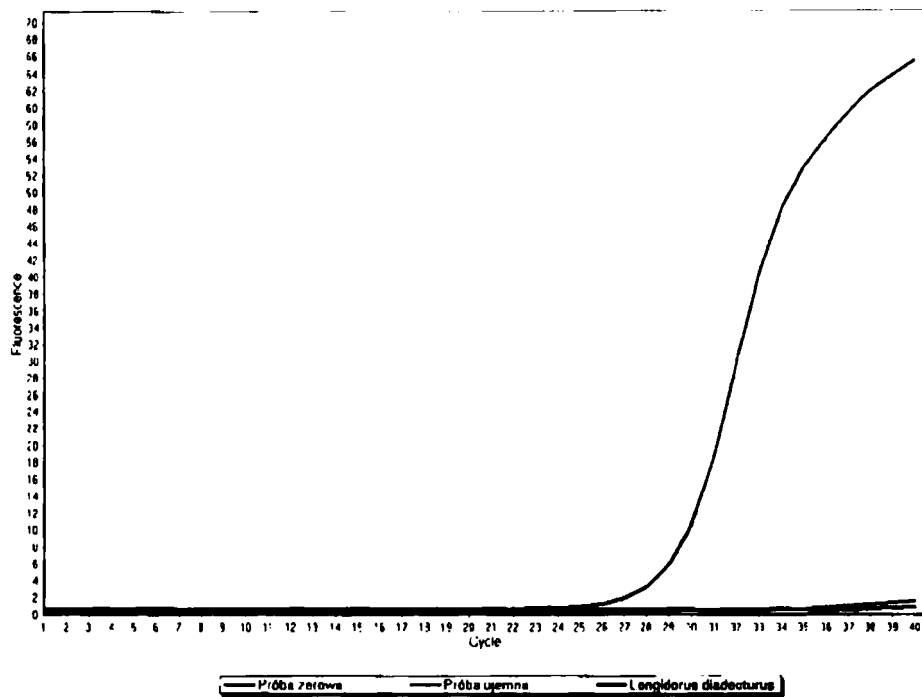


Fig. 2

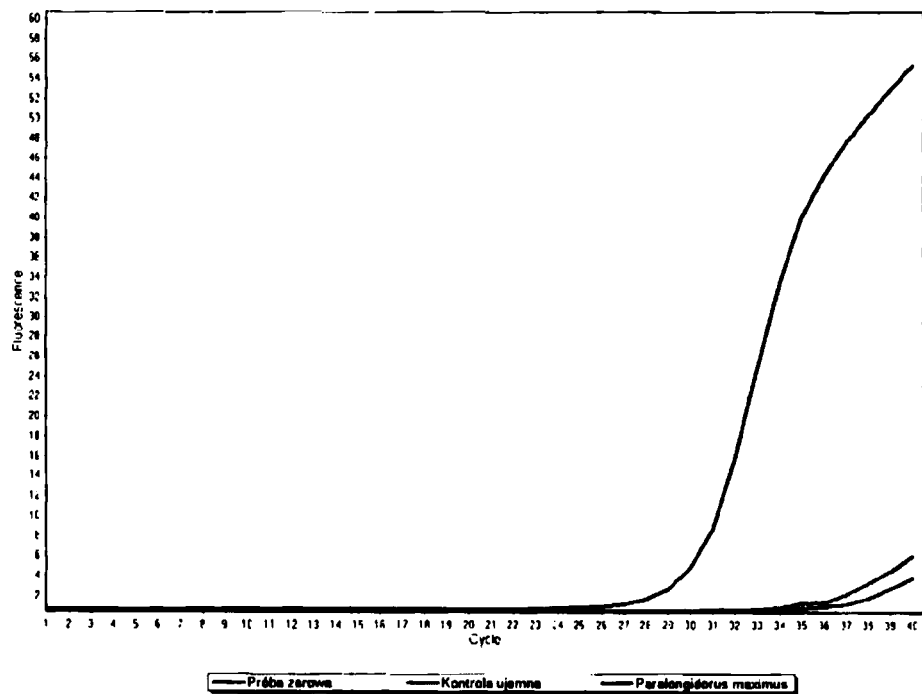


Fig. 3

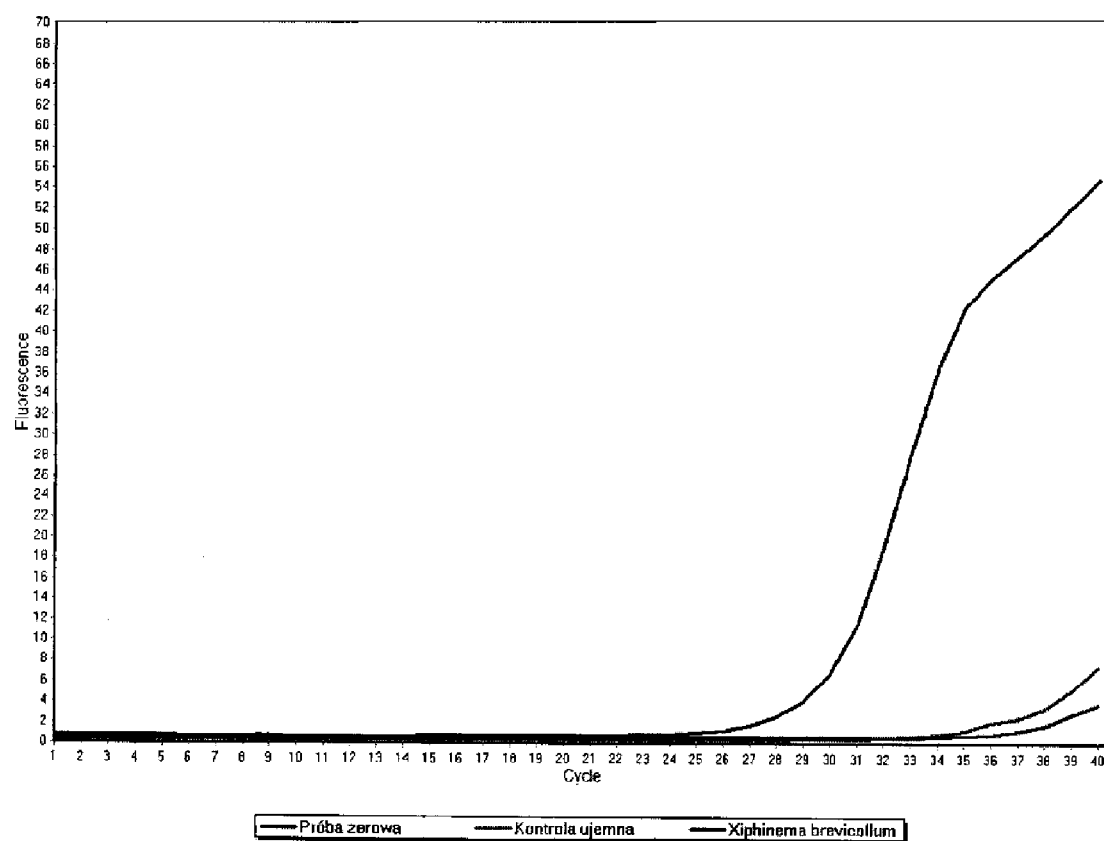


Fig. 4

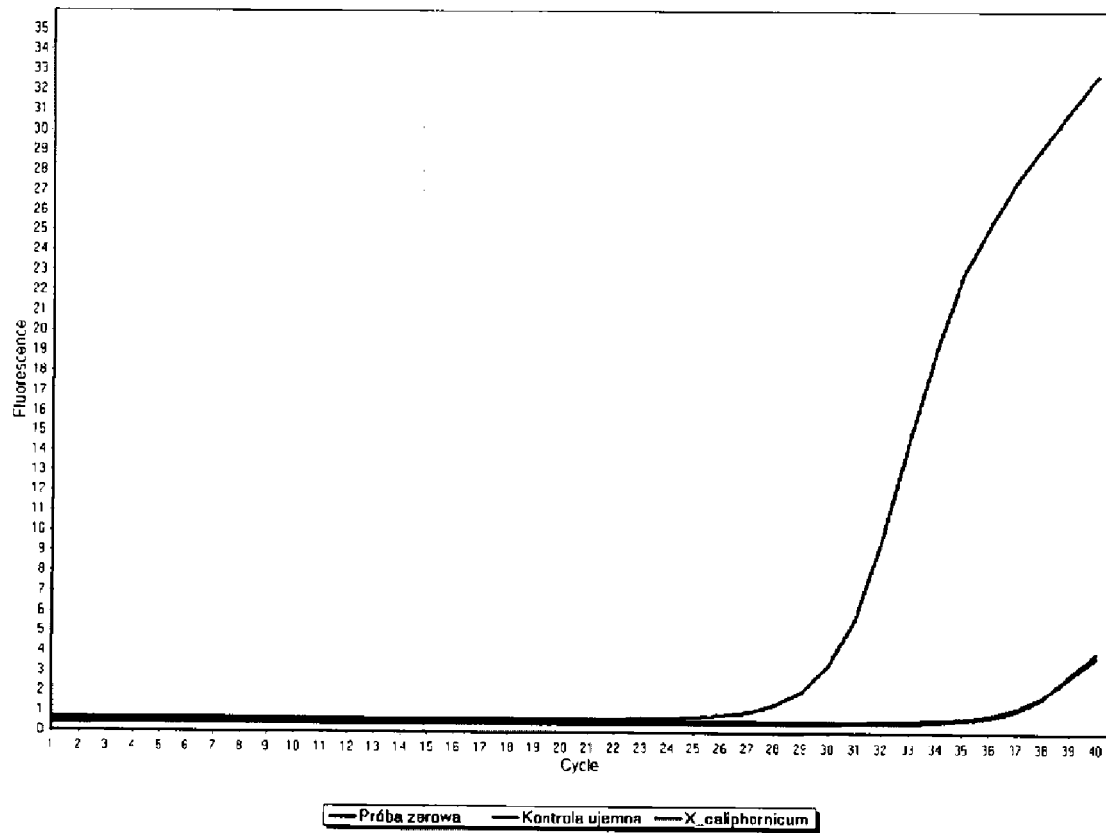


Fig. 5