

UPORABA MOLEKULARNIH METOD ZA DOLOČANJE FITOPATOGENIH BAKTERIJ NA PRIMERU *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.*

Tina DEMŠAR¹, Nataša PETROVIČ², Dejan ŠTEBIH³,
Tanja DREO⁴, Aleš BLATNIK⁵, Maja RAVNIKAR⁶

^{1,2,3,4,5,6} Nacionalni inštitut za biologijo,
Oddelek za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo,
1000 Ljubljana, Slovenija

IZVLEČEK

Bakterijski hrušev ožig, ki ga povzroča bakterija *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.*, je karantenska bolezen sadnega drevja in nekaterih okrasnih rastlin. Bolezen je zastopana že skoraj po vseh državah Evrope, tudi pri naših sosedah, zato njen morebitni vnos predstavlja resno grožnjo za pridelavo hrušk, jabolk in drugega sadilnega materiala v Sloveniji. Postopek laboratorijskega testiranja, ki ga predpisuje organizacija EPPO (European Plant Protection Organization), temelji na izolaciji bakterije na semiselektivnih in neselektivnih gojiščih, seroloških tehnikah (aglutinacijski in imunofluorescenčni test), biokemijskih testih in testu patogenosti na nezrelih plodovih hrušk. Kot dopolnilo naštetim laboratorijskim testom smo uvedli molekularno metodo PCR za potrditev izolirane bakterijske kulture *Erwinia amylovora*, ki hkrati omogoča določanje in razlikovanje od bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, povzročiteljice bolezni z zelo podobnimi bolezenskimi znamenji kot hrušev ožig, in od drugih pogostih bakterij sadnega drevja. V prispevku predstavljamo rezultate testov PCR z uporabo različnih začetnih oligonukleotidov, ki specifično pomnožujejo fragmente bakterijske DNK.

Ključne besede: bakterijski hrušev ožig, detekcija, *Erwinia amylovora*, PCR

ABSTRACT

THE USE OF MOLECULAR BIOLOGY METHODS FOR DETECTION OF OF PHYTOPATHOGENIC BACTERIA: THE STUDY CASE OF *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.*

Fireblight, caused by bacteria *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.*, is a quarantine disease on fruit trees and ornamental plants recorded in most European countries. The fact that fireblight is present in all countries neighbouring Slovenia represents a

¹ univ. dipl. biol., SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111, e-mail: tina.demsar@uni-lj.si

² dr. biol. znan., SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

³ študent biol., prav tam

⁴ študentka mikrobiol., prav tam

⁵ tehn. sod., prav tam

⁶ prof., dr. biol. znan., SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

very high possibility of its introduction to Slovenia, which is a serious treat to Slovenian fruit growing, especially production of pears and apples. A testing procedure recommended by EPPO (European Plant Protection Organization) includes: isolation of bacteria by plating on semiselective and non-selective media, serological methods (agglutination and immunofluorescence), biochemical tests and pathogenicity test on immature pear fruits. As an addition to all these laboratory tests we have introduced a molecular biology based method (PCR), which both confirms the *Erwinia amylovora* (Ea) in a bacterial culture, and enables to distinguish Ea from other bacteria such as *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, a causal agent of a disease similar to fireblight regarding the symptoms, and from other frequently present bacteria on fruit trees. The results of PCR testing with the use of different primers, which amplify bacterial DNA is presented.

Key words: detection, *Erwinia amylovora*, Fireblight, PCR

1. UVOD

Bakterijski hrušev ožig je karantenska bolezen, ki jo povzroča zelo agresivna bakterija *Erwinia amylovora* (Ea). Bolezen, ki se je v zadnjih letih razširila po vseh sosednjih državah, je najbolj nevarna bolezen sadnega drevja in nekaterih okrasnih rastlin. Bolezenska znamenja Ea so podobna tistim, ki jih povzročajo nekateri drugi povzročitelji bolezni kot so: bakterija *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss); glive *Nectria cinnabarina*, *Nectria galligena* in *Phomopsis tanakae* (Van der Zwet in Beer, 1995), zato je za zanesljivo diagnozo potrebna izolacija bakterije na gojišče in potrditev z različnimi testi.

V sklopu sistematičnega nadzora bakterijskega hruševega ožiga v Sloveniji, ki ga vodi Sektor za varstvo rastlin na Ministrstvu za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, izvaja laboratorijske analize določanja bakterije Ea Nacionalni inštitut za biologijo. Postopek in metode laboratorijskega določanja bakterije so povzete po OEPP/EPPO Bulletin 22 (1992): 225-231 in drugih avtorjih. Vzorec za laboratorijsko preverjanje latentne okužbe z bakterijo se vzorči ob uvozu ali med rastno dobo ob rednem obveznem zdravstvenem pregledu rastlin iz uvoza in je sestavljen iz 100 poganjkov dolžine 20-30 cm. V laboratoriju iz vzorca naključno izberemo 30 poganjkov in vsakega razrežemo na 4 približno 1 cm dolge koščke. Koščke poganjkov inkubiramo v ekstrakcijskem pufu, zaporedno centrifugiramo, da dobimo bakterijski ekstrakt. Pri poganjkih z izraženimi bolezenskimi znamenji odvajamo tkivo na meji med zdravim in okuženim delom in ga inkubiramo v fosfatnem pufu. Bakterijski ekstrakt nanese na semiselektivno modificirano Miller-Schroth gojišče, na katerem Ea tvori rdečkasto-oranžne kolonije in na hranilno gojišče s sorbitolom na katerem proizvaja polisaharid levan. King B gojišče uporabljamo za ločevanje od bakterije Pss, na katerem slednja tvori fluorescentno barvilo, vidno pod UV svetlobo. Pri preglednem serološkem testu imunofluorescence uporabljamo specifična monoklonska protitelesa. Meja občutljivosti testa je 10^4 celic/ml. Ekstrakt nanese tudi na rezine nezrelh hrušk, na katerih Ea tvori značilne kapljice eksudata. Na podlagi tipične morfologije na gojiščih ali pozitivnega imunofluorescenčnega testa, sumljive bakterijske izolate testiramo s testom patogenosti na nezrelh plodovih hrušk ali s testom hipersenzitivne reakcije na listih tobaka (Schroth in Hildebrand, 1988). Bakterijo je potrebno reizolirati in potrditi z imunofluorescenčnim testom, aglutinacijo in nekaterimi biokemičnimi testi (npr. API 20E). Za detekcijo bakterijskih bolezni se uporabljajo tudi molekularne tehnike, zlasti PCR test, ki smo ga, zaradi zanesljivosti pregleda, uvedli kot potrditveni test tudi v našem laboratoriju. Za potrditev bakterije Ea z metodo PCR je potreben izbor različnih parov začetnih oligonukleotidov, ki pomnožujejo bodisi

odseke bakterijskega plazmida ali odseke kromosomskih regij DNK. V zadnjih letih se veliko uporabljajo začetni oligonukleotidi, ki pomnožujejo odseke DNK z zapisom za 16S ribosomalno RNK (Luows *et al.*, 1999; Maes *et al.*, 1996; Jeng *et al.*, 1999).

2. MATERIAL IN METODE

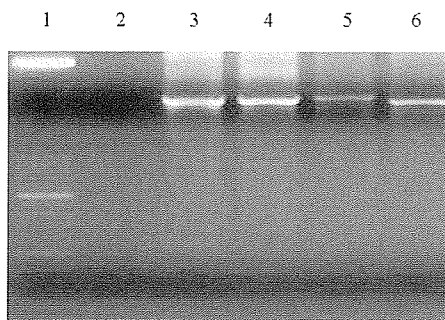
S PCR testom smo preverjali bakterijske izolate, ki so bili na gojiščih morfološko podobni bakteriji *Erwinia amylovora* (Ea), *Erwinia herbicola* (Eh) in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss). Na izolatih s sumom na Ea smo izvedli tudi imunofluorescenčni test, aglutinacijo in nekatere biokemične teste. Bakterijske izolate smo nacepili v tekoče hranilno gojišče NSBA (nutrient sorbitol broth agar). Po prekonočni inkubaciji smo odvzeli 2 ml gojišča in izolirali DNA z DNeasy Tissue kitom (Qiagen). Za kontrolo smo DNA izolirali iz več bakterij: Ea, Pss, Eh, *Agrobacterium tumefaciens* (At). Za določanje Ea smo uporabili specifične in univerzalne začetne oligonukleotide. Prvi par specifičnih začetnih oligonukleotidov (1A, 1B) pomnožuje 0,9 kb parov dolg odsek 29-kb dolgega plazmida pEA29. Plazmid je tipičen za Ea in ima vlogo pri metabolizmu tiamina in razvoju bolezenskih znamenj (Bereswill *et al.*, 1992). Drugi par specifičnih začetnih oligonukleotidov (AMSbL, AMSbR) pomnožuje 1,6 kb parov dolg odsek kromosomske *ams* regije bakterije Ea. Znotraj te regije je pomnožen celoten *ams* B gen, ki ima vlogo pri sintezi eksopolisaharidov (Bereswill *et al.*, 1995). Tretji par specifičnih začetnih oligonukleotidov (Ea71/1, Ea71/2) pomnožuje 187 bp dolg odsek kromosomske DNA bakterije Ea (Guilford *et al.*, 1996). Vsi PCR produkti so bili analizirani z agarozno gelsko elektroforezo. Za nespecifično pomnoževanje DNK bakterij Ea, Eh, Pss smo uporabili univerzalna začetna oligonukleotida (16SF, 16SR), ki pomnožujeta približno 1,5 kb parov dolg odsek gena za 16S ribosomalno RNK. PCR produkt smo analizirali z metodo RFLP (angl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*) z encimom Eco R1 (Jeng *et al.*, 1999).

3. REZULTATI IN DISKUSIJA

Izolacija bakterije na gojiščih je zelo občutljiva metoda z nekaj omejitvami: bakterijo Ea lahko prerastejo druge hitro rastoče epifitske bakterije ali pa izgubi viabilnost med vzorčenjem. Zato pri testiranju uporabljamo imunofluorescenco, s katero določimo tudi neviabilne bakterije Ea. Z izbiro specifičnih monoklonskih protiteles se izognemo navzkrižnim reakcijam z drugimi bakterijami, zlasti saprofiti. PCR testi so zelo specifični, vendar imajo nekaj pomanjkljivosti. S specifičnimi začetnimi oligonukleotidi, ki pomnožujejo odseke plazmida pEA29 (slika 3) ne moremo določiti sevov Ea, ki so brez plazmida, zato je obvezna uporaba začetnih oligonukleotidov, ki pomnožujejo odseke kromosomske DNK (slika 4). Nekatere saprofitske bakterije sadnega drevja tvorijo lažno pozitivne rezultate, ki jih lahko odpravimo z znižanjem temperature vezave začetnih oligonukleotidov ali z restrikcijo PCR produkta. Z uporabo univerzalnih začetnih oligonukleotidov, ki pomnožujejo odsek gena za 16S ribosomalno RNK različnih bakterij na sadnem drevju: Ea, Eh, Pss in At (slika 1), in restrikcijo dobimo značilen RFLP vzorec (slika 2). Encim Eco R1 reže PCR produkt bakterije Ea na tri fragmente dolge 350, 500 in 650 bp, bakterije Eh na dva fragmenta dolga 650 in 800 bp in bakterije At na dva fragmenta dolžine 600 in 800 bp. Encim ne cepi PCR produkta bakterije Pss.

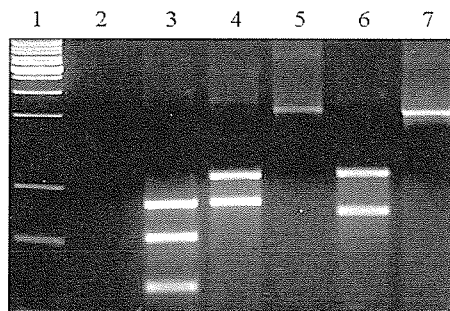
Slika 1: Agarozna gelska elektroforeza s PCR pomnoženih odsekov 16S DNK: DNK marker XIII, Boehringer Mannheim (1), negativna kontrola (2), *Erwinia amylovora* (3), *Erwinia herbicola* (4), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (5), *Agrobacterium tumefaciens* (6)

Figure 1: Agarose-gel electrophoresis of the PCR-amplified 16S rDNA fragment: DNA ladder marker XII, Boehringer Mannheim (1), negative control, *Erwinia amylovora* (3), *Erwinia herbicola* (4), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (5), *Agrobacterium tumefaciens* (6)



Slika 2: Restrikcija s PCR pomnoženih odsekov 16S DNK z encimom Eco R1: 1kb DNK marker, MBI Fermentas (1), negativna kontrola (2), *Erwinia amylovora* (3), *Erwinia herbicola* (4), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (5), *Agrobacterium tumefaciens* (6), negativna kontrola restrikcije (7)

Figure 2: Eco R1 restriction profile of the PCR-amplified 16S rDNA:), 1kb DNA marker, MBI Fermentas (1), negative control (2), *Erwinia amylovora* (3), *Erwinia herbicola* (4), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (5), *Agrobacterium tumefaciens* (6), negative restriction control (7)



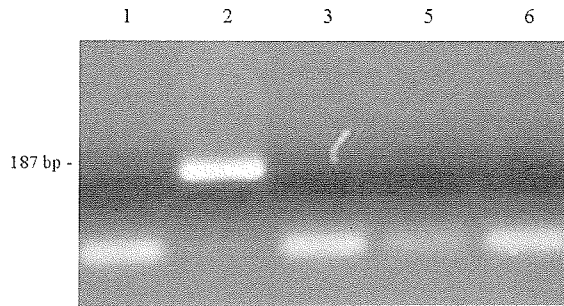
V vzorcih smo na gojiščih izolirali več bakterijskih izolatov. Prvi izolat (št. 1) je na gojiščih morfološko ustrezal Ea, serološko je bil negativen na imunofluorescenčnem testu in aglutinaciji. PCR test s parom 1A, 1B začetnih oligonukleotidov je tvoril lažno pozitiven rezultat 1 kb (slika 4), s parom Ea71/1, Ea71/2, ki pomnožuje del kromosomske DNK, je bil negativen. Drugi izolat morfološko ni ustrezal Ea na gojiščih, imunofluorescenčni test je bil negativen, aglutinacija pa pozitivna. PCR testi s pari 1A, 1B, Ea71/1, Ea72/2 so bili pozitivni. Lažno pozitiven je bil tudi PCR s parom AMSbL, AMSbR začetnih oligonukleotidov. Izolat smo poslali v laboratorij PPS, Wageningen,

NLD, kjer so s profilom maščobnih kislin določili, da gre za nepatogeno bakterijo iz družine *Enterobacteraceae* (rezultati niso prikazani).

S PCR testom s parom začetnih oligonukleotidov 16SF, 16 SR in restrikcijo z Eco R1 smo potrdili tudi izolat epifitske bakterije Eh. Nobeden od izolatov s sumom na Pss ni bil pozitiven na PCR testu s parom začetnih oligonukleotidov 16SF, 16SR.

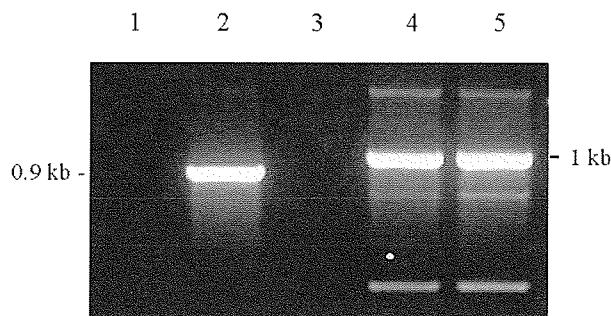
Slika 3: Agarozna gelska elektroforeza s PCR pomnoženih odsekov plazmida pEA29: negativna kontrola (1), *Erwinia amylovora* (2), *Erwinia herbicola* (3), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (5), *Agrobacterium tumefaciens* (6).

Figure 3: Agarose-gel electrophoresis of the PCR-amplified pEA29 fragment of Ea plasmid: negative control (1), *Erwinia amylovora* (2), *Erwinia herbicola* (3), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (5), *Agrobacterium tumefaciens* (6).



Slika 4: Agarozna gelska elektroforeza s PCR pomnoženih odsekov kromosomske DNK Ea: negativna kontrola (1), *Erwinia amylovora* (2), *Erwinia amylovora* podoben bakterijski izolat na gojiščih (3), bakterijski izolat št. 1 (4, 5).

Figure 4: Agarose-gel electrophoresis of the PCR-amplified chromosome DNA of Ea: negative control (1), *Erwinia amylovora* (2), bacterial isolate suspicious on media (3), bacterial isolate No. 1 (4, 5).



4. SKLEPI

Postopek laboratorijskega določanja bakterije *Erwinia amylovora* temelji na uporabi kombinacije različnih klasičnih in novejših, molekularnih metod. Za potrditev identitete izoliranih bakterijskih kultur smo uvedli molekularno metodo PCR kot dopolnilo klasičnim laboratorijskim testom (izolacija na različnih gojiščih, serološki test imunofluorescence, test patogenosti na rezinah hrušk, biokemični testi, hipersenzitiv-

na reakcija na listih tobaka). Za zanesljivo potrditev z metodo PCR je potreben izbor različnih začetnih oligonukleotidov, ki pomnožujejo ali odseke bakterijskega plazmi-
da pEA29 ali odseke kromosomskih regij DNK (ams regije) ali odseke DNK z zapisom
za 16S ribosomalno RNK. PCR test in restrikcija z encimom Eco R1 omogoča tudi raz-
likovanje od bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, povzročiteljice bolezni z
zelo podobnimi bolezenskimi znamenji kot je hrušev ožig, in od drugih pogostih bak-
terij sadnega drevja (*Erwinia herbicola*, *Agrobacterium tumefaciens*).

Zahvala

Zahvaljujemo se sodelavcem Inšpektorata Republike Slovenije za kmetijstvo, goz-
darstvo, lovstvo in ribištvo pri MKGP, sodelavcem Kmetijskega inštituta Slovenije za
nabrane vzorce.

5. VIRI

- Bereswill, S., Pahl, A., Bellemann, P., Zeller, W., Geider, K. 1992. Sensitive and Species-Specific Detection of *Erwinia amylovora* by Polymerase Chain Reaction Analysis. Applied and Environmental Microbiology, 58, 11: 3522-3526
- Bereswill, S., Bugert, P., Bruchmuller, I., Geider, K. 1995. Identification of the Fire Blight Pathogen, *Erwinia amylovora*, by PCR Assays with Chromosomal DNA. Applied and Environmental Microbiology, 61, 7: 2636-2642
- Guilford, P. J., Taylor, R. K., Clark, R. G., Hale, C.N., Forster, R. L. S. 1996. PCR-Based Techniques for the Detection of *Erwinia amylovora*. Acta Horticulturae, 411: 53-56
- Jeng, R. S., Beliaeva, L., Hubbes, M., Svircev, A. M., Myers, A. L. 1999. The use of 16S and 16S-23S rRNA internal transcribed spacers to detect and differentiate *Erwinia amylovora*. V: Proc. of the 8th Int. Workshop on Fire Blight, Momol, M. T., Saygili, H., Acta Hort. 489: 49-54
- Luows, F. J., Rademaker, J. L. W., de Bruijn, F. J. 1999. The Tree Ds of PCR-Based Genomic Analysis of Phytobacteria: Diversity, Detection, and Disease Diagnosis. Annu. Rev. Phytopathol., 37: 81-125
- Maes, M., Garbeva, P., Crepel, C. 1996. Identification and sensitive endophytic detection of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* with 23S ribosomal DNA sequences and polymerase chain reaction. Plant Pathology, 45: 1139-1149
- McManus, P. S., Jones, A. L. 1995. Detection of *Erwinia amylovora* by Nested PCR and PCR-Dot-Blot and Reverse-Blot Hybridizations. Phytopathology, 85, 5: 618-623
- Schroth, M. H., Hildebrand, D. C. 1988. *Erwinia* "Amylovora Group". V: Schaad, N. W. (urednik) Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press, St. Paul, Minnesota: 37-43
- Van der Zwet, T., Beer, S. V. 1995. Fire Blight-Its Nature, Prevention, and Control: A Practical Guide to Integrated Disease Management. Agriculture Information Bulletin, 631, United States Department of Agriculture