

## **DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA POLSKICH POPULACJI KORZENIAKA POSPOLITEGO (*PRATYLENCHUS NEGLECTUS*)**

DOROTA KIERZEK, RENATA DOBOSZ, ARNIKA JESZKE,  
ALEKSANDRA OBRĘPALSKA-STĘPŁOWSKA

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy  
Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań  
ao.stepłowska@iorpib.poznan.pl

### **I. WSTĘP**

Rodzaj korzeniak (*Pratylenchus*) obejmuje wiele gatunków nicieni żerujących na szerokim spektrum roślin, w tym na roślinach uprawnych, sadowniczych, ogrodniczych i ozdobnych. Najpowszechniej występującym gatunkiem jest korzeniak pospolity (*Pratylenchus neglectus*) powodujący znaczne straty w uprawach, zwłaszcza na pszenicy (Castillo i Novlas 2007; Smiley 2010). Rozróżnienie morfologiczne gatunku w stadiach larwalnych jest bardzo trudne, dlatego wykorzystuje się techniki molekularne, oparte na amplifikacji genomowego lub mitochondrialnego DNA wyizolowanego z nicieni, z zastosowaniem między innymi standardowej reakcji PCR (polymerase chain reaction) i real-time PCR.

Celem pracy była ocena skuteczności opisanej w literaturze metody identyfikacji gatunku *P. neglectus* w odniesieniu do polskich populacji tego nicienia, a także opracowanie własnej procedury diagnostycznej.

### **II. MATERIAŁ I METODY**

#### **Diagnostyka polskich populacji *P. neglectus* z zastosowaniem metody opisanej w literaturze**

Materiał do badań stanowiły larwy osobników korzeniaka pospolitego (*P. neglectus*), pochodzących z różnych regionów Polski. Wykorzystano następujące populacje: 5-1 (województwo wielkopolskie), 7-2 (województwo mazowieckie), 9 (województwo pomorskie), 10 (województwo kujawsko-pomorskie), 11-4 (województwo wielkopolskie), 14 (województwo warmińsko-mazuskie), 15 (województwo dolnośląskie) i 20 (województwo małopolskie). DNA z larw nicieni izolowano przy użyciu zestawu DNeasy Isolation Kit (Qiagen), a następnie przeprowadzono reakcje PCR z wykorzystaniem starterów PNEG i D3B dostępnych w piśmiennictwie (Al-Banna i wsp. 2004). Reakcję prowadzono w 10 µl mieszaniny zawierającej 1 × bufor do polimerazy Taq, 0,2 mM

dNTP, 0,4 U polimerazy DNA Taq Allegro (Novazym), 1  $\mu$ M starterów, 1  $\mu$ l matrycowego DNA (o stężeniu 10 ng/ $\mu$ l). Temperatura przyłączenia starterów wynosiła 63 stopnie. Produkty reakcji rozdzielono w 1% żelu agarozowym z bromkiem etydyny.

### Opracowanie własnej procedury diagnostycznej

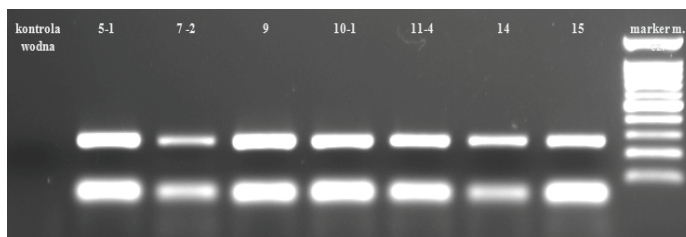
Wykonano przyrównanie wielosekwencyjne (Multiple Sequence Alignment) sekwencji populacji korzeniaka dostępnych w bazie NCBI (National Center for Biotechnology Information) i na ich podstawie zaprojektowano startery, umożliwiające identyfikację gatunku oraz amplifikację sekwencji obejmujących obszar 18S-ITS1-5,8S-ITS2-28SrDNA. Reakcję PCR przeprowadzono na zebranych osobnikach analizowanych polskich populacji *P. neglectus*, w analogicznym profilu termicznym, jak w przypadku starterów zawartych w piśmiennictwie. Amplifikowane fragmenty wklonowano w wektor pGEM-T-Easy (Promega), wykonano transformację bakterii *Escherichia coli*, zrekombinowanymi plazmidami, a następnie z pozytywnie zweryfikowanych bakteryjnych kolonii izolowano plazmidy zawierające inserty z wykorzystaniem zestawu Qiaprep (Qiagen). Na matrycy wyizolowanych plazmidów przeprowadzono reakcję sekwencjonowania. Na podstawie uzyskanych sekwencji zaprojektowano startery specyficzne gatunkowo, obejmujące krótkie fragmenty (około 171 pz) neglecFw/neglecRw (tab. 1), które mogą także znaleźć zastosowanie w technice real-time PCR.

## III. WYNIKI I DYSKUSJA

W celu oceny skuteczności dostępnej w literaturze (Al-Banna i wsp. 2004) metody diagnostycznej przeprowadzono reakcje PCR ze starterami sugerowanymi w tej procedurze. W ich wyniku otrzymano jeden specyficzny produkt o pożądanej długości – około 290 pz (rys. 1), co wskazuje na to, że analizowane osobniki należą do gatunku *P. neglectus*. Nie wykazano reakcji krzyżowych z przedstawicielami innych gatunków z rodzaju *Pratylenchus*, wykazano natomiast skuteczność metody dla przedstawicieli wszystkich badanych polskich populacji korzeniaka.

Tabela 1. Startery zaprojektowane w Międzyzakładowej Pracowni Biologii Molekularnej Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego  
Table 1. Primers designed by Interdepartmental Laboratory of Molecular Biology, Institute of Plant Protection – National Research Institute

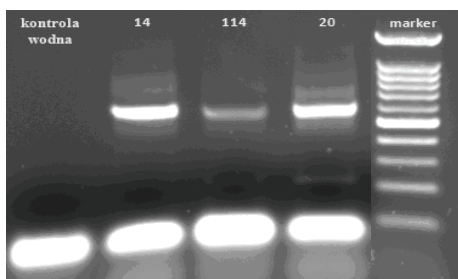
Starter Primer	Sekwencja startera Primer sequence 5'→3'	Region przyłączenia Location	Temp. annealingu Annealing temperature	Wielkość produktu Product size
Pneg10F	CACGMAGWCTCCGACTTGTGC	ITS2 rDNA	63°C	683 pz
Pneg10R	CTGCTGCTGGATCATTACGCAAC	18S i ITS1 rDNA		
neglecFw	GCACTGTGCGAAGTGTCC	ITS1 rDNA	56°C	171 pz
neglecRw	CTAAATATCGCTGTTGGCTG	5,8S rDNA		



Rys. 1. Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym produktów reakcji PCR ze starterami PNEG/D3B, na matrycy DNA wyizolowanego z osobników z populacji *P. neglectus*

Fig. 1. Electrophoretic separation of PCR reaction products obtained with PNEG/D3B primers applied to DNA isolated from *P. neglectus*

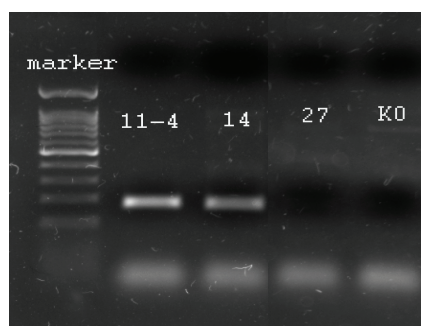
W następnym etapie zaprojektowano i optymalizowano własny protokół oparty na reakcji PCR z zaprojektowanymi w Międzyzakładowej Pracowni Biologii Molekularnej Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego starterami, które również po wizualizacji w 1% żelu agarozowym z bromkiem etydyny dały pojedynczy produkt o odpowiedniej długości – około 683 pz (rys. 2). Sekwencjonowanie otrzymanego produktu reakcji potwierdziło przynależność gatunkową. Otrzymane sekwencje porównano przy pomocy narzędzia BLAST ze zdeponowanymi w bazie NCBI i wykazano poziom identyczności 99–100%. Badania porównawcze poznanych fragmentów DNA wykazały także niewielkie różnice pomiędzy poszczególnymi polskimi populacjami korzeniaka pospolitego, związane z regionem ich pochodzenia.



Rys. 2. Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym produktów reakcji PCR ze starterami Pneg10F/Pneg10R, na matrycy DNA wyizolowanego z osobników z wybranych populacji *P. neglectus*

Fig. 2. Electrophoretic separation of PCR reaction products obtained with Pneg10F/Pneg10R primers applied to DNA isolated from *P. neglectus*

Startery zaprojektowane na podstawie uzyskanych sekwencji zostały przetestowane w reakcji PCR, w wyniku której otrzymano pojedynczy, specyficzny produkt o długości około 171 pz. Wszystkie reakcje zostały przeprowadzone z wykorzystaniem przedstawicieli wybranych populacji *P. neglectus*. Nie wykazano reakcji krzyżowych z przedstawicielami innych gatunków z rodzaju *Pratylenchus* (rys. 3).



Rys. 3. Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym produktów reakcji PCR ze starterami neglecFw/neglecRw, na matrycy DNA wyizolowanego z osobników z wybranych populacji *P. neglectus* (11-4 i 14). Populacja *P. penetrans* (27) stanowi kontrolę ujemną

Fig. 3. Electrophoretic separation of PCR reaction products obtained with neglecFw/neglecRw primers applied to DNA isolated from *P. neglectus* (11-4 and 14). *P. penetrans* (27) population was used as negative control

W wyniku reakcji PCR przeprowadzonej ze starterami dostępnymi w piśmiennictwie (Al-Banna i wsp. 2004) powstaje produkt zbyt krótki, aby po poddaniu go reakcji sekwencjonowania było możliwe przeprowadzenie analizy porównawczej. Jest on z kolei zbyt długi, aby startery te mogły znaleźć zastosowanie w reakcji real-time PCR. W związku z powyższym w pracy zaproponowano dwie dodatkowe pary starterów, z których jedna może posłużyć do analiz filogenetycznych, natomiast druga może znaleźć zastosowanie w reakcji real-time PCR.

#### IV. WNIOSKI

Uzyskane wyniki wskazują, że metody molekularnej diagnostyki korzeniaka pospolitego zawarte w piśmiennictwie są skuteczne w identyfikacji polskich populacji tego gatunku. Ponadto, wyniki sekwencjonowania potwierdzają wysoki stopień identyczności pomiędzy sekwencjami regionu 18S-ITS1-5,8S-ITS2-28S u populacji polskich z innymi, zdeponowanymi w Banku Genów. Stwarza to szansę opracowania metod uniwersalnych, które znajdą zastosowanie dla szerokiego spektrum populacji *P. neglectus*. W pracy zaproponowano dwie pary własnych starterów, odpowiednich do identyfikacji gatunku. Startery Pneg10F i Pneg10R mogą posłużyć do identyfikacji za pomocą reakcji PCR oraz analiz filogenetycznych, natomiast startery neglecFw i neglecRw mogą zostać także z powodzeniem wykorzystane w technice real-time PCR.

#### V. LITERATURA

Al-Banna L., Ploeg A.T., Williamson V.M., Kaloshian I. 2004. Discrimination of six *Pratylenchus* species using PCR and species-specific primers. *J. Nematol.* 36 (2): 142–146.

- Castillo P., Novlas N. 2007. *Pratylenchus*, Nematoda: Pratylenchidae: Diagnosis, biology, pathogenicity and management. Nematological Monographs and Perspectives 6: 1–530.
- Smiley R.W. 2010. Root-lesion nematode: biology and management in Pacific Northwest wheat cropping system. PNW Extension Bull. 617, Oregon State Univ., Corvallis, OR, p. 9

DOROTA KIERZEK, RENATA DOBOSZ, ARNIKA JESZKE,  
ALEKSANDRA OBREPALSKA-STĘPŁOWSKA

MOLECULAR DIAGNOSTIC OF POLISH POPULATION  
OF *PRATYLENCHUS NEGLECTUS*

**SUMMARY**

Root-lesion nematodes, *Pratylenchus* spp., are economically important, plant-damaging parasitic nematodes occurring in a wide variety of crops. The most common species is *Pratylenchus neglectus* which is found on cereal crops, especially on wheat. The proper identification of this nematode species is crucial because of significant morphological similarity to another *Pratylenchus* species. There are some diagnostic methods described in publication. The aim of this work was to test previously described protocol and its usefulness for Polish populations of this pathogen. Moreover, the new specific PCR protocols were described. These methods can be used both, for identification of Polish population of *P. neglectus*, and on the basis of the amplified rDNA region for the genetic correlation and phylogenetic studies.

**Key words:** *Pratylenchus neglectus*, rDNA, PCR, real-time PCR