

PRIMERJAVA RAZLIČNIH POSTOPKOV EKSTRAKCIJE DNA ZA UPORABO PRI DIAGNOSTIKI PODLUBNIKOV

Andraž MARINČ¹, Tine HAUPTMAN², Barbara PIŠKUR³

¹⁻³Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana

IZVLEČEK

Podlubniki (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) pomembno vplivajo na strukturo gozdnih ekosistemov. Čeprav se praviloma razvijajo le na oslabljenem in svežem odmrlem drevju, nekatere vrste podlubnikov veljajo za najpomembnejše škodljive organizme naših gozdov. V zadnjem obdobju v Evropi beležimo vse več najdb tujerodnih podlubnikov. Morfološke analize hroščev mnogokrat ne zadostujejo za nedvoumno potrditev novih najdb, zato je pogosto potrebno izvesti molekularno identifikacijo. Izbor ustreznega postopka izolacije DNA je odvisen od različnih kriterijev, kot so npr. cena, čas, težavnost in uspešnost izvedbe. Za namen identifikacije podlubnikov smo preizkusili pet komercialno dostopnih DNA ekstrakcijskih kitov. Primerjali smo čas potreben za ekstrakcijo, ceno, količino in čistost ekstrahirane DNA ter uspešnost sosledne uporabe ekstrahirane DNA za PCR s končnim ciljem priprave za sekvenciranje. Na podlagi izbranih kriterijev smo izbrali najustreznejši postopek za izvedbo molekularne identifikacije podlubnikov v Laboratoriju za varstvo gozdov na Gozdarskem inštitutu Slovenije.

Gljučne besede: ekstrakcija DNA, molekularne metode, PCR, podlubniki, Scolytinae

ABSTRACT

EVALUATION AND COMPARISON OF DIFFERENT DNA EXTRACTION PROTOCOLS FOR IDENTIFICATION OF BARK BEETLES

Bark beetles (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) have a significant impact on the structure of forest ecosystems. Although they mostly develop on weakened and freshly dead trees, some bark beetle species are regarded as the most important pests of our forests. In recent years, a growing number of non-native bark beetles have been recorded in Europe. Morphological analyses of the beetles are frequently insufficient to unambiguously confirm the new findings; therefore, it is often necessary to perform molecular identification. The choice of an appropriate molecular method depends on disparate criteria, such as price, time, difficulty and success rate of the procedure. Five commercially available DNA extraction kits were tested for their suitability in bark beetle identification, comparing the time needed to perform an extraction, price, extracted DNA

¹ študent, magistrski študijski program Biotehnologija, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

² doc. dr., Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire, Večna pot 83, SI-1000 Ljubljana

³ dr., Gozdarski inštitut Slovenije, Odd. za varstvo gozdov, Večna pot 2, 1000 Ljubljana

quantity and purity as well as success rate of the subsequent PCR in preparation for DNA sequencing. Based on the aforementioned criteria the most suitable method was chosen for use in bark beetle identification in the Laboratory of Forest Protection at the Slovenian Forestry Institute.

Key words: DNA extraction, molecular methods, PCR, , *Scolytinae*, under bark beetles

1 UVOD

Mednarodna trgovina in globalizacija sta omogočili hitrejši prenos tujerodnih, nemalokrat škodljivih vrst, ki lahko predstavljajo motnjo v kompleksnih odnosih med vrstami (Liebhold in sod., 2017). V zadnjem času tudi v Evropi opažamo več na novo prispelih tujerodnih vrst podlubnikov (Kirkendall in Faccoli, 2010). Podlubniki se praviloma razvijajo na predhodno oslavljenem in sveže odmrlem drevju, nekatere vrste pa lahko uničijo sicer zdrava drevesa in tako povzročajo gospodarsko in okoljsko škodo (Podlesnik in sod., 2017). Podnebne spremembe bodo gozdove podvrgle dodatnemu stresu, posebej sušam; pričakovati je torej še večji vpliv podlubnikov na stanje gozdov (Lantschner in sod., 2019). Zgodnje odkrivanje in pravilno identificiranje (kakor pri pojavljanju vseh patogenih organizmov (Tedersoo in sod., 2019)) je pomembno za napovedovanje in obvladovanje nadaljnega razvoja gozdov. Zanesljiva izvedba molekularnih postopkov pomeni dodatno zanesljivost morfološki identifikaciji in je še posebej pomembna pri vrstah, ki so za neko območje prvič poročane. Za izvedbo molekularnih postopkov moramo pridobiti zadostno količino kakovostne genomske DNA. Poleg tega pa so za izbiro ustreznega postopka ekstrakcije DNA za rutinske analize pomembni tudi drugi dejavniki, kot je npr. cena, težavnost postopka, čas. Primerjali smo koncentracijo, skupno maso in čistost DNA pridobljene z uporabo petih komercialno dostopnih DNA ekstrakcijskih kitov. Uspešnost PCR s standardnimi začetnimi oligonukleotidi smo preverili z intenziteto pomožkov vidnih na elektroforetskem gelu. Dodatno smo spremljali tudi čas, ki je potreben za izvedbo ekstrakcije DNA iz štirih osebkov podlubnikov. Na podlagi pridobljenih podatkov smo nato izbrali najprimernejšo metodo za uporabo v rutinski identifikaciji podlubnikov v Laboratoriju za varstvo gozdov na Gozdarskem inštitutu Slovenije.

2 MATERIALI IN METODE

2.1 Materiali

Uporabili smo pet ekstrakcijskih kitov: DNEasy Blood and Tissue (Qiagen), Genelute Mammalian Genomic DNA Miniprep (Sigma-Aldrich), Nucleospin DNA Insect (Macherey-Nagel), Nucleospin Tissue XS (Macherey-Nagel) in UltraClean Tissue and Cells DNA Isolation kit (MO BIO Laboratories Inc.). Za lizo vzorcev (razen pri Nucleospin DNA Insect in UltraClean Tissue and Cells DNA Isolation kit, ki sta imela priložen material za homogenizacijo vzorcev) smo uporabili Lysing Matrix A (MP Biomedicals).

2.2 Izolacija DNA iz podlubnikov

Primerki podlubnikov so bili ujeti v križne cevne pasti tipa WitaPrall IntPt (Witasek), kot vaba je služil 96 % etanol (Pharmachem), kot konzervans v zbirni posodi pa antifriz (Petrol). Po opravljeni determinaciji vzorcev so bili izbrani osebki podlubnikov shranjeni v 99 % etanolu, in sicer od poletja 2018 do ekstrakcij DNA, opravljenih med 20. 11. 2018 in 10. 1. 2019. Vsako od petih ekstrakcijskih metod smo opravili v štirih ponovitvah (tj. s štirimi osebki podlubnikov). Hrošče smo prenesli na sterilni filtrirni papir, jih osušili in stehtali. Tehtanju je sledila homogenizacija in liza. Pri ekstrakcijskem kitu NucleoSpin DNA Insect smo vzorce prenesli v priložene tubice »NucleoSpin Bead Tube Type D« s kovinskimi kroglicami, pri kitu UltraClean Tissue and Cells DNA Isolation pa smo vzorce prenesli v priložene tubice »Dry Beads Tube«. Vsi ostali vzorci so bili preneseni v tubice »Fast prep Lysing Matrix A«, dodali smo jim pufre po navodilih proizvajalcev. Vzorce smo homogemizirali na homogenizatorju Precellys Evolution (Bertin Technologies) pri 6100 rpm, 3 x 50 s, s 15-sekundnimi premori. Razen pri kitu NucleoSpin DNA Insect (brez inkubacije) in kitu UltraClean Tissue and Cells DNA Isolation (30 min inkubacija na 60 °C) smo po homogenizaciji vse vzorce inkubirali eno uro v bloku (Thermo Mixer, Eppendorf) pri 56 °C in 700 rpm. Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali 1 min na 10 000 g in nato supernatant prenesli v novo 1,5 ml mikrocentrifugirko. Pri nadaljnjih korakih smo sledili standardnim navodilom proizvajalcev, le pri Nucleospin Tissue XS smo uporabili protokol s segravanjem končnega eluata za odparevanje etanola. Končni volumen raztopine DNA pri kitu Nucleospin Tissue XS je zato 15 µL (15 µL je med segrevanjem izhlapelo). Koncentracijo DNA smo določili na spektrometru (Biophotometer, Eppendorf) z uporabo kivete UVette (Eppendorf).

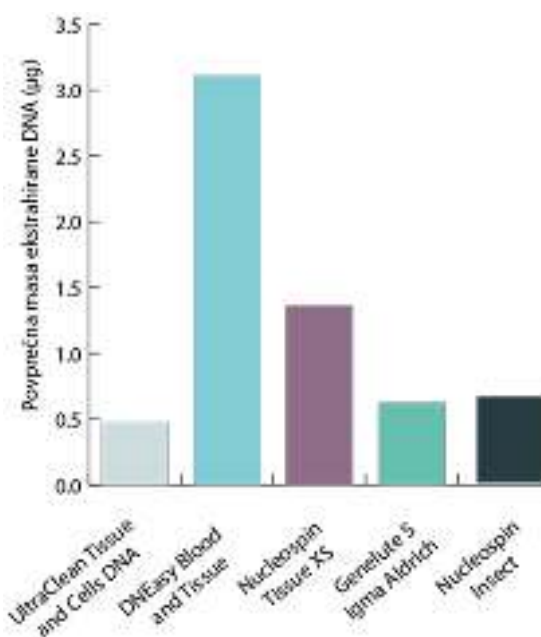
510

2.3 PCR amplifikacija

Za pomoževanje fragmenta regije mtDNA, ki kodira mitohondrijsko citokromsko oksidazo (COI), smo uporabili univerzalne začetne oligonukleotide LCO1490 in HCO2198 (Folmer in sod., 1994). PCR smo izvedli v aparatu Mastercycler Nexus (Eppendorf) pri pogojih: 95 °C / 3 min, 5x (95 °C / 30s, 45 °C / 30s, 72 °C / 1min), 35x (95 °C / 30s, 51 °C / 1 min, 72 °C / 1 min), 72 °C / 10 min (EPPO, 2016). V 25-mikrolitrsko reakcijsko mešanico za izvedbo PCR smo zamešali 12,5 µl 2x AmpliTaq Gold 360 MM (Thermo Fischer Scientific), 0,5 µl 12 µM raztopine obeh začetnih oligonukleotidov, 9,5 µl MQ vode in 2 µl ekstrahirane DNA. Uspešnost PCR smo preverili z uporabo horizontalne agarozne gelske elektroforeze z dodatkom etidijevega bromida.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Povprečna masa analiziranih podlubnikov je bila 1,33 mg (N = 19, en vzorec od 20 se je izgubil pri centrifugiranju zaradi počene zbiralne tubice). Uspešnost PCR pri vseh ekstrakcijskih kitih je bila 100 %. Čas, potreben za izvedbo ekstrakcije iz štirih primerkov podlubnikov, vključno s časom inkubacije za lizo vzorcev, je variiral med 1 h 3 min in 2 h 15 min. Brez inkubacije so časi variirali med 1 h in 1 h 15 min. Ekstrakcijo smo najhitreje izvedli s kitom Nucleospin DNA Insect.



511

Slika 1: Povprečna masa ekstrahirane DNA.

Preglednica 1: Primerjava petih ekstrakcijskih metod.

Ekstrakcijski kit	DNEasy Blood and Tissue	Genelute Mammalian Genomic DNA	Nucleospin DNA Insect	Nucleospin Tissue XS	UltraClean Tissue and Cells DNA Isolation kit
Proizvajalec	Qiagen	Sigma-Aldrich	Macherey-Nagel	Macherey-Nagel	MO BIO Laboratories Inc.
Končni volumen	100	200	100	15	50
Povprečna koncentracija DNA (µg/mL)	31,1	3,1	6,5	90,5	9,5
Povprečna masa ekstrahirane DNA (µg)	3,11	0,63	0,65	1,36	0,48
Uspešnost PCR (%)	100	100	100	100	100
Čas za 4 ekstrakcije z inkubacijo	2 h 1 min	2 h 15 min	1 h 3 min	2 h	1 h 45 min
Čas za 4 ekstrakcije brez inkubacije	1 h 1 min	1 h 15 min	1 h 3 min	1 h	1h 15 min
Cenovni indeks*	100	82	62	93	53

*Izračunan kot $100 \times (\text{cena metode} / \text{cena najdražje metode})$; 100 je indeks najdražje metode, 53 je indeks najcenejše metode, katere strošek je znašal 53 % stroška najdražje.

Če ne upoštevamo časa inkubacij pri povišani temperaturi, je bil najhitrejši postopek Nucleospin Tissue XS, dasiravno samo za 1 minuto; v tem primeru so vsi ekstrakcijski kiti primerljivi (Preglednica 1). Najvišjo koncentracijo DNA smo dosegli pri kitu Nucleospin Tissue XS, največjo skupno maso DNA pa pri kitu DNeasy Blood and Tissue (slika 1). Z izjemo kita UltraClean Tissue and Cells, ki ni več v prodaji, so vsi ekstrakcijski kiti ustrezni za uporabo na podlubnikih. Z najdražjim postopkom smo sicer izolirali največ DNA; približno 2,3-krat več kot pri drugem najboljšem postopku. Kit Nucleospin DNA Insect, ki je zaradi priloženih homogenizacijskih tubic najcenejši od uporabljenih kitov, daje zadovoljive rezultate brez inkubacije vzorcev. Ker smo imeli na razpolago le omejeno število ujetih osebkov podlubnikov iste vrste, nismo izvedli še ekstrakcije s kitom Nucleospin DNA Insect, kjer bi vključili predhodno inkubacijo vzorcev na povišani temperaturi, kar bi lahko vplivalo na količino pridobljene DNA.

4 SKLEPI

Izbira ekstrakcijskega kita je odvisna od namena uporabe, za manjše število razpoložljivih vzorcev je primeren kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen), za večje število neomejeno dostopnih vzorcev pa zaradi nizke cene Nucleospin DNA Insect (Macherey-Nagel). Pri slednjem bi veljalo preveriti učinkovitost ob uporabi primerljive inkubacije vzorcev na povišani temperaturi.

5 LITERATURA

- European and Mediterranean Plant Protection Organisation, 2016. PM 7/129 (1) DNA barcoding as an identification tool for a number of regulated pests. OEPP/EPPO Bulletin, 46: 501-537
- Folmer, Black et al. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294-299
- Kirkendall L., Faccoli M. 2010. Bark beetles and pinhole borers (Curculionidae, Scolytinae, Platypodinae) alien to Europe. *Zookeys*, 56: 227-251
- Lantschner M. V., Aukema B. H., Corley J. C. 2019. Droughts drive outbreak dynamics of an invasive forest insect on an exotic host. *Forest Ecology and Management*, 433: 762-770
- Liebold A. M., Brockerhoff E. G., Nuñez M. A. 2017. Biological invasions in forest ecosystems: a global problem requiring international and multidisciplinary integration. *Biological Invasions*, 19, 11: 3073-3077
- Podlesnik J., Mihajlović L., Jurc M. 2017. A two-year study of parasitoid entomofauna associated with spruce bark beetles (Coleoptera: Curculionidae) in the alpine belt of Slovenia (Pohorje). *Phytoparasitica*, 45, 2: 135-145
- Tedersoo L., Drenkhan R., Anslan S., Morales-Rodriguez C., Cleary M. 2019. High-throughput identification and diagnostics of pathogens and pests: Overview and practical recommendations. *Molecular Ecology Resources*, 19, 1: 47-76