

## The use of the real-time PCR technique for detection of the quarantine nematode *Bursaphelenchus xylophilus*

### Wykorzystanie techniki real-time PCR do wykrywania kwarantannowego gatunku nicienia *Bursaphelenchus xylophilus*

Anna Filipiak, Marek Tomalak

#### Summary

The real-time PCR (polymerase chain reaction) based on TaqMan chemistry was used to detect and distinguish *Bursaphelenchus xylophilus* from other wood-inhabiting nematode species of the *xylophilus* group. In the study reported here DNA (deoxyribonucleic acid) samples of *B. xylophilus* and two other most common in Europe and both morphologically and genetically similar nematode species, *i.e.* *B. fraudulentus* and *B. mucronatus*, were examined in detail.

The study confirmed a high efficiency of the reaction primers and TaqMan probe. These components allowed detection of *B. xylophilus* in such small target DNA samples as 3 pg. In contrast, in none of the examined concentrations of DNA samples derived from *B. mucronatus* and *B. fraudulentus* any signal was produced. These results showed high sensitivity and specificity of the real-time PCR assay and its potential for rapid and accurate molecular identification of *B. xylophilus*, even in samples contaminated with DNA of other, most closely related nematode species. Therefore, we conclude that this technique could be of a great value to plant quarantine inspection.

**Key words:** *Bursaphelenchus xylophilus*, quarantine pest detection, real-time PCR, TaqMan probe

#### Streszczenie

Reakcję real-time PCR (polymerase chain reaction) (reakcja łańcuchowa polimerazy) przeprowadzano z użyciem specyficznych starterów BSatF i BSatRV zaprojektowanych dla kwarantannowego nicienia *Bursaphelenchus xylophilus* oraz sondy TaqMan. Ocenę wiarygodności tej metody przeprowadzono poddając analizie próbki DNA (deoxyribonucleic acid) (kwas deoksyrybonukleinowy) *B. xylophilus* oraz dwóch powszechnych w Europie i najbardziej zbliżonych do niego morfologicznie i molekularnie gatunków *B. mucronatus* i *B. fraudulentus*.

W przeprowadzonych badaniach potwierdzono wysoką skuteczność zaprojektowanych starterów wraz z sondą TaqMan. Przy ich zastosowaniu wykrywano *B. xylophilus* na podstawie już minimalnej ilości DNA, dochodzącej do 3 pg. W żadnym stęzeniu DNA nie wykrywano zaś pokrewnych jemu gatunków *B. mucronatus* oraz *B. fraudulentus*.

Dzięki badaniu przyrostu ilości produktu reakcji PCR w czasie rzeczywistym analiza DNA jest znacznie mniej pracochłonna i szybsza niż pozostałe, wykorzystywane do tego celu metody. Włączenie real-time PCR do praktyki, jako metody identyfikacji kwarantannowego gatunku *B. xylophilus* umożliwia łatwą eliminację wszystkich pozostałych, zbliżonych morfologicznie nicieni mogących występować w próbach drewna i tym samym może okazać się bardzo wartościowym rozwiązaniem dla służb inspekcji granicznej.

**Słowa kluczowe:** *Bursaphelenchus xylophilus*, wykrywanie szkodnika kwarantannowego, real-time PCR, sonda TaqMan

---

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

## Wstęp / Introduction

Reakcja łańcuchowa polimerazy DNA (deoxyribonucleic acid) (kwas deoksyrybonukleinowy) z analizą przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym (real-time PCR – polymerase chain reaction – reakcja łańcuchowa polimerazy) jest bardzo czułą techniką analityczną stosowaną w genetyce, biologii molekularnej i innych pokrewnych dziedzinach. Metoda ta pozwala na monitorowanie zmian stężenia produktu PCR poprzez pomiar fluorescencji proporcjonalnej do jego ilości w czasie trwania reakcji (Słomski 2011). W porównaniu z klasycznym PCR, real-time PCR zyskał szersze uznanie dzięki temu, że jest metodą szybszą, bardziej czułą i wiarygodną. Ponadto, znacznie szybciej uzyskuje się wynik, ze względu na fakt iż, analiza po zakończeniu reakcji, nie wymaga rozdziału elektroforetycznego (Wiedro i wsp. 2007).

Z uwagi na rosnącą potrzebę poszukiwania jak najbardziej precyzyjnych, wiarygodnych i szybkich metod identyfikacji kwarantannowego szkodnika *Bursaphelenchus xylophilus* i odróżnienia go od innych nicieni występujących w drewnie, przeprowadzono badania nad wykrywaniem tego gatunku przy pomocy techniki real-time PCR. Opracowanych zostało kilka par starterów wykorzystywanych w real-time PCR do identyfikacji *B. xylophilus* (Cao i wsp. 2005; Leal i wsp. 2007). Wykorzystanie jednak specyficznych starterów wraz z sondą TaqMan zaprojektowanych dla *B. xylophilus* przez François i wsp. (2007), jak do tej pory, okazało się najbardziej czułą metodą wykrywania tego gatunku, przy minimalnej wielkości próbki DNA dochodzącej do 1 pg genomowego DNA. Ma to niezwykle duże znaczenie przy wykrywaniu *B. xylophilus* występującego w bardzo małych ilościach, gwarantując jednocześnie precyzyjną jego identyfikację.

Celem przeprowadzonych badań była ocena przydatności reakcji real-time PCR z sondą TaqMan do identyfikacji kwarantannowego szkodnika *B. xylophilus*.

## Materiały i metody / Materials and methods

Reakcję real-time PCR przeprowadzano z użyciem specyficznych dla *B. xylophilus* starterów BSatF i BSatRV oraz sondy TaqMan (François i wsp. 2007) (tab. 1).

Tabela 1. Startery i sonda użyte do detekcji *B. xylophilus* w reakcji real-time PCR  
Table 1. Primers and probe used for detection of *B. xylophilus* by the real-time PCR

Startery i sonda Primers and probe	Amplifikowany region Amplified region	Sekwencja 5'→3' Sequence 5'→3'	Referencje References
BSatF (starter) (primer)	<i>MspI</i> satDNA	TGACGGAGTGAATTGACAAGACA	François i wsp. 2007
BSatRV (starter) (primer)	<i>MspI</i> satDNA	AAGCTGAAACTTGCCATGCTAAA	François i wsp. 2007
BSatS (sonda) (probe)	<i>MspI</i> satDNA	FAM-ACACCATTGAAAGCTAATGCCCTGAGA-TAMRA	François i wsp. 2007

W badaniach wykorzystano DNA nicienia *B. xylophilus*, *B. mucronatus* i *B. fraudulentus*. DNA *B. mucronatus* i *B. fraudulentus* służyło, jako kontrola negatywna. DNA izolowano przy wykorzystaniu zestawu QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN) stosując się do zaleceń producenta. Izolacje DNA przeprowadzano dla każdego gatunku osobno. Reakcję przeprowadzano w objętości 25 µl. Mieszanina reakcyjna zawierała: 34 ng DNA i następnie dziesiętnie jego rozcieńczenia (od 34 do 0,0034 ng/µl), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM każdego ze starterów (BSatF i BSatRV), 0,2 µM sondy BSatS oraz bufor reakcyjny zestawu AmpliLightReal-time PCR KIT (4X) (Novazym). Całość uzupełniano wodą do objętości 25 µl wody. Reakcję real-time PCR prowadzono w następujących warunkach: początkowa denaturacja w temperaturze 95°C przez 5 minut, 40 cykli: denaturacja w temperaturze 95°C przez 15 sekund, przyłączanie starterów w temperaturze 51°C przez 15 sekund oraz wydłużanie w temperaturze 72°C przez 20 sekund.

Reakcję przeprowadzano w aparacie Mx3005P® real-time PCR System (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Każda reakcja została powtórzona trzykrotnie, a próby bez matrycy służyły jako kontrole odczynnikowe. Wyniki były analizowane z wykorzystaniem oprogramowania MxPro™QPCR, dostarczonego przez producenta.

Na podstawie uzyskanych wartości C<sub>T</sub> (najczęściej jest to moment wejścia kinetyki reakcji w fazę logarytmicznego przyrostu ilości produktu) wygenerowano krzywą standardową i wyznaczono współczynnik korelacji liniowej.

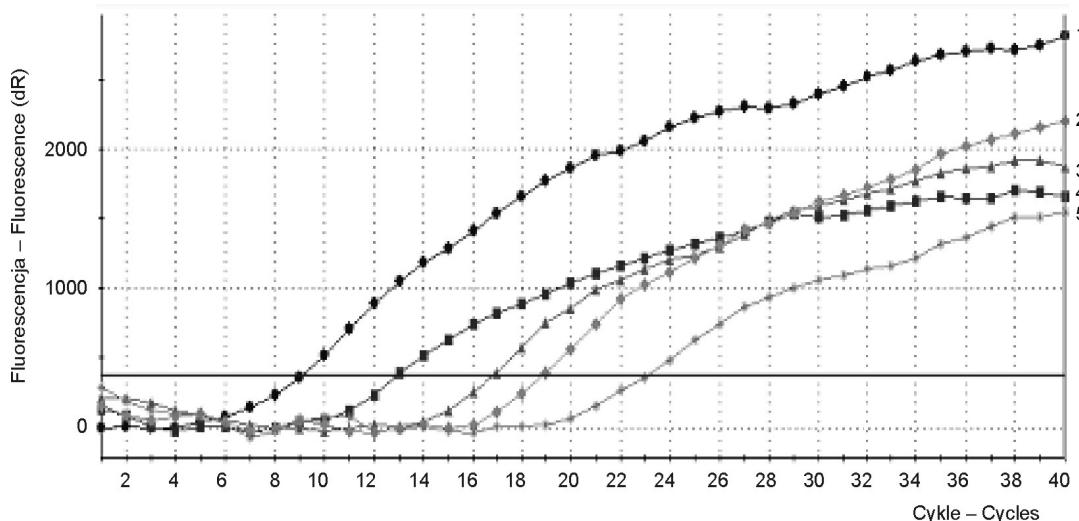
## Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Ocenę wiarygodności metody real-time PCR podjęto podając analizę próby DNA *B. xylophilus* oraz dwóch najbardziej podobnych do niego morfologicznie i genetycznie, jak również najbardziej pospolitych w Europie gatunków *B. mucronatus* i *B. fraudulentus*.

W przeprowadzonych badaniach potwierdzono wysoką skuteczność wymienionych starterów i sondy TaqMan. Przy ich zastosowaniu wykrywano *B. xylophilus* na podstawie minimalnej ilości DNA, dochodzącej do 3 pg. Żaden z testów nie wykrywał jednak obecności pokrewnych jemu gatunków *B. mucronatus* oraz *B. fraudulentus*. Na wykresie przedstawiono wartości uśrednione z 3 powtórzeń każdej reakcji. Średnie wartości  $C_T$  odczytane

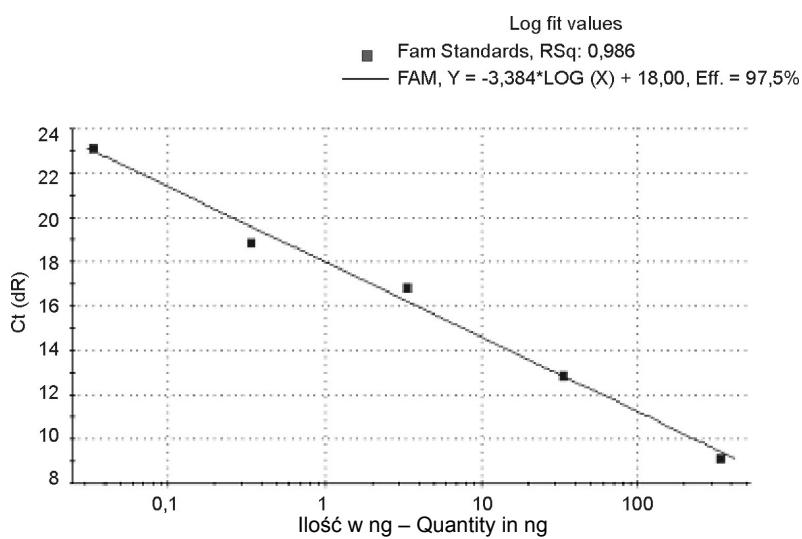
z krzywych amplifikacji dla *B. xylophilus* wynosiły od 8,86 do 22,76 (rys. 1).

Dla reakcji wyrysowano krzywą standardową z dziesięciokrotnego szeregu rozcieńczeń matrycy. Wydajność reakcji wyniosła 97,5%, a współczynnik korelacji liniowej ( $r^2$ ) = 0,98 (rys. 2).



Rys. 1. Wykrywanie gatunku *B. xylophilus* z wykorzystaniem metody real-time PCR z sondą TaqMan. Oś pozioma oznacza liczbę cykli amplifikacyjnych ( $C_T$ ), a oś pionowa – wartość fluorescencji, dR. 1 – *B. xylophilus* w stężeniu 34 ng, 2 – w 3,4 ng, 3 – w 0,3 ng, 4 – w 0,03 ng oraz 5 – w 0,003 ng

Fig. 1. Detection of *B. xylophilus* by the real-time PCR with TaqMan probe. The horizontal axis represents the number of amplification cycles ( $C_T$ ), and the vertical axis – the value of fluorescence, dR. 1 – *B. xylophilus* in concentrations of 34 ng, 2 – in 3.4 ng, 3 – in 0.3 ng, 4 – in 0.03 ng and 5 – in 0.003 ng



Rys. 2. Krzywa standardowa otrzymana w wyniku reakcji ze starterami BSatF i BSatRV oraz sondą TaqMan i serii rozcieńczeń DNA *B. xylophilus*. Oś pozioma oznacza ilość DNA w ng w kolejnych próbach, a oś pionowa – liczbę cykli amplifikacyjnych

Fig. 2. The standard curve obtained in the reaction with BSatRV and BSatF primers, and TaqMan probe with a series of dilutions of *B. xylophilus* DNA. The horizontal axis represents the amount of DNA in ng, in subsequent trials, and the vertical axis – the number of amplification cycles

## **Wnioski / Conclusions**

1. Zastosowanie reakcji real-time PCR z wykorzystaniem specyficznych starterów pozwoliło na precyzyjne wykrywanie *B. xylophilus* nawet przy tak małych wielkościach prób DNA, jak 3 pg.
2. Dzięki badaniu przyrostu ilości produktu reakcji PCR w czasie rzeczywistym analiza DNA jest znacznie mniej pracochłonna i szybsza niż pozostałe, wykorzystywane do tego celu metody.
3. Włączenie do praktyki real-time PCR, jako metody identyfikacji kwarantannowego gatunku *B. xylophilus* umożliwia łatwą eliminację wszystkich pozostałych, zbliżonych morfologicznie nicieni, mogących występo-

wać w próbach drewna i tym samym może okazać się bardzo wartościowym rozwiązaniem dla służb inspekcji granicznej.

## **Podziękowania / Acknowledgments**

Autorzy pragną podziękować pracownikom Miedzyzakładowej 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**

- Cao A.X., Liu X.Z., Zhu S.F., Lu B.S. 2005. Detection of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, using real-time PCR polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* 95: 566–571.
- François C., Castagnone C., Boonham N., Tomlinson J., Lawson R., Hockland S., Quill J., Vieira P., Mota M., Castagnone-Sereno P. 2007. Satellite DNA as a target for TaqMan real-time PCR detection of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Mol. Plant Pathol.* 8: 803–809.
- Leal I., Green M., Allen E., Humble L., Rott M. 2007. Application of a real-time PCR method for the detection of pine wood, nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in wood samples from lodgepole pine. *Nematology* 9: 351–362.
- Słomski R. 2011. Analiza DNA – Teoria i Praktyka. Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Poznań, 573 ss.
- Wiedro K., Stachowska E., Chlubek D. 2007. Łąćuchowa reakcja polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym (RT-PCR). *Rocz. Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie* 53 (3): 5–9.