

MOLEKULARNA DIAGNOSTIKA RASTLINSKO-PARAZITSKIH OGORČIC V SLOVENIJI

Barbara GERIČ STARE¹, Saša ŠIRCA², Polona STRAJNAR³, Gregor UREK⁴

^{1,2,3,4}Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Ljubljana

IZVLEČEK

Za ustrezno in učinkovito zatiranje škodljivcev je ključnega pomena pravilna in hitra identifikacija vrste škodljivca. Poleg morfoloških analiz rastlinsko-parazitskih ogorčic so za identifikacijo izrednega pomena novejšje molekularne metode. V sestavku predstavljamo molekularne metode za identifikacijo rastlinsko-parazitskih ogorčic, ki jih trenutno opravljamo na Kmetijskem inštitutu Slovenije. Predstavljamo metode kot so PCR, PCR v realnem času, PCR-RFLP, določanje nukleotidnega zaporedja rDNA ter analize proteinov za ogorčice rodov *Bursaphelenchus*, *Globodera* in *Meloidogyne*.

Ključne besede: molekularna diagnostika, nukleotidno zaporedje rDNA, PCR v realnem času, rastlinsko-parazitske ogorčice, RFLP.

ABSTRACT

MOLECULAR DIAGNOSTICS OF PLANT-PARASITIC NEMATODES IN SLOVENIA

Correct and quick identification of the species is of the utmost importance for suitable and effective control of the pests. The new molecular methods are gaining importance in the identification of plant-parasitic nematodes in addition to morphometrical analyses of the nematodes. We present the molecular diagnostic methods for identification of plant-parasitic nematodes at the Agricultural Institute of Slovenia used today. Methods such as PCR, real-time PCR, PCR-RFLP, rDNA sequencing and protein analysis for *Bursaphelenchus*, *Globodera* and *Meloidogyne* genera are discussed.

Key words: rDNA sequence, molecular diagnostics, plant-parasitic nematodes, real-time PCR, RFLP.

1 UVOD

Natančna identifikacija je osnova za diagnostiko, ukrepanje in preprečitev škode, ki jo povzročajo rastlinsko-parazitske ogorčice. Posamezne ogorčice so pogosto identificirane oz. razločevane na osnovi morfoloških značilnosti, vrsti gostitelja in patoloških učinkih na gostitelja. Vendar pa ti kriteriji pogosto niso zadostni za nedvoumno identifikacijo. Molekularne tehnike na osnovi nukleinskih kislin in proteinov zagotavljajo orodje za premagovanje teh pomanjkljivosti. Še posebno uvedba metode verižna reakcija s polimerazo ali PCR, ki jo je Kary Mullis razvil leta 1984, je povzročila pravo revolucijo na področju taksonomije in genetike rastlinsko-parazitskih ogorčic. V glavnem zato, ker njena občutljivost omogoča pomnoževanje genov oz. delov genov iz minimalne količine genomske DNA. To je

¹ dr., univ. dipl. biol., Hacquetova 17, 1000 Ljubljana, Slovenija, e-naslov: barbara.geric@kis.si

² dr., univ. dipl. inž. agr., prav tam

³ univ. dipl. inž. agr., mlada raziskovalka, prav tam

⁴ dr., univ. dipl. inž. agr., prav tam

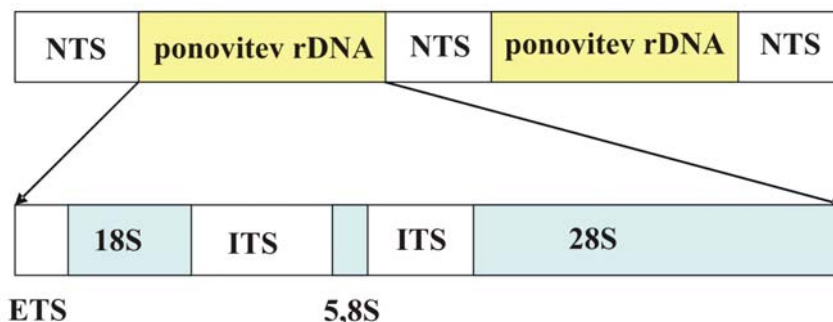
še posebej pomembno, saj je pogosto nemogoče pridobiti ali izolirati zadostno količino materiala iz nekaterih rastlinsko-parazitske ogorčice za navadne biokemijske analize (Gasser, 2001).

V sestavku predstavljamo molekularne metode za identifikacijo rastlinsko-parazitskih ogorčic, ki jih trenutno opravljamo na Kmetijskem inštitutu Slovenije.

2 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO ALI PCR IN GELSKA ELEKTROFOREZA

Metoda PCR ali verižna reakcija s polimerazo omogoča selektivno encimsko pomnoževanje dela genoma *in vitro*. Matrico, dvo-verižno genomsko DNA s segrevanjem denaturiramo oz. razpremo dvojno verigo. Naknadno zmanjšanje temperature omogoči paru začetnih oligonukleotidov hibridizacijo oz. vezavo na komplementarno zaporedje matrice. Termostabilen encim DNA polimeraza nato omogoča sintezo DNA od mesta naleganja začetnih oligonukleotidov vzdolž matrice tako, da nastane dvo-verižna molekula DNA. Sintezo na tak način ponavljamo navadno 35-krat v avtomatskem cikličnem termostatu. V vsakem ciklu se izbrani del matrične molekule DNA podvoji, tako da imamo na koncu reakcije več milijonov kopij originalne matrice na voljo za nadaljnje analize.

Del genoma, ki ga želimo pomnožiti z metodo PCR, izberemo glede na namen eksperimenta. Za identifikacijo vrste in tudi drugih taksonomskih nivojev se je kot zelo ustrezen molekularni označevalec izkazal predel genoma, imenovan ribosomalna DNA ali rDNA. rDNA nosi zapis za ribosomalno RNA in vmesna nekodirajoča zaporedja, v genomu pa jo najdemo v velikem številu zaporednih ponovitev (slika 1). Značilnost rDNA je velika evolucijska stabilnost in vrstna specifičnost. Posamezni predeli so specifični za nivo vrste, spet drugi za višje taksonomske skupine. To omogoča uporabo vrstno-specifičnih ali univerzalnih začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje odseka rDNA pri različnih vrstah znotraj skupine rastlinsko-parazitskih ogorčic.

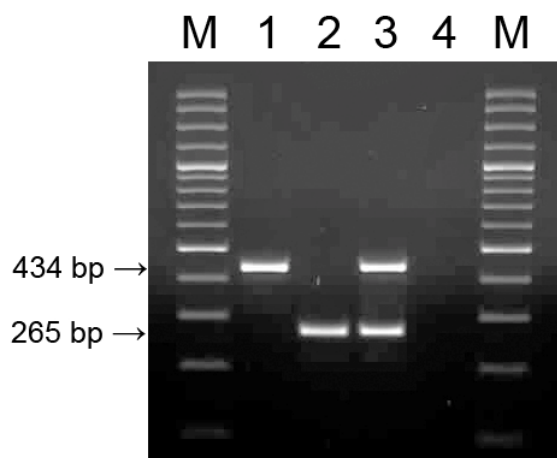


Slika 1: Shematski prikaz rDNA evkariontskih organizmov. Tandemsko se ponavlja predel, ki nosi zapis za 18S, 5,8S in 28S rRNA ter vmesna nekodirajoča zaporedja označena z ITS (notranji prepisani vmesnik), ETS (zunanji prepisani vmesnik) in NTS (ne-prepisani vmesnik).

Figure 1: Schematics of rDNA of eukariotic organisms. Tandem repeats of the region comprised of 18S, 5.8S and 28S rRNA genes and intermediate noncoding regions marked as ITS (internal transcribed spacer), ETS (external transcribed spacer) and NTS (non transcribed spacer).

Rumene in bele cistotvorne krompirjeve ogorčice *Globodera rostochiensis* in *G. pallida* lahko ločimo na principu dupleks PCR reakcije, kjer pomnožimo predel rDNA, ki zajema del 18S in del ITS1 regije. Uporabimo en univerzalni začetni oligonukleotid, ki prepozna obe vrsti, ter dva specifična, za vsako vrsto enega (Bulman in Marshal, 1997). Pomnoženi predel rDNA

molekule je različno dolg za izbrani vrsti in omogoča enostavno in nedvoumno identifikacijo vrste (slika 2). Metoda je ustrezna tudi za identifikacijo mešanih vzorcev obeh vrst.



Slika 2: Fotografija agaroznega gela s produkti dupleks PCR reakcije za identifikacijo vrst *G. rostochiensis* in *G. pallida*. DNA lestvica 100 bp Plus (Fermentas) (oznaka M), kolona 1: proga velikosti 434 bp značilna za *G. rostochiensis*, kolona 2: proga velikosti 265 bp značilna za *G. pallida*, kolona 3: prisotnost *G. rostochiensis* in *G. pallida*, kolona 4: negativna kontrola, namesto matrične DNA je v reakcijo dodana voda.

Figure 2: A photography of agarose gel with products of duplex PCR reaction for identification of *G. rostochiensis* and *G. pallida*. DNA ladder 100 bp Plus (Fermentas) (marked M), column 1: bend of 434 bp typical of *G. rostochiensis*, column 2: bend of 265 bp typical of *G. pallida*, column 3: presence of *G. rostochiensis* and *G. pallida*, column 4: negative control, water instead of matrices DNA is put into reaction.

Velikost DNA produkta, ki je nastal v PCR reakciji, lahko ocenimo z gelsko elektroforezo. Gelska elektroforeza je tehnika za ločevanje nukleinskih kislin ali proteinskih molekul s pomočjo električnega toka v gelu. Molekule potujejo v električnem polju glede na svoj naboj in velikost proti ustrezno nabiti elektrodi. Negativno nabita molekula DNA potuje skozi mrežo agaroznega gela proti anodi, hitrost potovanja pa je poleg naboja odvisna še od velikosti molekule: manjše molekule potujejo hitreje, večje molekule pa počasneje. Podobno pozitivne molekule potujejo proti katodi. Proučevane molekule obarvamo s pomočjo različnih barvil kot so etidijev bromid ali SYBR® Safe za nukleinske kisline ter srebro ali comassie modro za proteine. V našem primeru DNA molekule, ki smo jih namnožili v reakciji PCR, obarvamo z etidijevim bromidom. Ta ima lastnost, da pri UV svetlobi fluorescira, zato agarozni gel fotografiramo pod UV svetlobo.

3 PCR Z DETEKCIJO V REALNEM ČASU

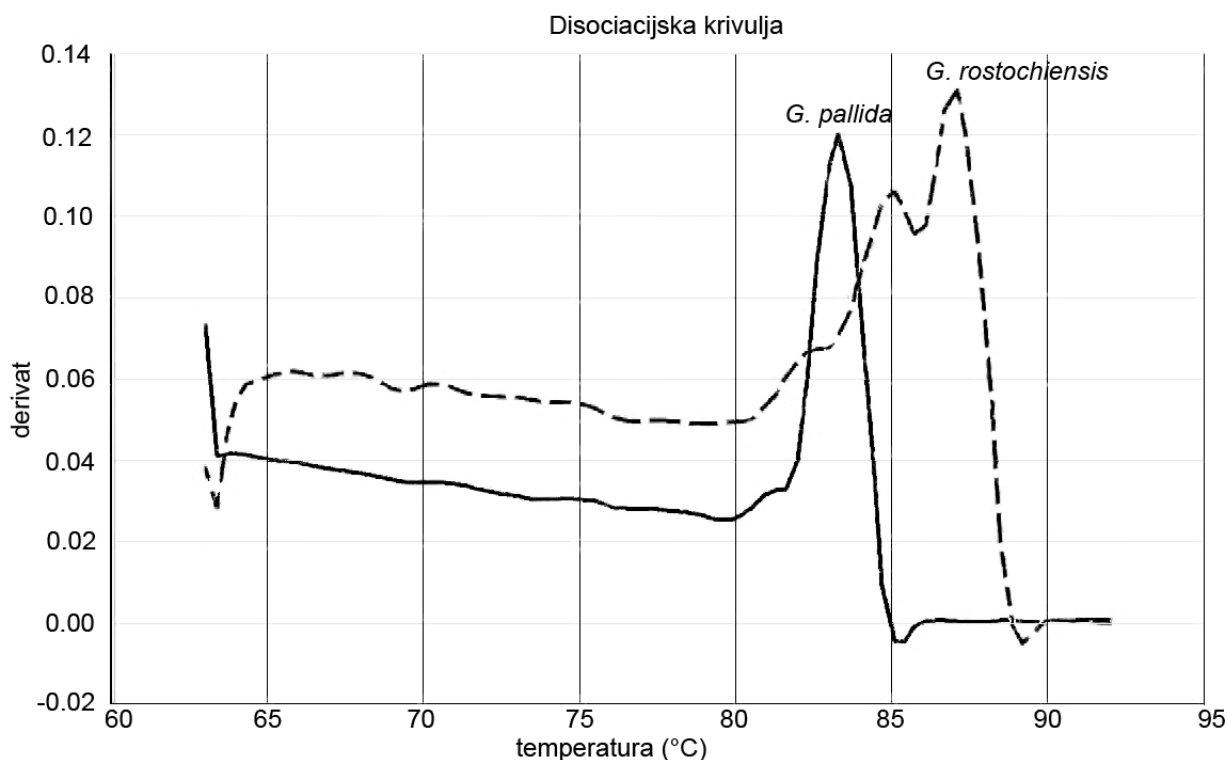
Metoda PCR z detekcijo v realnem času temelji na metodi PCR. Uporablja se za pomnoževanje matrične DNA molekule, kjer je poleg detekcije možna tudi hkratna kvantifikacija produkta. Ključna razlika od klasične PCR metode je ta, da pri PCR z detekcijo v realnem času pomnoženo DNA kvantificiramo v *realnem času* po vsakem ciklu encimskega pomnoževanja.

Na ta način se izognemo detekciji produkta na koncu pomnoževanja s pomočjo gelske elektroforeze, kar pomeni, da je identifikacija z metodo PCR in detekcijo v realnem času hitrejša. Hitrejša identifikacija pa lahko predstavlja v diagnostičnem laboratoriju veliko prednost. Na osnovi identifikacije škodljivcev odločamo o korektivnih ukrepih, katerih uspešnost je lahko neposredno odvisna od hitrosti ukrepanja. Poleg tega lahko dolgotrajna

identifikacija pomeni tudi veliko ekonomsko breme, če npr. določenega materiala ne moremo uvoziti zaradi suma na zastopanost karantenskih škodljivcev.

Obstajata dva osnovna principa metode PCR z detekcijo v realnem času glede na uporabljeno kemijo v reakciji. Prva možnost je uporaba fluorescentnega barvila (npr. SYBR green), ki se interkalarno veže z dvojno vijačnico DNA molekule. Druga možnost je uporaba modificirane oligonukleotidne sonde (npr. TaqMan), ki fluorescira, ko je hibridizirana s komplementarno verigo DNA.

Zgoraj opisano identifikacijo čistotvornih krompirjevih ogorčic vrst *G. rostochiensis* in *G. pallida*, kjer pomnožimo različno dolžino predela rDNA za izbrani vrsti, lahko testiramo tudi po metodi PCR z detekcijo v realnem času in uporabo fluorescentnega barvila SYBR green (Bačić *et al.*, 2008). DNA pomnožujemo v cikličnem termostatu z detekcijo v realnem času (Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System). Ta ima vgrajen detektor fluorescence in je povezana z računalnikom. Rezultate merjenja fluorescence po vsakem ciklu pomnoževanja obdela poseben računalniški program (Sequence Detection Software v.1.3, Applied Biosystems). Uspešnost pomnoževanja DNA odčitamo iz vrednosti praznega cikla oz. vrednosti C_t (threshold cycle). Vrsto specifičnost pomnožene molekule DNA določimo glede na temperaturo disociacije produkta, to pomeni temperaturo, pri kateri se dvojna vijačnica DNA razpre. Različno dolge molekule DNA oz. molekule DNA z različnim zaporedjem nukleotidov disociirajo pri različni temperaturi (slika 3).



Slika 3: Vrh disociacijske krivulje $87.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ pomeni prisotnost vrste *G. rostochiensis*, $83.3 \pm 0.5^\circ\text{C}$ pa prisotnost vrste *G. pallida*.

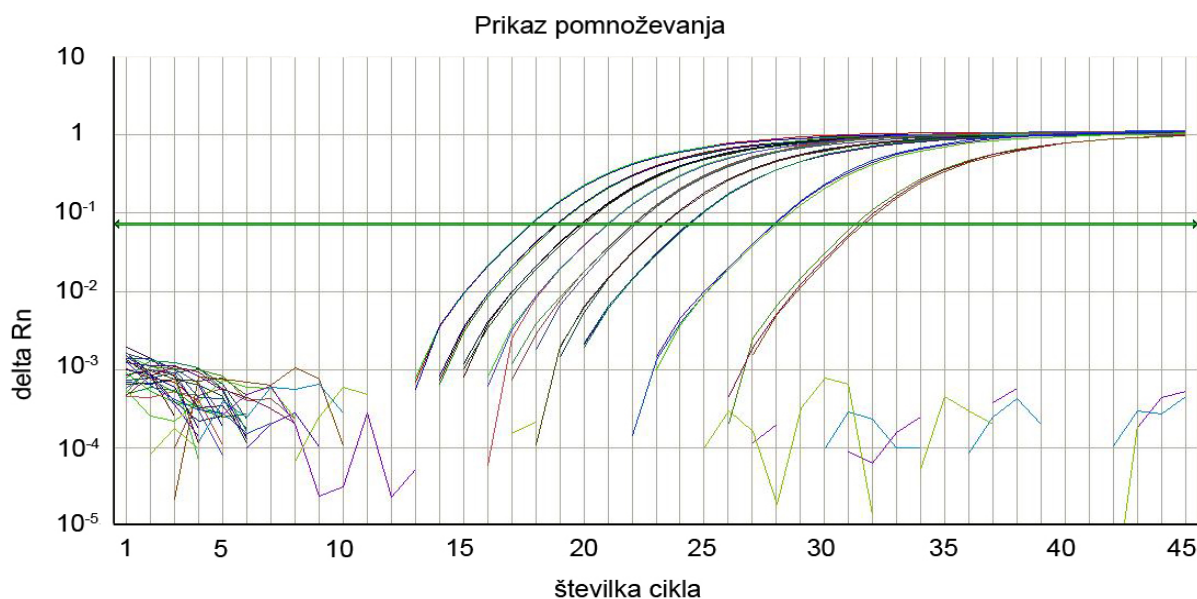
Figure 3: Peaks of dissociation curve $87.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and $83.3 \pm 0.5^\circ\text{C}$ indicate presence of *G. rostochiensis* and *G. pallida*, respectively.

Metoda PCR z detekcijo v realnem času po drugem principu, to je z uporabo specifične sonde označene s fluorescentnim barvilom, velja za najbolj specifično, vendar tudi najdražjo metodo. Tako lahko vrsti *G. rostochiensis* in *G. pallida* identificiramo tudi s pomočjo metode, ki temelji na TaqMan kemiji. V tem primeru predel rDNA pomnožujemo s pomočjo para

vrstno specifičnih začetnih oligonukleotidov ter vrstno specifičnih sond, ki so jih razvili na inštitutu SCRI (Blok *et al.*, neobjavljeno). Za razliko od prejšnjega načina, kjer fluorescirajo vse molekule dvojne vijačnice DNA v vzorcu, tudi pari začetnih oligonukleotidov in nespecifični produkti, v tem primeru fluorescirajo samo specifične molekule dvojne vijačnice DNA, ki jih v reakciji pomnožujemo. Uspešnost pomnoževanja DNA odčitamo iz vrednosti praznega cikla.

Po istem principu, z uporabo specifičnih začetnih oligonukleotidov in TaqMan sonde (Cao *et al.*, 2005) hitro določimo tudi zastopanost nevarne borove ogorčice *Bursaphelenchus xylophylus* v vzorcu.

Metoda PCR z detekcijo v realnem času je izredno občutljiva metoda, kar pomeni, da lahko pomnožimo DNA tudi iz izredno majhnega začetnega vzorca matrične DNA (slika 4). Po naših izkušnjah je 0,5 pg ali celo manj genomske DNA že dovolj za uspešno pomnoževanje. Za primerjavo naj navedemo, da po klasičnem načinu izolacije genomske DNA iz posamezne ciste krompirjeve ogorčice pridobimo nekaj μg genomske DNA. Takšna izredna občutljivost metode nam omogoča, da namesto klasične metode izolacije DNA pripravimo kar enostaven homogenizat ogorčic v destilirani vodi in tak grobi ekstrakt DNA uporabimo kot matrično DNA v PCR reakciji z detekcijo v realnem času. Tako pridemo do primerljivih rezultatov identifikacije še hitreje, saj ne potrebujemo enega dneva za izolacijo genomske DNA, pač pa homogenizat pripravimo v nekaj minutah.



Slika 4: Grafični prikaz naraščanja fluorescence med reakcijo PCR z detekcijo v realnem času pri vzorcih z razredčeno genomsko DNA, ki ga uporabljamo pri določanju občutljivosti metode.

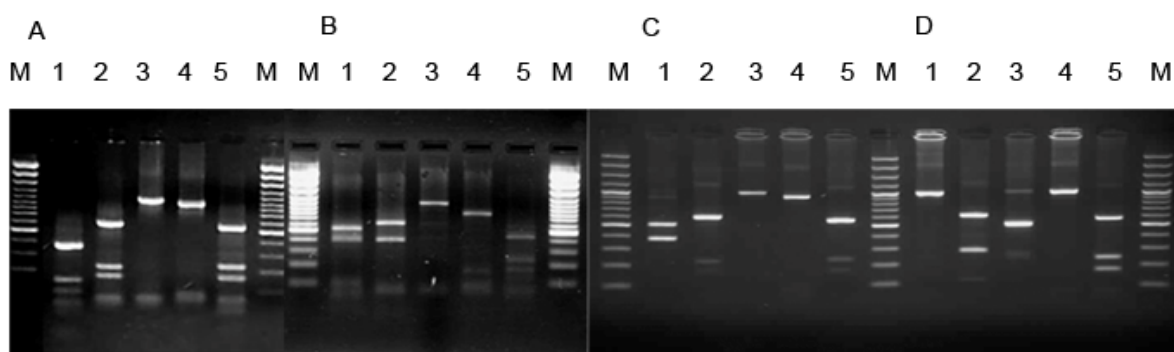
Figure 4: The schematics of the increase of fluorescence during the real-time PCR reaction in the samples with serial dilution of genomic DNA used for determination of method's sensitivity.

4 POLIMORFIZEM DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTOV ALI PCR-RFLP

Metoda polimorfizma dolžin restriksijskih fragmentov je način analize variabilnosti v nukleotidnem zaporedju DNA molekule. Tarčno molekulo DNA, ki jo predhodno pomnožimo s PCR reakcijo, razrežemo v manjše molekule z restriksijskimi encimi, njihove velikosti pa

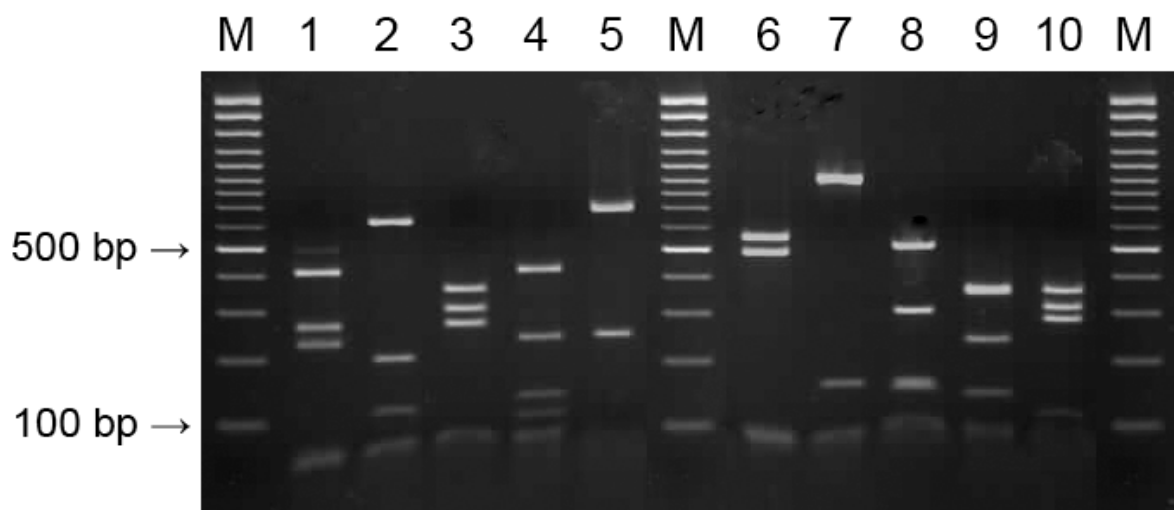
določimo z gelsko elektroforezo. Restriksijski encimi prepoznajo specifična kratka zaporedja v DNA molekuli in jo na tem mestu prerežejo (restrikcija). Če imajo DNA molekule iz različnih vzorcev variabilnost na mestu, ki ga prepozna restriksijski encim, bomo to zaznali kot različen vzorec prog na agaroznem gelu.

V sklopu molekularnega dela smo na Kmetijskem inštitutu razvili PCR-RFLP metodo, s katero ločimo med štirimi vrstami ogorčic iz rodu *Globodera*. Ločimo vrsti krompirjevih ogorčic *G. rostochiensis* in *G. pallida*, z ekonomskega vidika neškodljivo vrsto rmanove ogorčice *G. achilleae* ter tobakovo ogorčico *G. tabacum* (Širca *et al.*, 2002; Širca in Urek, 2004 b; avtorji, neobjavljeno). V PCR reakciji pomnožimo predel rDNA z univerzalnimi začetnimi oligonukleotidi. Na podlagi specifičnega vzorca po restrikciji s petimi restriksijskimi encimi ločimo med omenjenimi vrstami ogorčic (slika 5). Rmanova ogorčica *G. achilleae* je razmeroma pogosto zastopana na pridelovalnih površinah širom po Sloveniji in to novo molekularno orodje pripomore k ločevanju med vrstami, ki so paraziti krompirja, in neškodljivo vrsto.



Slika 5: Fotografija agaroznega gela s PCR-RFLP vzorci ITS regije za vrste *G. rostochiensis* (A), *G. pallida* (B), *G. tabacum* (C) in *G. achilleae* (D). DNA lestvica 100 bp Plus (Fermentas) (oznaka M), uporabljeni restriksijski encimi 1. *AluI*, 2. *RsaI*, 3. *MspI*, 4. *HinfI*, 5. *MboI*.

Figure 5: A photograph of an agarose gel with PCR-RFLP patterns of *G. rostochiensis* (A), *G. pallida* (B), *G. tabacum* (C) and *G. achilleae* (D). DNA ladder 100 bp Plus (Fermentas) (marked M), restriction enzymes used 1. *AluI*, 2. *RsaI*, 3. *MspI*, 4. *HinfI*, 5. *MboI*.

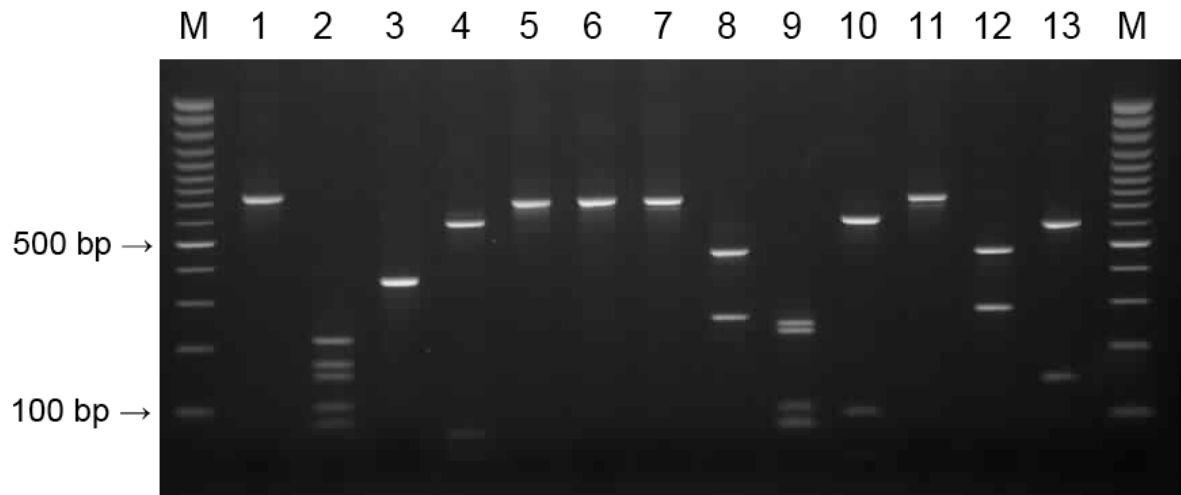


Slika 6: PCR-RFLP vzorci za vrsti *B. mucronatus* evropski genotip (levo) ter *B. hofmanii* (desno). DNA lestvica 100 bp Plus (Fermentas) (oznaka M), uporabljeni restriksijski encimi 1. *RsaI*, 2. *HaeIII*, 3. *MspI*, 4. *HinfI*, 5. *AluI*.

Figure 6: PCR-RFLP patterns of *B. mucronatus* european genotype (left) and *B. hofmanii* (right). DNA ladder 100 bp Plus (Fermentas) (marked M), restriction enzymes used 1. *RsaI*, 2. *HaeIII*, 3. *MspI*, 4. *HinfI*, 5. *AluI*.

Po podobnem principu, s PCR-RFLP metodo, kjer namnožen predel rDNA molekule razrežemo s petimi restrikcijskimi encimi, lahko določimo 26 najpogostejših vrst rodu *Bursaphelenchus* (Burgermeister *et al.*, 2005). Po tej metodi smo v Sloveniji določili prisotnost vrst *B. hofmanii* ter *B. mucronatus* (Urek *et al.*, 2006) (slika 6).

Vrsto ogorčice koreninskih šišek *Meloidogyne ethiopica*, ki smo jo v Sloveniji našli prvič v Evropi, smo proučili z PCR-RFLP metodo rDNA regije in trinajstimi restrikcijskimi encimi (slika 7) (Urek *et al.*, 2006).



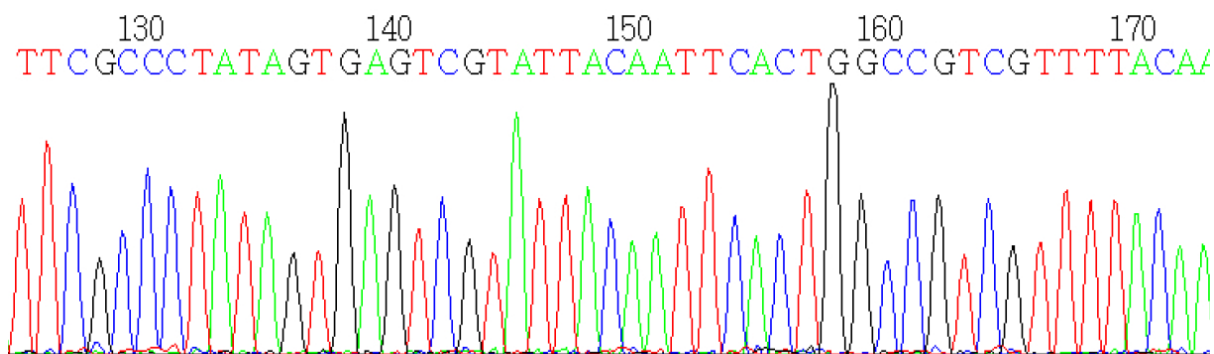
Slika 7: PCR-RFLP vzorec za vrsto *M. ethiopica*. DNA lestvica 100 bp Plus (Fermentas) (oznaka M), uporabljeni restrikcijski encimi 1. *AccI*, 2. *AluI*, 3. *DraI*, 4. *DdeI*, 5. *EcoRI*, 6. *HaeIII*, 7. *HindIII*, 8. *HinfI*, 9. *MboI*, 10. *MspI*, 11. *MunI*, 12. *PstI*, 13. *RsaI*.

Figure 7: PCR-RFLP pattern for *M. ethiopica*. DNA ladder 100 bp Plus (Fermentas) (marked M), restriction enzymes used 1. *AccI*, 2. *AluI*, 3. *DraI*, 4. *DdeI*, 5. *EcoRI*, 6. *HaeIII*, 7. *HindIII*, 8. *HinfI*, 9. *MboI*, 10. *MspI*, 11. *MunI*, 12. *PstI*, 13. *RsaI*.

5 DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA DNA

Kljub veliki ločljivosti zgoraj opisanih metod najbolj popolno informacijo o zgradbi DNA molekule dobimo z metodo določanja nukleotidnega zaporedja DNA. S to metodo določimo primarno strukturo molekule DNA, ki jo prikažemo kot linearen simboličen opis strukture. Zaporedje osnovnih gradnikov molekule DNA, nukleotidov, prikažemo s simboli A, C, G in T (adenin, citozin, gvanin in timin).

Navadno uporabljamo metodo, ki jo je razvil Frederick Sanger (metoda po Sangerju), kjer zaporedje določimo s pomočjo prekinitve sinteze DNA. Vzdolž molekule DNA, ki ji želimo določiti zaporedje, sintetiziramo nove molekule DNA s pomočjo začetnega oligonukleotida, encima DNA polimeraza in štirimi osnovnimi gradniki DNA molekule – nukleotidi A, C, G in T, skupaj z majhno koncentracijo nekoliko spremenjenih nukleotidov (navadno di-deoksinukleotidov). Ko se v rastočo verigo vgradi spremenjen nukleotid, se sinteza molekule ustavi. Zmes molekul, ki nastanejo v reakciji nato po velikosti ločimo z elektroforezo na poliakrilamidnem gelu ali v stekleni kapilari z viskozno matriksom. Modificirani nukleotidi, ki ustavijo sintezo DNA verige, so dodatno označeni z barvilom. To nam razkrije, kateri je bil zadnji nukleotid, ki se je vgradil v molekuli določene velikosti ter omogoči določitev zaporedja nukleotidov DNA molekule (slika 8).



Slika 8: Grafični prikaz določanja strukture DNA molekule imenovan kromatogram prikaže pozicijo nukleotidov v DNA molekuli (A, C, G, T).

Figure 8: The schematics of DNA sequencing named cromatogram shows position of nucleotides in DNA molecule (A, C, G, T).

Podobno kot z metodami PCR, PCR z detekcijo v realnem času ali PCR-RFLP določimo zastopanost vrste na podlagi specifične DNA molekule. Določanje nukleotidnega zaporedja rDNA omogoča izredno natančno in zanesljivo identifikacijo vrste tudi pri vzorcih, kjer druge metode ne dajo jasnega odgovora. Določeno zaporedje proučevanega vzorca z orodjem BLAST primerjamo z zaporedjem iste in sorodnih vrst oz. z vsemi določenimi zaporedji DNA molekul, ki so shranjena v javno dostopnih bazah (npr. GenBank). Velika podobnost ali identičnost našega novo določenega zaporedja z referenčnimi zaporedji v bazi pomeni pripadnost določeni vrsti. Na tak način smo določili sledeče vrste rastlinsko-parazitskih ogorčic (preglednica 1). Določanje nukleotidnega zaporedja rDNA se uporablja tudi za proučevanje sorodstvenih odnosov med vrstami, ki jih grafično ponazorimo s filogenetskimi drevesi (Širca in Urek, 2004 b, Urek *et al.*, 2007, Strajnar *et al.*, 2009).

Preglednica 1: Identifikacija vrst rastlinsko-parazitskih ogorčic na osnovi nukleotidnega zaporedja dela rDNA molekule s pripadajočimi številkami zaporedja v javni bazi zaporedij DNA.

Table 1: Identification of plant-parasitic nematode-species based on nucleotide sequence of rDNA molecule with the corresponding GenBank accession numbers of the sequences in a public database.

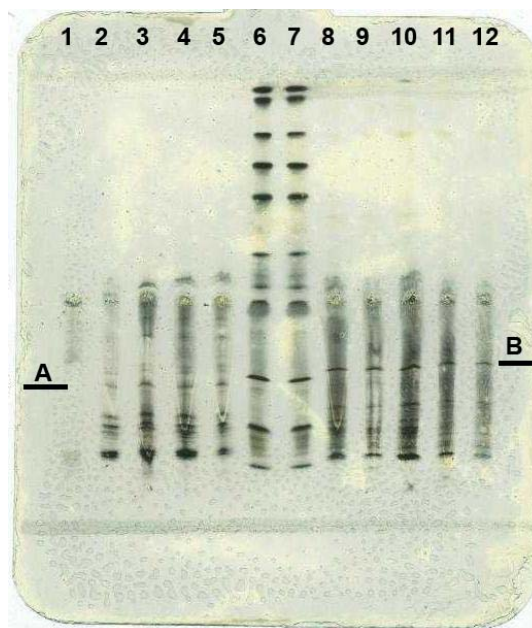
vrsta	št. zaporedja v bazi GenBank	reference
<i>Globodera rostochiensis</i>	AY700060	Širca in Urek, 2004 b
<i>Globodera achilleae</i>	AY599498	Širca in Urek, 2004 b
<i>Globodera tabacum</i>	FJ667945, FJ667946	Gerič Stare in Širca, neobjavljeno
<i>Bursaphelenchus mucronatus</i>	DQ841162	Urek in sod., 2007
<i>Bursaphelenchus hofmanii</i>	DQ841163	Urek in sod., 2007
<i>Aphelenchoides stammeri</i>	DQ841164	Urek in sod., 2007
<i>Meloidogyne ethiopica</i>	FJ559408, EU204644	Strajnar <i>et al.</i> , 2009, v tisku

V zadnjih letih se v svetu intenzivno razvija tudi tako imenovana nova generacija tehnologij za določanje nukleotidnega zaporedja, ki nam bo v prihodnosti verjetno omogočala še hitrejšo in cenejšo določanje zaporedja na drugačnem principu, s tem pa tudi večjo uporabo metode določanja nukleotidnega zaporedja DNA kot diagnostične metode za identifikacijo vrste.

6 ELEKTROFOREZA PROTEINOV

Velikost proteinov določamo z metodo gelske elektroforeze proteinov. V električnem polju se proteini v gelu razporedijo glede na njihovo velikost in naboj (glej tudi poglavje 2). V primeru, ko uporabljamo gel z vzpostavljenim pH gradientom, metodo imenujemo

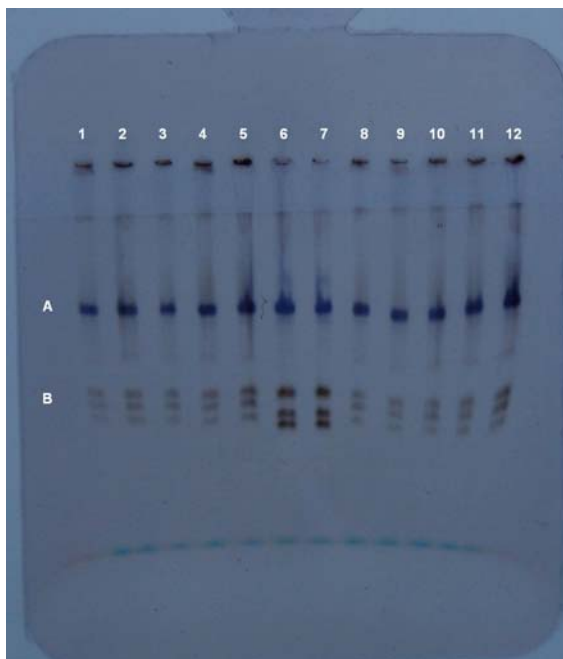
izoelektrično fokusiranje (IEF). Vsak protein je pri določeni pH vrednosti, imenovani izoelektrična točka (pI), na zunaj navidezno električno nevtralen, število pozitivnih nabojev je enako številu negativnih nabojev. Predstavljajmo si, da vzorec nekega proteina naneseemo v gel, v katerem smo poprej vzpostavili pH gradient in gel priklopimo v električno polje. Protein, ki je npr. pri pH vrednosti, pri kateri smo ga na gel nanegli, negativno nabit, bo potoval proti pozitivno nabiti anodi. Gibal se bo vse dokler ne bo dosegel pH vrednosti v gelu, ki je enaka njegovi izoelektrični točki. Takrat bo na zunaj električno nevtralen in gibanje se bo ustavilo. Če imamo v vzorčku dva proteina z različnima izoelektričnima točkama, ju lahko z metodo IEF med seboj ločimo. Proteini so pri pH vrednostih pod izoelektrično točko pozitivno, pri pH vrednostih nad izoelektrično točko pa negativno nabiti (Malovrh, 2007). Cistotvorni vrsti krompirjevih ogorčic *G. rostochiensis* in *G. pallida* lahko ločimo z metodo IEF ločevanja celokupnih proteinov. Vse proteine v osebku ločimo na poliakrilamidnem gelu z gradientom pH (PhastGel 3-9) ter jih obarvamo s srebrom (slika 9) (Širca *et al.*, 2003).



Slika 9: Poliakrilamidni gel prikazuje IEF vzorec posamezne ciste pri vrstah *G. pallida* (kolone 1-5) in *G. rostochiensis* (kolone 8-12), kalibracijski komplet za širok spekter izoelektričnih točk (pI) (koloni 6, 7). Z A in B so označene razlike v pI.

Figure 9: Polyacrylamide gel shows IEF pattern of a single cyst of *G. pallida* (columns 1-5) and *G. rostochiensis* (columns 8-12), broad pI calibration kit (columns 6, 7). A and B mark difference in pI.

Tudi za identifikacijo vrst iz rodu *Meloidogyne* uporabljamo metodo elektroforeze proteinov. Na poliakrilamidnem gelu z gradientom gostote ločimo izoencime. Izoencime malat dehidrogenaze (MDH) in esteraze (EST) obarvamo z encimsko reakcijo s primernim substratom (slika 10) (Širca in Urek, 2004 a; Strajnar *et al.*, 2009). Za referenco se uporablja vzorec *M. javanica*.



Slika 10: Fenotipski vzorec izoenzimov MDH (A) in EST (B) posamezne samice *M. ethiopica* (kolone 1 - 5, 8 - 12) in *M. javanica* (kolone 6, 7) kot reference. Vzorec MDH je pri obeh vrstah enak, vzorec EST pa razlikuje vrsti *M. ethiopica* in *M. javanica*.

Slika 10: Isozymes MDH (A) and EST (B) phenotype patterns of individual female of *M. ethiopica* (lanes 1 - 5, 8 - 12) and *M. javanica* (lanes 6, 7) as a reference. MDH phenotype is not species-specific compared to EST phenotype.

7 ZAKLJUČEK OZ. PREDNOSTI IN SLABOSTI MOLEKULARNIH TEHNIK IDENTIFIKACIJE

Za konec povzemimo prednosti molekularnih tehnik identifikacije:

- identifikacija je možna tudi iz majhnega vzorca začetnega materiala (velika občutljivost metod, še posebno pri metodi PCR z detekcijo v realnem času),
- velika zanesljivost identifikacije (velika specifičnost metod), ki smo jo pokazali tudi v mednarodnih med-laboratorijskih primerjavah identifikacije vzorcev,
- velika hitrost identifikacije (še posebno z metodo PCR z detekcijo v realnem času),
- enostavno sočasno obravnavanje velikega števila vzorcev (še posebno z metodama PCR in PCR z detekcijo v realnem času),
- možnost primerjave rezultatov zaporedja z velikimi javnimi bazami podatkov (za metodo določanja nukleotidnega zaporedja DNA),
- za identifikacijo niso potrebne dolgoletne izkušnje oz. ozka specializiranost za skupino organizmov kot pri identifikaciji rastlinsko-parazitskih ogorčic na osnovi morfoloških značilnosti.

Po drugi strani pa je slabost molekularnih tehnik, da lahko že enostavna zamenjava posamezne baze v molekuli DNA (mutacija) tako spremeni strukturo molekule, da jo z izbranimi začetnimi oligonukleotidi, sondami in restrikcijskimi encimi ne prepoznamo več in identifikacija po izbrani metodi ni mogoča. Zato v praksi kombiniramo identifikacijo na osnovi morfoloških značilnosti z rezultati identifikacije z molekularnimi tehnikami, na voljo pa imamo tudi več molekularnih tehnik za identifikacijo posameznih vrst rastlinsko-parazitskih ogorčic.

8 LITERATURA

- Bačić, J., Gerič Stare, B., Širca, S., Urek, G. 2008. Analyses of *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* populations from Serbia by morphometrics and real-time PCR. Russian journal of nematology, 16, 1: 61-63.
- Bulman, S.R., Marshal, J.W. 1997. Differentiation of Australasian potato cyst nematode (PCN) populations using the polymerase chain reaction (PCR). New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 25: 123-129.
- Burgermeister, W., Metge, K., Braasch, H., Buchbach, E. 2005. ITS-RFLP patterns for differentiation of 26 *Bursaphelenchus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae) and observations on their distribution. Russian journal of nematology, 13, 1:29-42.
- Cao, A.X., Liu, X.Z., Zhu, S.F., Lu, B.S. 2005. Detection of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, using a real-time polymerase chain reaction assay, Phytopathology, 95: 566-571.
- Gasser Robin, B. 2001. Identification of Parasitic Nematodes and Study of Genetic Variability Using PCR Approaches, str. 53-82, V: Parasitic Nematodes: Molecular Biology, Biochemistry and Immunology, Kennedy, M.W., Harnett, W. (Ur.). CABI Publishing: 486 strani.
- Malovrh, P. 2007. Krvni doping – športniki, novodobni vampirji?. Kvarkadabra, <http://www.kvarkadabra.net/article.php/Krvni-doping>.
- Strajnar, P., Širca, S., Gerič Stare, B., Urek, G. 2009. Characterization of Root Knot Nematode *Meloidogyne ethiopica* Whitehead, 1968 from Slovenia. Russian Journal of Nematology, v tisku.
- Širca, S., Urek, G. 2004 a. Dissemination of the root knot nematodes, *Meloidogyne* spp. in Slovenia = Razširjenost ogorčic koreninskih šišk, *Meloidogyne* spp. v Sloveniji. Razpr. - Slov. akad. znan. umet., Razr. naravosl. vede, 45, 1: 161-170.
- Širca, S., Urek, G. 2004 b. Morphometrical and ribosomal DNA sequence analysis of *Globodera rostochiensis* and *Globodera achilleae* from Slovenia. Russian journal of nematology, 12, 2: 161-168.
- Širca, S., Urek, G., Karssen, G. 2004. First report of the Root-Knot nematode *Meloidogyne ethiopica* on tomato in Slovenia. Plant disease, 88: 680.
- Širca, S., Urek, G., Meglič, V. 2003. Molecular and biochemical methods used for the identification of *Globodera* species in Slovenia. Plant Protection Science, 39, 4: 151-153.
- Širca, S., Urek, G., Gerič Stare, B., Karssen, G. 2006. Biochemical and molecular characterization of *Meloidogyne* species from Slovenia. V: Jones, J. (ur.). European Society of Nematologists XXVIII International Symposium, programme and abstracts : 50 years ESN, Blagoevgrad, Bolgaria, 5-9 junij 2006. Sofia-Moscow: Pensoft, 2006: 150-151.
- Urek, G., Širca, S., Gerič Stare, B. 2007. Morphometrical and molecular characterization of *Bursaphelenchus* species from Slovenia. Helminthologia (Bratisl.), 44, 2: 37-42.