

Received: 01.12.2025 / Accepted: 09.12.2025

ARTYKUŁ ORYGINALNY

Zastosowanie techniki RT-PCR do identyfikacji węgorka sosnowca (*Bursaphelenchus xylophilus*) (Steiner et Buhrer, 1934) Nickle, 1970 w próbkach drewna poddanych obróbce termicznej

The use of RT-PCR technique for identification of the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) (Steiner et Buhrer, 1934) Nickle, 1970 heat-treated wood samples

Anna Filipiak* 

Streszczenie

Identyfikacja pozwalająca odróżnić żywe osobniki węgorka sosnowca od martwych jest szczególnie ważna podczas rutynowej granicznej kontroli fitosanitarnej drewna i opakowań drewnianych wwożonych na teren Unii Europejskiej. Jeżeli w drewnie, po skutecznie przeprowadzonym zabiegu termicznym pozostają martwe osobniki nicieni, analiza molekularna oparta na DNA może dać fałszywe wyniki pozytywne. Lepszym rozwiązaniem jest przeprowadzenie analizy na podstawie obecności RNA nicieni, ponieważ ulega ono szybkiemu rozkładowi po ich śmierci. Badania przeprowadzano z wykorzystaniem techniki RT-PCR, obejmującej odwrotną transkrypcję RNA do cDNA, a następnie amplifikację za pomocą reakcji PCR. Wyniki wykonanych analiz wykazały obecność RNA węgorka sosnowca zarówno w osobnikach żywych, jak i martwych, w których RNA utrzymywało się jeszcze przez kilka dni po zabiegu (do 5 dni po obróbce termicznej). Podczas tej samej reakcji PCR, otrzymywano również produkty dla DNA *Bursaphelenchus xylophilus* o innej długości, co w łatwy sposób umożliwiło odróżnienie RNA od DNA tego gatunku nicienia. Dodatkowo, przeprowadzona analiza molekularna nicieni wprowadzonych do krążków drewna, poddanych obróbce termicznej, a następnie wyekstrahowanych z nich nicieni, potwierdziła prawidłowość przeprowadzonego zabiegu, gdyż w żadnym przypadku nie wykrywano nicieni.

Słowa kluczowe: obróbka termiczna drewna, opakowania drewniane, nicienie, RNA

Abstract

Identification, allowing the distinction between live and dead PWN individuals, is particularly important during routine border phytosanitary inspections of wood and wooden packaging imported into the European Union. If dead nematodes remain in the wood after successful thermal treatment, DNA-based molecular analysis may yield false positive results. A better approach is to analyze the presence of nematode RNA, as it degrades rapidly after their death. The study was carried out using an RT-PCR assay, involving reverse transcription of RNA into cDNA and subsequent PCR amplification. The results of the analyses demonstrated the presence of PWN RNA in both live and dead individuals, in which the RNA persisted for several days after treatment (up to 5 days after heat treated). During the same PCR reaction, *Bursaphelenchus xylophilus* DNA products of different lengths were also obtained, easily distinguishing RNA from DNA. Additionally, the molecular analysis of nematodes introduced into the heat treated wood discs and then extracted from them confirmed the correctness of the procedure, as no nematodes were detected in any case.

Keywords: heat-treated wood, wooden packaging, nematodes, RNA

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
ul. Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań
*corresponding author: a.filipiak@iorpib.poznan.pl

Wstęp / Introduction

Kwarantannowy nicien węgorek sosnowiec *Bursaphelenchus xylophilus* [(Steiner i Buhrer 1934), Nickle 1970] jest gatunkiem rodzimym Ameryki Północnej. Na początku 20. wieku gatunek ten został przypadkowo zawleczony do Japonii, gdzie stał się ważnym szkodnikiem, odpowiedzialnym za chorobę więdnienia sosny, powodującą znaczne straty w drzewostanach. W ciągu następnych lat, gatunek ten rozprzestrzenił się do innych krajów azjatyckich (Korea, Tajwan, Chiny) (Bergdahl 1988; Mamiya 2004). W 1999 roku po raz pierwszy stwierdzono jego występowanie również w Europie – w Portugalii, w 2008 roku w Hiszpanii, oraz w 2025 roku w Armenii i we Francji (Mota i wsp. 1999; Robertson i wsp. 2011; Arbuzova i wsp. 2025; NPPO 2025).

Zgodnie z obowiązującymi przepisami fitosanitarnymi, aby zapobiegać zagrożeniu rozprzestrzeniania się chorób i szkodników wraz z drewnianymi opakowaniami opracowany został Międzynarodowy Standard dla Środków Fitosanitarnych (ISPM) nr 15 (FAO IPPC 2018). Zawiera on wytyczne dotyczące zabiegów, jakim należy poddać opakowania drewniane w celu likwidacji wszystkich zasiedlających drewno organizmów, aby wyeliminować potencjalne zagrożenie ich przenoszenia, a także zasady znakowania poświadczającego wykonanie takich zabiegów. Zabiegi te obejmują najczęściej przeprowadzenie obróbki cieplnej (56°C w rdzeniu materiału przez 30 minut). Prawidłowo przeprowadzony zabieg pozwala na skuteczne wyeliminowanie wszystkich organizmów żywych, w tym nicieni, obecnych w drewnie. Opakowania drewniane, które są użytkowane w transporcie towarów, przy wwozie na teren Unii Europejskiej podlegają granicznej kontroli fitosanitarnej, w ramach której weryfikowana jest poprawność oznakowania zgodnie z wymaganiami standardu ISPM 15. Mogą być również pobierane próbki do badań laboratoryjnych, w tym przede wszystkim pod kątem obecności węgorka sosnowca. W praktyce odnotowuje się również przypadki nieskutecznego wykonania zabiegu oraz fałszowania oznakowania, na przykład poprzez nanoszenie go przez nieuprawnione podmioty bez wcześniejszego przeprowadzenia zabiegu. Z tego względu kluczowe jest objęcie monitoringową kontrolą opakowań drewnianych oznakowanych zgodnie ze standardem ISPM 15. Podczas rutynowej kontroli drewna i stwierdzenia objawów wskazujących na obecność kwarantannowych nicieni węgorka sosnowca, przeprowadza się identyfikację morfologiczną, a następnie potwierdzającą identyfikację molekularną. Jednakże, w przypadku obecności w drewnie martwych osobników nicieni, pozostałych po skutecznie przeprowadzonym zabiegu termicznym, analiza molekularna oparta na DNA może dać fałszywe wyniki pozytywne, ponieważ DNA nicieni występuje zarówno w osobnikach żywych, jak i martwych. Lepszym rozwiązaniem podczas przeprowadzania analizy molekularnej nicieni występują-

cych w drewnie poddanym zabiegom termicznym jest jej wykonanie na podstawie obecności RNA nicieni, poddane go następnie odwrotnej transkrypcji do cDNA. RNA można stosować jako wiarygodny wskaźnik żywotności nicieni w próbce, ponieważ jest to cząsteczka niestabilna i krótkotrwała, obecna w żywych komórkach i szybko ulegająca degradacji po śmierci organizmu (Leal i wsp. 2013, 2015).

Celem przeprowadzonych badań była molekularna identyfikacja kwarantannowego nicienia węgorka sosnowca na podstawie RNA wykrywanego w próbkach drewna poddanemu obróbce termicznej. Badania umożliwiły rozróżnienie osobników żywych (tj. drewno bez zabiegu lub po zabiegu nieskutecznym) od martwych (po zabiegu skutecznym) oraz potwierdzenie praktycznej przydatności opisaney metody.

Materiały i metody / Materials and methods

W badaniach wykorzystano dwa izolaty kwarantannowego *B. xylophilus*: Nanjing (Chiny) oraz Pt67OL (Portugalia), utrzymywane w hodowlach laboratoryjnych Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu. Izolację RNA nicieni (od 1 do 100 osobników) przeprowadzano przy wykorzystaniu zestawu Total RNA Mini Plus Concentrator, łącznie z zastosowaniem DNaz-y wchodzącej w skład zestawu (A&A Biotechnology s.c.) w celu usunięcia zanieczyszczającego DNA w analizowanych próbkach. Dodatkowo, do badań włączono dwa gatunki blisko spokrewnione z kwarantannowym węgorkiem sosnowcem, czyli *Bursaphelenchus mucronatus* i *Bursaphelenchus fraudulentus*, które również mogą występować w drewnie sosny. Izolację DNA nicieni przeprowadzano przy pomocy zestawu NucleoSpin® Tissue (Macharey-Nagel), zgodnie ze wskazówkami producenta. Wstępną homogenizację nicieni wykonywano przy pomocy mikrohomogenizatorów ręcznych w próbkach Eppendorfa. Dalsze etapy izolacji przeprowadzano zgodnie ze wskazówkami producenta. Stężenie wyizolowanego RNA określano przy pomocy spektrofotometru NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc.). Uzyskane RNA poddawano reakcji odwrotnej transkrypcji (synteza cDNA) z wykorzystaniem odwrotnej RevertAid™ Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific). W kolejnym etapie przeprowadzano reakcję PCR z wykorzystaniem starterów specyficznych (Hsp23F1/Hsp19R2) (Leal i wsp. 2013). Wprowadzenie tych starterów do jednej mieszaniny reakcyjnej pozwala na odróżnienie DNA od cDNA węgorka sosnowca powodując otrzymywanie produktu PCR dla cDNA nicieni o długości 473 par zasad (pz), a dla DNA nicieni – 541 pz. Różnice w długościach tych produktów pozwalają na ich łatwe odróżnienie na żelu agarozowym. Mieszanina reakcyjna składała się z: 1,2 µl każdego ze starterów Hsp23F1/Hsp19R2 (stężenie 10 µM), 10 µl 2× DreamTaq™ Master Mix (Thermo Fisher Scientific) oraz 5 µl cDNA lub DNA. Ponadto, reak-

cję PCR przeprowadzano z RNA, które nie zostało poddane odwrotnej transkrypcji, tj. kontrola „no reverse transcriptase (-RT)”. Całość uzupełniano wodą sterylną do 20 µl. Reakcję PCR przeprowadzano według następujących warunków: początkowa denaturacja w 95°C przez 5 min, potem 35 cykli denaturacji w 95°C przez 30 s, przyłączanie starterów w 60°C przez 30 s, wydłużanie w 72°C przez 1 min, i końcowe wydłużanie w 72°C przez 5 min. Po zakończeniu reakcji uzyskany produkt rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics Europe) i fotografowano w świetle UV.

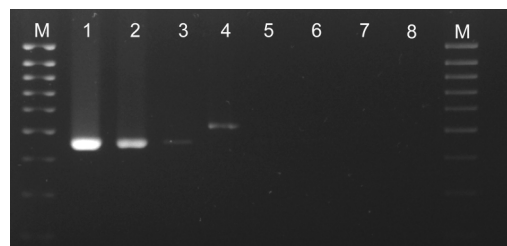
Przeprowadzone zostały doświadczenia nad szybkością zanikania RNA w martwych nicieniach. Do probówek Eppendorfa wprowadzono 100 osobników węgorka sosnowca. Łącznie przygotowano 27 takich próbek, na każdy wariant doświadczenia. Trzy próbki natychmiast zamrożono w temperaturze -20°C, aby służyła jako kontrola bez obróbki cieplnej, natomiast pozostałe próbki umieszczono na bloku grzejnym w temperaturze 56°C na 30 min (obróbka cieplna wg ISPM nr 15). Po tym czasie trzy próbki od razu zamrożono w temperaturze -20°C, a pozostałe przechowywano w temperaturze pokojowej przez różne okresy: 0, 3, 5, 10, 14, 18 i 21 dni po obróbce cieplnej. W każdym z tych dni próbki poddawano izolacji RNA, w celu potwierdzenia jego obecności w materiale.

Ponadto, przeprowadzone zostały również badania nad wykrywaniem żywych i martwych nicieni węgorka sosnowca ekstrahowanych ze świeżego drewna sosny zwyczajnej. Osobniki węgorka sosnowca (100 oraz 500 osobników) inokulowano do sześciu sztuk 5 cm krążków drewna (po 3 powtórzenia na każdy wariant, tj. do trzech krążków drewna inokulowano 100 nicieni, i do kolejnych trzech – 500 nicieni; otwór w drewnie o głębokości 2 cm), które następnie poddano zabiegowi obróbki cieplnej (56°C w rdzeniu materiału przez 30 min). Po piątym dniu od tego procesu (potwierdzone zanikanie RNA z badanych próbek), nicienie ekstrahowano z drewna poprzez zanurzenie krążków w wodzie na 24 godziny. Uzyskany ekstrakt wodny poddano izolacji RNA nicieni przy użyciu zestawu Total RNA Mini Plus Concentrator (A&A Biotechnology s.c.). Kolejne etapy, tj. syntezę cDNA oraz reakcję PCR, przeprowadzano zgodnie z opisem powyżej.

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Przeprowadzone badania potwierdziły obecność RNA węgorka sosnowca, zarówno w osobnikach martwych, jak i żywych (RNA zawsze jest obecne w żywych nicieniach, a w martwych stopniowo zanika w ciągu kilku dni). W wyniku reakcji PCR, otrzymywano również produkty dla DNA *B. xylophilus* o innej długości, co w łatwy sposób umożliwiło odróżnienie RNA od DNA tego gatunku nicienia. Przy zastosowaniu starterów specyficznych dla *B. xylophilus* dla

innych, pokrewnych gatunków (*B. mucronatus* i *B. fraudulentus*), na żelu nie otrzymywano żadnych produktów PCR (fot. 1).



Fot. 1. Elektroforetyczny rozkład produktów PCR z zastosowaniem specyficznych starterów forward i reverse (Hsp23F1/Hsp19R2): 1 – *B. xylophilus* (cDNA-100 żywych osobników); 2 – *B. xylophilus* (cDNA-100 martwych osobników); 3 – *B. xylophilus* (cDNA-1 martwy osobnik); 4 – *B. xylophilus* (DNA-100 martwych osobników); 5 – *B. mucronatus* (DNA-100 martwych osobników); 6 – *B. fraudulentus* (DNA-100 martwych osobników); 7 – kontrola „no reverse transcriptase (-RT)”; 8 – kontrola odczynnikowa; M – marker MassRuler Low Range DNA Ladder

Photo 1. PCR products separated by electrophoresis after amplification using species-specific primer (Hsp23F1/Hsp19R2): 1 – *B. xylophilus* (cDNA-100 living specimens); 2 – *B. xylophilus* (cDNA-100 dead specimens); 3 – *B. xylophilus* (cDNA-1 dead specimen); 4 – *B. xylophilus* (DNA-100 dead specimens); 5 – *B. mucronatus* (DNA-100 dead specimens); 6 – *B. fraudulentus* (DNA-100 dead specimens); 7 – control „no reverse transcriptase (-RT)”; 8 – no template control; M – marker MassRuler Low Range DNA Ladder

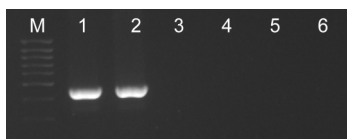
Przeprowadzone doświadczenia z wykorzystaniem reakcji PCR potwierdziły wykrywanie RNA w martwych osobnikach węgorka sosnowca do piątego dnia po obróbce termicznej. Do piątego dnia po obróbce obserwowano bardzo słabo widoczny prążek na żelu agarozowym potwierdzający wykrycie RNA w badanych próbkach. Wszystkie próbki analizowane po dziesiątym dniu od obróbki termicznej wykazały całkowity brak RNA w badanych nicieniach. Uzyskane wyniki wskazują jednoznacznie, że we wszystkich analizowanych próbkach znajdowały się już tylko martwe nicienie (w żywych nicieniach RNA byłby nadal wykrywany, natomiast w martwych osobnikach z czasem ulega on degradacji) (fot. 2).

Przeprowadzona analiza molekularna nicieni wyekstrahowanych z krążków drewna sosny zwyczajnej, poddanych wcześniej obróbce termicznej, nie wykazała obecności martwych nicieni, potwierdzając tym samym prawidłowość przeprowadzonego zabiegu termicznego (fot. 3, ścieżka na żelu 3 i 4). Ma to istotne znaczenie praktyczne szczególnie podczas granicznej kontroli fitosanitarnej drewna i opakowań drewnianych. Analiza molekularna wykrywająca martwe osobniki nicieni mogłaby dać fałszywe wyniki pozytywne, doprowadzając do niepotrzebnych zakłóceń



Fot. 2. Elektroforetyczny rozkład produktów PCR z zastosowaniem specyficznych starterów forward i reverse (Hsp23F1/Hsp19R2) po obróbce cieplnej (56°C, 30 minut): 1 – dzień „0”, próbka zamrożona, bez obróbki; 2 – dzień „0”, próbka zamrożona; 3 – dzień „0” – 0 dzień po obróbce; 4 – 3 dzień po obróbce; 5 – 5 dzień po obróbce; 6 – 10 dzień po obróbce; 7 – 14 dzień po obróbce; 8 – 18 dzień po obróbce; 9 – 21 dzień po obróbce; 10 – kontrola „no reverse transcriptase (-RT)”; 11 – kontrola odczynnikowa; M – marker MassRuler Low Range DNA Ladder

Photo 2. PCR products separated by electrophoresis after amplification using species-specific primer (Hsp23F1/Hsp19R2) after heat-treated wood (56°C, 30 minutes): 1 – day „0”, frozen sample, without heat-treated; 2 – day „0”, frozen sample; 3 – day „0” – 0 days after heat-treated; 4 – 3 days after heat-treated; 5 – 5 days after heat-treated; 6 – 10 days after heat-treated; 7 – 14 days after heat-treated; 8 – 18 days after heat-treated; 9 – 21 days after heat-treated; 10 – control „no reverse transcriptase (-RT)”; 11 – no template control; M – marker MassRuler Low Range DNA Ladder



Rys. 3. Elektroforetyczny rozkład produktów PCR po obróbce cieplnej (56°C, 30 minut): 1 – cDNA nicieni (100 żywych osobników), nie poddane obróbce cieplnej; 2 – cDNA nicieni (500 żywych osobników), nie poddane obróbce cieplnej; 3 – cDNA nicieni (100 żywych osobników), poddane obróbce cieplnej; 4 – cDNA nicieni (500 żywych osobników), poddane obróbce cieplnej; 5 – kontrola „no reverse transcriptase (-RT)”; 6 – kontrola odczynnikowa; M – marker MassRuler Low Range DNA Ladder

Photo 3. PCR products separated by electrophoresis after heat-treated wood (56°C, 30 minutes): 1 – cDNA nematodes (100 living specimens), without heat-treated; 2 – cDNA nematodes (500 living specimens), without heat-treated; 3 – cDNA nematodes (100 living specimens), after heat-treated; 4 – cDNA nematodes (500 living specimens), after heat-treated; 5 – control „no reverse transcriptase (-RT)”; 6 – no template control; M – marker MassRuler Low Range DNA Ladder

w handlu m.in. poprzez wstrzymanie transportu takiego drewna.

Przydatność wykorzystania RNA podczas analiz molekularnych drewna i opakowań drewnianych została już wcześniej potwierdzona i rekomendowana, umożliwiając odróżnianie żywych osobników kwarantannowego węgorka sosnowca od martwych (Leal i wsp. 2013, 2015). W pracy Leal i wsp. (2013), autorzy opisali technikę RT-PCR w punkcie końcowym (ang. endpoint RT-PCR) do odróżniania tych osobników. W przedstawionych badaniach technika RT-PCR została poszerzona o możliwość odróżniania martwych i żywych osobników tego nicienia w próbkach drewna, poddanych następnie obróbce termicznej, potwierdzając tym samym skuteczność analizowanej metody. W pracy Leal i wsp. (2015), autorzy opracowali izotermiczną amplifikację kwasów nukleinowych za pośrednictwem pętli poprzedzoną odwrotną transkrypcją (ang. reverse transcription, loop-mediated isothermal amplification – RT-LAMP), która specyficznie identyfikuje żywego węgorka sosnowca w drewnie poprzez wykrywanie obecności mRNA kodującego gen ekspansyny jako marker żywotności. Uzyskane wyniki pozwoliły autorom stwierdzić, że opisana metoda diagnostyczna jest szybsza i mniej zależna od kosztownego sprzętu laboratoryjnego, jak np. PCR.

Z uwagi na poszukiwanie metod zwiększających czułość i szybkość odróżniania żywych i martwych osobników węgorka sosnowca, kolejnym celem prowadzonych badań będzie opracowanie metody molekularnej wykorzystującej reakcję RT-qPCR do odróżniania nicieni tego kwarantannowego gatunku.

Wnioski / Conclusions

1. Przeprowadzone badania potwierdziły, że analiza RNA nicieni *B. xylophilus* jest wiarygodnym markerem ich żywotności i pozwala odróżnić osobniki żywe od martwych, czego nie umożliwia klasyczna analiza DNA.
2. Identyfikacja oparta wyłącznie na DNA może prowadzić do wyników fałszywie pozytywnych, ponieważ DNA pozostaje wykrywalne również w martwych nicieniach. Zastosowanie analizy RNA stanowi zatem istotne uzupełnienie diagnostyki fitosanitarnej i może wspierać ocenę zgodności materiałów drzewnych z wymaganiami standardu ISPM.

Literatura / References

- Arbuzova E.N., Karagyan G.H., Kozyreva N.I., Shchukovskaya A.G., Ghrejyan T.L., Kalashian M.Y., Akopyan K.V. 2025. First finding of *Bursaphelenchus xylophilus* in pine plantations of the Republic of Armenia. *Journal of Nematology* 57 (1): 20250004. DOI: 10.2478/jofnem-2025-0004
- Bergdahl D.R. 1988. Impact of pinewood nematode in North America: present and future. *Journal of Nematology* 20 (2): 260–265.
- FAO IPPC 2018. Regulation of wood packaging material in international trade. ISPM 15. Annex 1. Rzym, s. 34.

- Leal I., Allen E., Foord B., Anema J., Reisle C., Uzunovic A., Varga A., James D. 2015. Detection of living *Bursaphelenchus xylophilus* in wood, using reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Forest Pathology* 45 (2): 134–148. DOI: 10.1111/efp.12149
- Leal I., Foord B., Allen E., Campion C., Rott M., Green M. 2013. Development of two reverse transcription-PCR methods to detect living pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in wood. *Forest Pathology* 43 (2): 104–114. DOI: 10.1111/efp.12003
- Mamiya Y. 2004. Pine wilt disease in Japan. s. 9–20. W: The pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (M. Mota, P. Vieira, red.). Proceedings of an International Workshop, University of Évora, Portugal, 20–22 August 2001. *Nematology Monographs and Perspectives*, Volume 1. Leiden, The Netherlands, E. J. Brill, 291 ss.
- Mota M.M., Braasch H., Bravo M.A., Penas A.C., Burgermeister W., Metge K., Sousa E. 1999. First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology* 1 (7): 727–734. DOI: 10.1163/156854199508757
- NPPO 2025. One outbreak detected in Seignosse (Landes departement, Nouvelle Aquitaine region) (2025-11-04).
- Robertson L., Cobacho Arcos S., Escuer M., Santiago Merino R., Esparrago G., Abelleira A., Navas A. 2011. Incidence of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* Steiner & Buhrer, 1934 (Nickle, 1970) in Spain. *Nematology* 13 (6): 755–757. DOI: 10.1163/138855411X578888