

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **233890**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **415504**

(51) Int.Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **23.12.2015**

(54) **Sposób i zestaw do identyfikacji nicienia *Rotylenchus buxophilus*,
szkodnika roślin leśnych, metodą Real Time PCR**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
03.07.2017 BUP 14/17

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
31.12.2019 WUP 12/19

(73) Uprawniony z patentu:

**MUZEUM I INSTYTUT ZOOLOGII POLSKIEJ
AKADEMII NAUK, Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**WIESŁAW BOGDANOWICZ, Warszawa, PL
EWA DMOWSKA, Warszawa, PL
ŁUKASZ FLIS, Łatowicz, PL
ALEKSANDRA GRALAK, Łuków, PL
KATARZYNA KOWALEWSKA, Warszawa, PL
TADEUSZ MALEWSKI, Warszawa, PL
KATARZYNA RYBARCZYK-MYDŁOWSKA,
Warszawa, PL
ROBERT TURLEJ, Warszawa, PL**

PL 233890 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób i zestaw do identyfikacji nicienia *Rotylenchus buxophilus*, szkodnika roślin leśnych, metodą Real Time PCR.

Rotylenchus buxophilus jest pasożytem i szkodnikiem drzew, który żyjąc w przewodach żywicznych, namnaża się. Tym doprowadza do ich zatykania, a w konsekwencji do śmierci rośliny.

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.

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, trzetałapowej 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. Czułość 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. McCui-ston J.L., Hudson L.C., Subbotin S.A., Davis E.L., Warfield C.Y. Conventional and PCR Detection of *Aphelenchoides fragariae* in Diverse Ornamental Host Plant Species. J Nematol. Dec 2007; 39(4): 343–355 opracowali startery do identyfikacji *Aphelenchoides fragariae*.

Stosowano również metodę analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych PCR-RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism) wykorzystującą enzymy restrykcyjne, które tną nić DNA w specyficznym dla siebie miejscu. Różnice w długości pociętych fragmentów DNA świadczą o zmienności. Brgermeister W, Metge K, Braasch H, Buchbach E. 2005. ITS-RFLP patterns for differentiation of 26 *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Parasitaphelenchidae) and observations on their distribution. Russian Journal of Nematology, 13: 29–42 opracowali metodę PCR-RFLP do identyfikacji 44 gatunków *Bursaphelenchus*.

Do identyfikacji *B. xylophilus* z powodzeniem stosowano metodę Real Time PCR (Cao AX, Liu XZ, Zhu SF, Lu BS. Detection of the Pinewood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, Using a Real-

-Time Polymerase Chain Reaction Assay. *Phytopathology*. 2005 May; 95(5):566–571; Ye W, Giblin-Davis RM. Molecular characterization and development of real-time PCR assay for pine-wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae). *PLoS One*. 2013 Nov 11;8(11):e78804. doi: 10.1371/journal.pone.0078804).

Identyfikację *Rotylenchus buxophilus* poprzez sekwencjonowanie DNA opisano w pracach Bae CH, Szalanski AL, Robbins RT. 2009 Phylogenetic Analysis of the Hoplolaiminae Inferred from Combined D2 and D3 Expansion Segments of 28S rDNA. *Journal of Nematology* 41 (1):28–34 oraz Cantalapiedra-Navarrete C, Navas-Cortés JA, Liébanas G, Vovlas N, Subbotin SA, Palomares-Riusa JE, Castillo P. 2013. Comparative molecular and morphological characterizations in the nematode genus *Rotylenchus*: *Rotylenchus paravitis* n. sp., an example of cryptic speciation. *Zoologischer Anzeiger* 252: 246–268.

Przy aktualnym stanie techniki istnieje nadal potrzeba dostarczenia narzędzia umożliwiającego detekcję wybranych 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 gatunku nicienia *Rotylenchus buxophilus* z dużą czułością i specyficznością, a także dostarczenie nowych sekwencji nukleotydowych starterów 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 nicienia *Rotylenchus buxophilus* w próbce gleby, obejmujący następujące etapy:

- dostarczenie próbki gleby zawierające 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 gatunku 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>Rotylenchus buxophilus</i>	Robufv	CTCCCAGGGAA ACCTAAC	Roburv	GCTCTGGACTCA AAACAC	Robus	ATGAGTCCGAGCC ACAACAG

Przedmiotem wynalazku jest także zestaw do identyfikacji nicienia *Rotylenchus buxophilus*, 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>Rotylenchus buxophilus</i>	Robufv	CTCCCAGGGAA ACCTAAC	Roburv	GCTCTGGACTCA AAACAC	Robus	ATGAGTCCGAGCC ACAACAG

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.

Poniżej podano przykład identyfikacji *Rotylenchus buxophilus*. 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 z tej samej rodziny.

P r z y k ł a d

Identyfikacja nicienia *Rotylenchus buxophilus*.

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
Robufv	CTCCCAGGGAAACCTAAC
Roburv	GCTCTGGACTCAAAACAC
Robus	ATGAGTCCGAGCCACAACAG

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 Robufv i Roburv,

– 1 μ l 4,0 μ M sondy Robus znakowanej na końcu 5' barwnikiem JOE, a 3'-końcu wygaszaczem HBQ1,

– 10 μ l 2X LuminoCt qPCR ReadyMix (Sigma-Aldrich),

– 2 μ l DNA.

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

Kontrolę negatywną stanowiło DNA nicieni *Rotylenchus robustus*.

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

Rozwiązanie według wynalazku pozwala na wykrycie *Rotylenchus buxophilus* 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 pochodzeniu i przeznaczenia oraz stadium, rozwoju.

Proponowany zestaw sond pozwala identyfikować wyżej wymieniony gatunek nicienia 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.

Wykaz sekwencji starterów i sond

Nr startera/sondy	Nazwa	Sekwencja
Nr 1	Robufv	CTCCCAGGGAAACCTAAC
Nr 2	Roburv	GCTCTGGACTCAAAACAC
Nr 3	Robus	ATGAGTCCGAGCCACAACAG

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób identyfikacji nicienia *Rotylenchus buxophilus* w próbce gleby, obejmujący następujące etapy:
 - a) dostarczenie próbki gleby zawierające nicienie do identyfikacji;
 - b) wypłukanie 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 próbę zerowej oraz kontroli negatywnej;**znamienny tym**, że do identyfikacji gatunku *Rotylenchus buxophilus* w reakcji PCR, zwłaszcza Real Time PCR, stosuje się właściwe dla danego gatunku startery 5' (nr 1) i 3' (nr 2) oraz sondę nr 3.
2. Zestaw do identyfikacji nicienia *Rotylenchus buxophilus*, metodą PCR, zwłaszcza Real Time PCR, zawierający właściwe dla danego gatunku startery 5' (nr 1) i 3' (nr 2) oraz sondę nr 3.

Rysunek

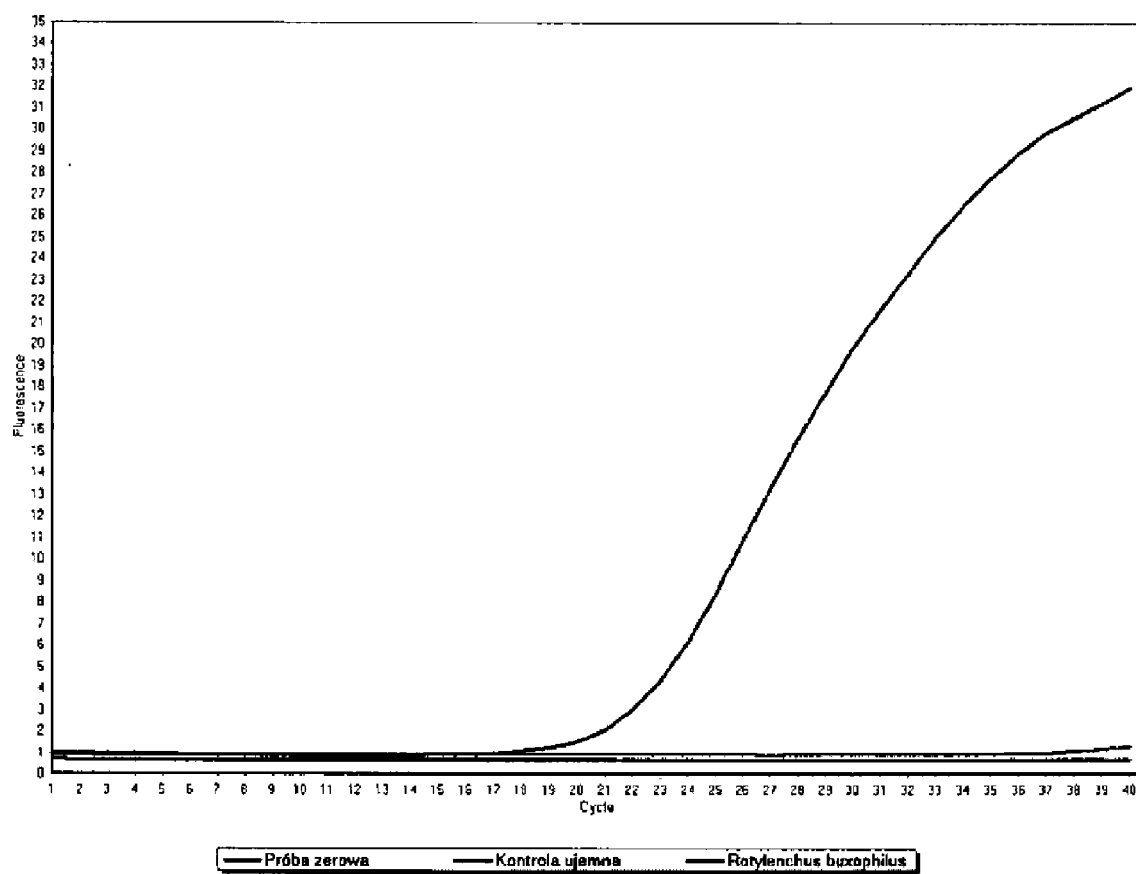


Fig. 1