 DOI: http://dx.doi.org/10.14199/ppp-2014-067

The use of PCR-HRM technique for detection of the quarantine nematode *Bursaphelenchus xylophilus*

Wykorzystanie techniki PCR-HRM do wykrywania kwarantannowego gatunku nicienia *Bursaphelenchus xylophilus*

Anna Filipiak, Marek Tomalak

Summary

High Resolution Melting Analysis (PCR-HRM – Polymerase Chain Reaction-High Resolution Melting) is a recently developed technique for fast, high-throughput post-PCR analysis of genetic mutations or variance in sequences of nucleic acid. It enables researchers to rapidly detect and categorize genetic mutations, identify new genetic variants without sequencing, or determine the genetic variation in a population prior to sequencing. PCR-HRM technique was also used to detect and distinguish *Bursaphelenchus xylophilus* from morphologically and genetically similar nematode species *B. mucronatus*. In the research reported here PCR-HRM was conducted on the rDNA of *B. xylophilus* (China) and Polish isolates of *B. mucronatus* (Mdz-01, Rad-03 and Wro-01), with the use of primers specifically designed from the ITS-1 region of *B. mucronatus*. The conducted study revealed that PCR-HRM is an effective essay which allows one to distinguish of *B. xylophilus* from *B. mucronatus*. This technique is very sensitive and enables detection of differences even in single nucleotides. PCR-HRM technique is also much cheaper when compared to commonly used PCR-RFLP.

Key words: *Bursaphelenchus xylophilus*; *B. mucronatus*; PCR-HRM; quarantine pest detection

Streszczenie

Reakcję PCR-HRM (Polymerase Chain Reaction-High Resolution Melting) przeprowadzano z wykorzystaniem całkowitego DNA (deoxyribonucleic acid) *Bursaphelenchus xylophilus* [izolat China pochodzący z kolekcji Instytutu Juliusa Kühna – Federalnego Centrum Badań Roślin Uprawnych (Julius Kühn Institute Federal Research Centre for Cultivated Plants – JKI) w Braunschweig, Niemcy, a uzyskany na podstawie zezwolenia Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi na import dla celów badawczych] i polskich populacji *B. mucronatus* (izolaty Mdz-01, Rad-03 i Wro-01). W reakcji PCR wykorzystano startery komplementarne do rejonu oskrzydlającego fragment ITS-1 rDNA badanych gatunków. W projektowaniu starterów wykorzystano program IDT's PrimerQuest (wersja 2.2.3). Przeprowadzone doświadczenia potwierdziły wysoką skuteczność zaprojektowanych starterów do odróżniania kwarantannowego nicienia *B. xylophilus* od najbliżej spokrewnionego z nim *B. mucronatus*. Analiza krzywej topnienia produktów reakcji wykazała obecność pojedynczego produktu amplifikacji dla każdej z przeprowadzonych reakcji. Uzyskane podczas analizy HRM znormalizowane krzywe topnienia DNA różniły się pomiędzy sobą temperaturą denaturacji, o czym świadczą znaczne przesunięcia tych krzywych względem siebie. Wskazuje to na obecność różnic w składzie nukleotydowym badanych gatunków nicieni w powielanym rejonie genomu. Reakcja PCR-HRM umożliwia wykrycie nawet pojedynczych zmian nukleotydowych w badanych produktach PCR, dzięki czemu może być bardzo przydatną metodą wspomagającą i rozstrzygającą w przypadku identyfikacji bardzo blisko ze sobą spokrewnionych gatunków i izolatów dających niejednoznaczne rezultaty w reakcji real-time PCR. W porównaniu do innych metod molekularnych, technika PCR-HRM może być dużo prostszym i znacznie tańszym sposobem identyfikowania kwarantannowego szkodnika *B. xylophilus*.

Słowa kluczowe: *Bursaphelenchus xylophilus*; *B. mucronatus*; PCR-HRM; wykrywanie szkodnika kwarantannowego

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Biologicznych Metod
Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań
A.Filipiak@iorpib.poznan.pl

Prog. Plant Prot. 54 (4): 400-402
ISSN 1427-4337

Wstęp / Introduction

W związku z coraz intensywniejszym rozprzestrzenianiem się kwarantannowego nicienia *Bursaphelenchus xylophilus* i koniecznością jego precyzyjnego odróżnienia od innych nicieni występujących w drewnie, przeprowadzono badania nad wykrywaniem tego szkodnika przy pomocy analizy PCR-HRM (Polymerase Chain Reaction-High Resolution Melting). W technice tej, podobnie jak w przypadku real-time PCR, wykorzystuje się analizę topnienia produktu PCR. Otrzymywana w trakcie badań analiza krzywych topnienia pozwala na wykrycie nawet pojedynczych różnic nukleotydowych w porównywanych produktach PCR, przez co uzyskuje się więcej informacji na temat produktu PCR, niż było to możliwe przy zastosowaniu innych technik. Ponadto metoda ta nie wymaga dodatkowego trawienia enzymami restrykcyjnymi (jak PCR-RFLP – Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism – reakcja łańcuchowej polimerazy z analizą polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych) i rozdziału elektroforetycznego, co znacznie przyspiesza uzyskanie wyników (Wittwer i wsp. 2003; Pasay i wsp. 2008).

Materiały i metody / Materials and methods

W przeprowadzonych badaniach wykorzystano całkowite DNA (deoxyribonucleic acid) *B. xylophilus* [izolat China pochodzący z kolekcji Instytutu Juliusa Kühna – Federalnego Centrum Badań Roślin Uprawnych (Julius Kühn Institute Federal Research Centre for Cultivated Plants – JKI) w Braunschweig, Niemcy, a uzyskany na podstawie zezwolenia Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi na import dla celów badawczych] i polskich populacji *B. mucronatus* (izolaty Mdz-01, Rad-03 i Wro-01). DNA izolowano przy zastosowaniu zestawu QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN) zgodnie z zaleceniami producenta. Dla DNA badanych populacji zaprojektowano własne startery, które amplifikowały fragment regionu ITS-1 rDNA (forward: 5'- CGTGCAACGGTAAAGTCTGGGTTT-3' oraz reverse 5'- AATCCTACGCTCGCCAGAACGAAT-3') (rys. 1). W projektowaniu starterów wykorzystano program IDT's PrimerQuest (wersja 2.2.3).

Mieszanina reakcyjna zawierała: 1 µl DNA (stężenie 30–50 ng/µl), 1 µl startera forward 10 µmol/µl, 1 µl startera reverse 10 µmol/µl, 1 µl EvaGreen 20X, 2 µl buforu do PCR, 0,5 µl dNTP 10 mM. Całość uzupełniano wodą do objętości 20 µl. Reakcję PCR-HRM prowadzono w następujących warunkach: początkowa denaturacja w temperaturze 95°C przez 3 minuty, 40 cykli: denaturacja w temperaturze 95°C przez 15 sekund, przyłączanie starterów w temperaturze 61°C przez 15 sekund oraz wydłużanie w temperaturze 72°C przez 15 sekund. Reakcję przeprowadzano w aparacie Rotor – Gene Q (Qiagen). Otrzymane dane analizowane były zgodnie z instrukcjami producenta.

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Przeprowadzone doświadczenia potwierdziły wysoką skuteczność zaprojektowanych starterów do powielania wybranych fragmentów DNA, które umożliwiają odróżnianie kwarantannowego nicienia *B. xylophilus* od najbliżej spokrewnionego z nim *B. mucronatus*. Analiza krzywej topnienia produktów reakcji wykazała obecność pojedynczego produktu amplifikacji dla każdej z przeprowadzonych reakcji (rys. 2). Na wykresie przedstawiono wartości uśrednione z 4 powtórzeń każdej reakcji.

Uzyskane podczas analizy HRM znormalizowane krzywe topnienia DNA różniły się pomiędzy sobą temperaturą denaturacji, o czym świadczą znaczne przesunięcia tych krzywych względem siebie. Wskazuje to na obecność różnic w składzie nukleotydowym badanych gatunków nicieni w amplifikowanym rejonie genomu (rys. 3).

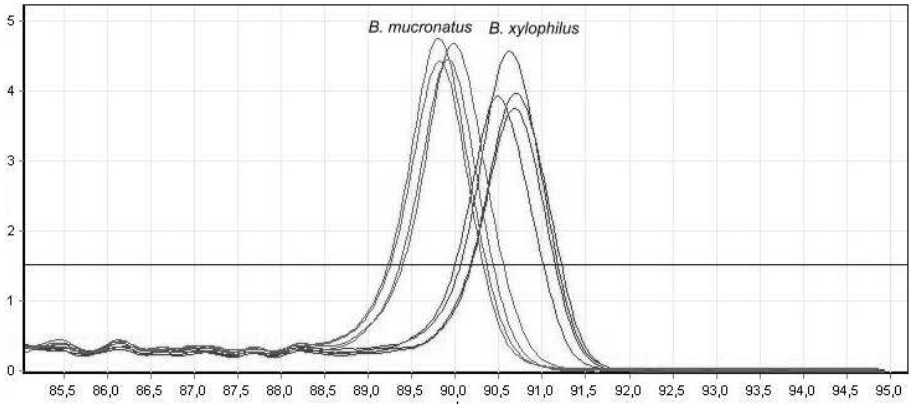
Badania potwierdziły wysoką skuteczność zaprojektowanych starterów do odróżniania kwarantannowego nicienia *B. xylophilus* od najbliżej spokrewnionego z nim *B. mucronatus*. Reakcja PCR-HRM umożliwia wykrycie nawet pojedynczych zmian nukleotydowych w badanych produktach PCR, dlatego jest bardzo dobrą metodą wspomagającą i rozstrzygającą w przypadku identyfikacji bardzo blisko ze sobą spokrewnionych gatunków i izolatów, dających niejednoznaczne rezultaty w reakcji real-time PCR. W porównaniu do innych metod molekularnych, technika PCR-HRM może być dużo prostszym i znacznie tańszym sposobem identyfikowania kwarantannowego szkodnika *B. xylophilus*.

```
A
          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                      160        170        180        190        200
Bm        CGCACGGAAG CCGAGAGGTG ACCGTGCAAC GGTAAAGTCT GGGTTTCTAT
Bx        CGCATGGAAG CCGAGAGGCG ACCGTGCAAC GGTGAAGTCT GGGTTTCTAC

B
          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                      260        270        280        290        300
Bm        GCTGCTTGCC GATTCGTTCT GGCGAGCGTA GGATTGAAAA GCCCGAGCGG
Bx        GCTGCTTGCC GATTCGTTCT GGCGAGCGTA GGATTGAAAA GCCCGAGAGG
```

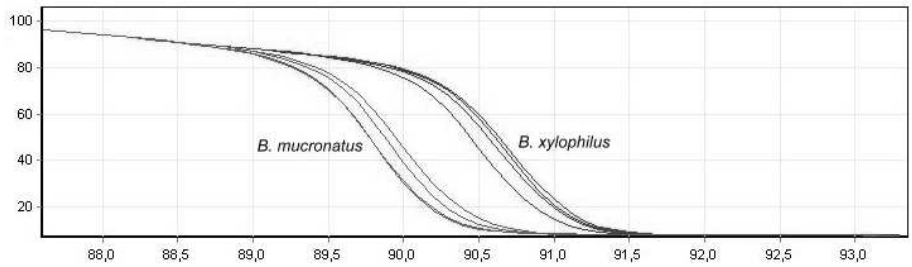
Rys. 1. Diagram ukazujący sekwencje nukleotydów startera forward (A) i reverse (B) oraz ich różnicę w sekwencji startera forward pomiędzy *B. mucronatus* i *B. xylophilus*

Fig. 1. Diagram indicating the nucleotide sequences of the forward (A) and reverse primer (B) and differences in sequence alignment of the forward primer between *B. xylophilus* and *B. mucronatus*



Rys. 2. Krzywe topnienia produktów reakcji PCR-HRM dla *B. xylophilus* i *B. mucronatus*. Na osi pionowej przedstawiono wartość fluorescencji (dF/dT), a na osi poziomej wartość temperatury topnienia (Tm) [°C]

Fig. 2. Melting curves of PCR-HRM products*: B. xylophilus* and *B. mucronatus*. The vertical axis shows the fluorescence value (dF/dT), and the horizontal axis the value of the melting temperature (Tm) [°C]



Rys. 3. Znormalizowany wykres różnicujący produkty reakcji PCR-HRM dla *B. xylophilus* i *B. mucronatus*

Fig. 3. Normalized differentiating graph of PCR-HRM products for: *B. xylophilus* and *B. mucronatus*

Wnioski / Conclusions

1. Przeprowadzone badania wykazały, że reakcja PCR-HRM umożliwia łatwe odróżnienie *B. xylophilus* od *B. mucronatus*.
2. Metoda ta jest bardzo czuła i pozwala na wykrycie różnic nawet w pojedynczych nukleotydach.
3. Analiza PCR-HRM jest również znacznie tańsza w porównaniu do powszechnie stosowanej techniki PCR-RFLP.

Podziękowania / Acknowledgments

Autorzy pragną podziękować pracownikom Międzyzakładowej Pracowni Biologii Molekularnej Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego za udostępnienie części wykorzystanego w badaniach sprzętu oraz cenne wskazówki udzielone w czasie realizacji prac i interpretacji wyników.

Literatura / References

Pasay C., Arlian L., Morgan M., Vyszenski-Moher D., Rose A., Holt D., Walton S., McCarthy J. 2008. High-resolution melt analysis for the detection of a mutation associated with permethrin resistance in a population of scabies mites. Med. Vet. Entomol. 22: 82–88.

Wittwer C.T., Reed G.H., Hundry C.N., Vandersteen J.G., Pryor R.J. 2003. High-resolution genotyping by amplicons melting analysis using LC green. Clin. Chem. 49: 853–860.