

DOLOČANJE RASTLINSKIH PATOGENOV Z UPORABO METOD NA OSNOVI POLIMERAZNE VERIŽNE REAKCIJE

Jelka ŠUŠTAR-VOZLIČ¹, Marta ŠABEC-PARADIŽ²,
Mojca VIRŠČEK-MARN³, Gregor UREK⁴,
Vladimir MEGLIČ⁵, Mojca ŠKOF⁶
Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana

IZVLEČEK

Za detekcijo posameznih fitopatogenih in fitofagnih organizmov ter njihovih bioloških ras, sojev ali različkov uvajamo na Kmetijskem inštitutu Slovenije različne molekularne tehnike, osnovane na polimerazni verižni reakciji (PCR). Tako smo uvedli metodiko, ki je kombinacija tehnik immunocapture in RT-PCR, s katero lahko hitro in zanesljivo določimo zastopanost PVY^{NTN} različka krompirjevega virusa Y. IC-PCR metodo vpeljujemo tudi za razlikovanje dveh virulentnih sevov češpljeve šarke (PPV), seva D in M, ki se razlikujeta tudi po svoji epidemiologiji. Z uporabo specifičnih začetnih oligonukleotidov določamo bakterijo *Agrobacterium vitis*, ki povzroča bakterijski rak koreninskega vratu na vinski trti, hkrati pa razlikujemo tudi njene biovarje. Za detekcijo krompirjevih ogorčic, *Globodera rostochiensis* in *Globodera pallida* smo uvedli multipleks PCR metodo.

Ključne besede: *Agrobacterium vitis*, *Globodera rostochiensis*, *Globodera pallida*, immunocapture, polimerazna verižna reakcija, PPV, PVY^{NTN}, RT-PCR

ABSTRACT

THE USE OF PCR-BASED METHODS FOR DETECTION OF PLANT PATHOGENS

For detection of certain phytopathogenous and phytophagous organisms, their strains, pathotypes or races different molecular methods, based on the polymerase chain reaction (PCR) are being introduced at the Agricultural Institute of Slovenia. Immunocapture RT-PCR method was applied as a quick and reliable method for detection of NTN strain of potato virus Y. IC-PCR is tested for distinguishing two virulent strains of plum pox virus (PPV), strains M and D. With the use of specific primers the causal agent of crown gall disease of grape, *Agrobacterium vitis* and its biovars can be identified. For detection of potato nematodes *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* multiplex PCR method was introduced.

Key words: *Agrobacterium vitis*, *Globodera rostochiensis*, *Globodera pallida*, immunocapture, polymerase chain reaction, PPV, PVY^{NTN}, RT-PCR

¹ dr., mag., univ. dipl. inž. agr., SI-1001 Ljubljana, Hacquetova 17

² univ. dipl. inž. agr., prav tam

³ dr., mag., univ. dipl. inž. agr., prav tam

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

⁵ dr., mag., univ. dipl. inž. agr., prav tam

⁶ univ. dipl. inž. agr., prav tam

1. UVOD

Molekularne tehnike, osnovane na polimerazni verižni reakciji (PCR), se v zadnjem času veliko uporabljajo tudi za diagnostiko rastlinskih patogenov. Prednosti teh metod pred tradicionalnimi metodami diagnostike so predvsem v njihovi hitrosti in občutljivosti detekcije. Z njimi lahko določimo tudi različke, katerih sploh ni mogoče določati z drugimi metodami, oz. je določanje s tradicionalnimi metodami (različne morfometrijske in biološke metode) ali s serološkimi metodami dolgotrajnejše in/ali manj zanesljivo.

2. KROMPIRJEV VIRUS PVY^{NTN}

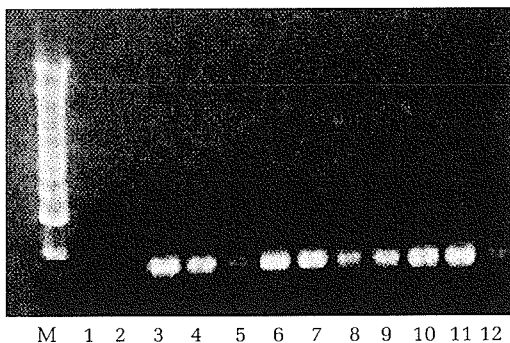
Leta 1987 se je v Sloveniji pojavil nov različek krompirjevega virusa Y (PVY), označen kot PVY^{NTN} in se je razlikoval od do tedaj znanega različka PVY^N. PVY^{NTN}, ki je od vseh različkov Y virusa najbolj virulenten, povzroča nekrotične pege na gomoljih (slika 1). Po letu 1988 je skoraj onemogočil semensko pridelavo krompirja v Sloveniji ter povzročil spremembo sortne sestave (Dolničar, 1998). Eden od najpomembnejših ciljev sedanjega programa žlahtnjenja krompirja na inštitutu je vzgoja sort, odpornih proti PVY^{NTN}.

Razlikovanje PVY^N od PVY^{NTN} ni možno z vpeljanimi serološkimi metodami. Za detekcijo virusa pri odbiri odpornih klonov v procesu žlahtnjenja ter pri pregledu uvoženega in domačega sadilnega materiala pa je potrebna zanesljiva in hitra metoda. Zato smo uvedli metodiko, ki združuje tehniki immunocapture in RT-PCR (Dedič in Ptaček, 1998). Virus izoliramo s specifičnimi protitelesi (IgG, Bioreba) na elisa ploščici ali v mikrocentrifugirki, kjer izvedemo tudi postopek reverzne transkripcije. V polimerazni verižni reakciji uporabimo specifična začetna oligonukleotida S3 in S4 (Weilguny in Singh, 1998). Najboljše rezultate dobimo, če izoliramo RNA iz svežih ali zamrznjenih listov oz. rastlinic iz tkivne kulture. Intenzivnost črt na gelu je slabša (slika 2), če kot izhodiščni material uporabimo gomolje z nekrozami, zato je potrebno postopek v tem primeru optimizirati.

Slika 1: Nekrotični obročki na gomolju krompirja, ki jih povzroča virus Y^{NTN}.



Slika 2: Elektroforetski prikaz rezultata RT-PCR reakcije 11 analiziranih vzorcev krompirja (M - lestvica, 1 - negativna kontrola, 2, 5, 12 – gomolji z nekrozami sorte 'Igor', 3, 4, 6-11 – listi pozitivnih rastlin različnih sort iz postkontrolne).

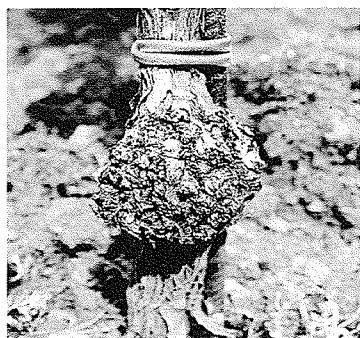


3. BAKTERIJSKI RAK KORENINSKEGA VRATU NA VINSKI TRTI (*AGROBACTERIUM VITIS*)

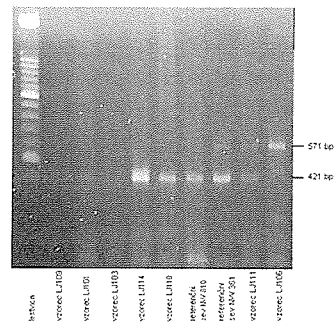
Razvoj tumorskih izrastkov (slika 3) lahko inducirajo le agrobakterije, ki imajo Ti plazmid. Del dedne informacije s Ti plazmida (T-DNA) agrobakterije se prenese v kromosom rastlinske celice. Tako spremenjena rastlinska celica tvori rastlinske rastne hormone, ki pospešujejo rast in razmnoževanje spremenjenih in okoliških celic in s tem tvorbo tumorjev. Hkrati spremenjene rastlinske celice tvorijo tudi specifične snovi, opine, ki olajšajo razmnoževanje agrobakterij v tumorjih. Različni sevi agrobakterij lahko inducirajo sintezo različnih opinov: oktopina, nopalina ali vitopina (Burr *et al.*, 1998).

Z verižno reakcijo s polimerazo lahko z uporabo specifičnih začetnih oligonukleotidov določimo zastopanost značilnih sekvenc na T-DNA (slika 4). Začetni oligonukleotid Ia omogoča namnožitev dela *acs* gena nopalinskih in oktopinskih sevov v dolžini 421 bp, začetni oligonukleotid V/Ib pa dela *vis/6b* regije vitopinskih sevov *A. vitis* v dolžini 571 bp. Z uporabo molekularne metode po protokolu, ki so ga opisali Schultz *et al.* (1993), tako lahko identificiramo izolirane bakterije kot *A. vitis* in dokažemo, da imajo Ti plazmid in del potrebnih genov za indukcijo tvorbe tumorjev ter hkrati razlikujemo oktopinske/nopalinske seve od vitopinskih. Dobljene rezultate potrjujemo s testiranjem patogenosti na testnih rastlinah in določanjem vrste opina, ki ga vsebujejo tumorski izrastki s papirno elektroforezo (Otten in Schilperoot, 1978).

Slika 3: Tipična bolezenska znamenja so tumorski izrastki, ki se najprej pojavijo okoli cepljenega mesta.



Slika 4: S PCR namnoženi značilni fragmenti dokazujejo zastopanost genov na T-DNA delu Ti plazmida izoliranih bakterij: fragment dolžine 421 bp zastopanost gena *acs* pri izoliranih oktopinskih in nopalinskih sevih, 571 bp pa zastopanost regije *vis/6b* pri vitopinskih sevih *A. vitis*)



4. ŠARKA - PPV (PLUM POX VIRUS)

V Evropi prevladujeta dva seva šarke, sev M in sev D. Sev M se z ušmi prenaša hitreje od seva D in povzroča resnejše simptome na breskvah. Sev D okužuje predvsem slive in marelice in se s teh gostiteljev redko prenaša na breskve (López-Moya *et al.*, 2000). Razlikovanje med tema dvema sevoma je pomembno zaradi razlik v njuni epidemiologiji.

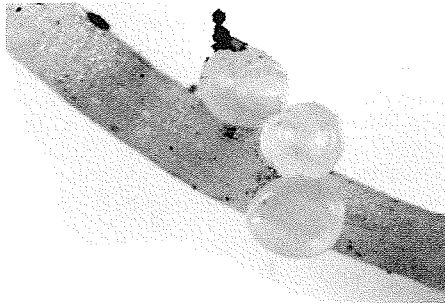
Za potrebe raziskovalnega dela in kot dopolnilno metodo za potrjevanje in preverjanje rezultatov serološkega testiranja (ELISA) uvajamo metodo IC-PCR (immunocapture PCR) po Corvo in Sousa Santos (1995). V primerjavi z ELISA testi so metode na podlagi PCR občutljivejše. Pri metodi IC-PCR v postopku ekstrakcije za vezavo virusa uporabljamo za PPV specifična protitelesa. Po reverzni transkripciji uporabljamo za namnoževanje specifičnih fragmentov začetne oligonukleotide PPV 1 in PPV 2 po Wetzel *et al.* (1991). Z restrikcijsko analizo namnoženih fragmentov z endonukleazo *Rsa I* lahko razlikujemo sev M od seva D. Pri sevu M dobimo po restrikciji 2 črti (okrog 60 bp in okrog 180 bp), pri sevu D pa ostane ena črta s 243 bp.

5. KROMPIRJEVE OGORČICE, *GLOBODERA ROSTOCHIENSIS* IN *GLOBODERA PALLIDA*

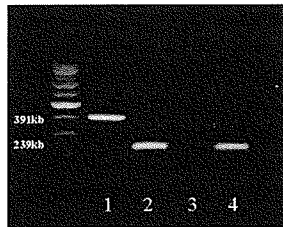
Krompirjevi ogorčici, *Globodera rostochiensis* (GRO) (slika 5) in *Globodera pallida* (GPA) sta karantenska škodljivca, ki lahko povzročita veliko škodo v krompirjevih nasadih (Urek, 1998). Režim uporabe kontaminiranih zemljišč za nadaljnjo pridelavo krompirja je odvisen od vrste krompirjeve ogorčice, ki povzroča škodo.

Poleg klasičnih morfometričnih metod je za detekcijo in diferenciacijo na voljo vrsta imunokemičnih, biokemičnih ter molekularnih metod. Večina le-teh je kompleksnih ali dolgotrajnih. Uvedli smo multipleks PCR metodo, ki je primerna za naše razmere ter je relativno hitra in natančna (Mullholland *et al.*, 1996; Zouhar *et al.*, 2000). Zadošča že DNA, ekstrahirana iz ene ciste. GRO in GPA razlikujemo s pomočjo specifičnih začetnih oligonukleotidov, ki se vežejo na regijo med ITS1 in 5.8S rRNA genom. Amplifikacija GPA da fragment dolžine 391 bp, GRO pa fragment dolžine 238 bp (slika 6).

Slika 5: Rumena krompirjeva ogorčica, ciste na korenini.



Slika 6: Determinacija s pomočjo PCR: vzorec 1 in 2 sta kontrolni GPA in GRO, vzorec 3 GPA in vzorec 4 GRO iz cist ekstrahiranih iz okuženega vzorca prsti.



6. SKLEP

Predstavljene metode na osnovi polimerazne verižne reakcije, ki smo jih uvedli oz. jih uvajamo na Kmetijskem inštitutu Slovenije, nam omogočajo hitro in zanesljivo detekcijo nekaterih rastlinskih virusov (krompirjev virus YNTN, češpljeva šarka: sev M in sev D), bakterij (*Agrobacterium vitis*) in ogorčic (*Globodera rostochiensis* in *Globodera pallida*) ter njihovih različkov ali sevov, ki jih z drugimi metodami ni mogoče ločiti, oz. je določanje z njimi dolgotrajnejše ali manj zanesljivo. Uporabljamo jih tako za raziskovalne kot za diagnostične namene.

7. VIRI

- Burr T.J., Bazzi C., Süle S., Otten L. 1998. Crown gall of grape: Biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies. *Plant disease*, 82: 1288-1297
- Corvo L.M., Sousa Santos M. 1995. Detection of plum pox virus using a simplified polymerase chain reaction. *Acta Horticulturae*, 386: 383-390
- Dedič P., Ptaček J. 1998. Possibilities to differentiate the potato virus Y (PVY) strains by means of polymerase chain reaction (RT-PCR). *Rostlinna Vyroba*, 44, 12: 545-551
- Dolničar P. 1998. Methods of assessment of susceptibility to PVY in Slovenia. V: Peter K. (Ur.) *Breeding research on potatoes : proceedings*. Quedlinburg, June 23-26, 1998. Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, Quedlinburg, 39-40
- López-Moya J.J., Fernández-Fernández M.R., Cambra M., García J.A. 2000. Biotechnological aspects of plum pox virus. *Journal of Biotechnology*, 76:121-136
- Mullholland V., Carde L., O'Donnell K.J., Fleming C.C., Powers T.O. 1996. Use of the polymerase chain reaction to discriminate potato cyst nematode at the species level. *Proc. BCPC Symposium No. 65: Diagnosis in crop production*: 247-252
- Otten L., Schilperoot R.A. 1978. A rapid microscale method for the detection of lysopine and nopaline dehydrogenase activities. *Biochimica Biophysica Acta*, 527: 497-500

- Schultz T.F., Lorenz D., Eichhorn K.W., Otten L. 1993. Amplification of different marker sequences for identification of *A. vitis* strains. *Vitis*, 22: 179-182
- Urek, G. in A. Hržič. 1998. Ogorčice - nevidni zajedavci rastlin : fitonematologija. Ljubljana: samozal. G. Urek, 240 str., ilustr.
- Weilguny H., Singh R.P. 1998. Separation of Slovenian isolates of PVYNTN from the North American isolates of PVYN by a 3-primer PCR. *Journal of Virological Methods*, 71: 57-68
- Wetzel T., Candresse T., Ravelonandro M., Dunez J. 1991. A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox virus detection. *Journal of Virological Methods*, 33: 355-365
- Zouhar M., Rysanek P., Kočova M. 2000. Detection and differentiation of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* by PCR. *Plant Protect. Sci.*, 36: 81-84