

UPORABA MOLEKULARNIH METOD ZA DOLOČANJE BAKTERIJE POVZROČITELJICE OBROČKASTE GNILOBE KROMPIRJA

Tina DEMŠAR¹, Nataša TOPLAK², Kristina GRUDEN³, Maja RAVNIKAR⁴

^{1,2,3,4}Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo,

Ljubljana

² trenutni naslov: Omega d.o.o.

IZVLEČEK

Obročkasto gnilobo krompirja povzroča bakterija *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis *et al.* ssp. *sepedonicus* (Spieckermamm et Kotthoff) Davis *et al.* Bakterija je v Sloveniji uvrščena na seznam I.A.II. škodljivih organizmov. Diagnostika bakterije v našem laboratoriju poteka v okviru posebnega nadzora, ki ga vrši uradna služba za varstvo rastlin. V Sloveniji bakterije še nismo našli, prvič pa smo bakterijo identificirali v pošiljkah jedilnega krompirja iz uvoza leta 2001. Postopek laboratorijskega testiranja, ki ga predpisuje direktiva EU (93/85/ECC), temelji na presevnem serološkem imunofluorescenčnem ali ELISA testu. Če je serološki test krompirjevega ekstrakta pozitiven, je potrebna inokulacija testnih rastlin jajčevcev *Solanum melongena* cv. Black Beauty. Bakterijo iz inokuliranih testnih rastlin izoliramo na gojišča in potrdimo z ustreznimi biokemijskimi testi in molekularnimi metodami. V našem laboratoriju smo za določanje obročkaste gnilobe krompirja uvedli naslednje molekularne metode: PCR, PCR v realnem času (Real Time PCR) in metodo FISH (fluorescent *in situ* hybridization), ki omogočajo določanje te bakterije v ekstraktih krompirja in potrditev izolirane bakterijske kulture.

Ključne besede: *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, FISH, krompir, molekularne metode, PCR

ABSTRACT

THE USE OF MOLECULAR BIOLOGY METHODS FOR DETECTION OF POTATO RING ROT DISEASE

Clavibacter michiganensis (Smith) Davis *et al.* ssp. *sepedonicus* (Spieckermamm et Kotthoff) Davis *et al.* is the causal agent of bacterial ring rot disease of potato. Bacteria is listed on I.A.II. List of harmful organisms in Slovenia. Diagnostic of bacteria in our laboratory is conducted as survey in the frame of official plant protection service. It was not yet found in Slovenia, but we had identified bacterium in imported ware potato for the first time in year 2001. A testing procedure according to EU directive (93/85/ECC) is based on screening serological immunofluorescence or ELISA test. If serological test on potato extract is positive, inoculation of test plants *Solanum melongena* cv. Black Beauty is performed. From inoculated test plants bacteria is then isolated on medium and confirmed with different biochemical tests and molecular methods. In our laboratory different molecular methods for detection of ring rot disease in potato extracts and confirmation of bacterial isolates are used: PCR, Real Time PCR and FISH (fluorescent *in situ* hybridization).

Key words: *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, FISH, molecular methods, PCR, potato

¹ univ. dipl. biol., Večna pot 111, SI-1001 Ljubljana

² univ. dipl. biol., Dolinškova 8, SI-1000 Ljubljana

³ dr. biol. znan., Večna pot 111, SI-1001 Ljubljana

⁴ prof., dr. biol. znan., Večna pot 111, SI-1001 Ljubljana

1 UVOD

Bolezen obročkasto gnilobo krompirja povzroča bakterija *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms), ki jo v Sloveniji uvrščamo na seznam I.A.II. škodljivih organizmov. Krompir *Solanum tuberosum* je edini naravni gostitelj te bakterije.

Bolezenska znamenja na rastlinah krompirja so zelo variabilna in se izrazijo šele proti koncu rastne dobe, zato jih lahko spregledamo ali zamenjamo z bolezenskimi znamenji nekaterih drugih patogenih mikroorganizmov (*Phytophthora infestans*, *Verticillium albo-atrum*, *Thanatephorus cucumeris*). Prve spremembe opazimo na posameznih spodnjih listih rastlin krompirja, ki postajajo klorotični, njihovi robovi se vihajo navzgor. Okužene rastline so v primerjavi z zdravimi pritlikave. Včasih opazimo tudi šibko venenje in sušenje rastlin. Gomolji se okužijo prek stolona. V začetku razvoja bolezn bakterija povzroča spremembe v barvi žilnega obroča, ki postane steklast do kremasto rumen, če gomolj v višini popka prečno prerežemo. Z razvojem bolezn se površina obolelega tkiva veča. Tkivo postane mehko, kašasto in temnejše. Zaradi gnitja nastajajo votline in gomolj propade. Največkrat pa je bolezen zastopana v obliki latentnih okužb.

V našem laboratoriju že od leta 1998 v okviru posebnega nadzora, ki ga izvaja Uprava RS za varstvo rastlin in semenarstvo skupaj z fitosanitarno inšpekcijo, opravljamo analize vzorcev krompirja na latentno okuženost s to bakterijo. V Sloveniji bakterije še nismo našli, prvič smo jo potrdili v pošiljki jedilnega krompirja iz uvoza leta 2001. Istega leta smo bakterijo potrdili še v dveh vzorcih jedilnega krompirja iz uvoza, leta 2002 pa v enem vzorcu jedilnega krompirja iz uvoza. Postopek laboratorijskega testiranja predpisuje direktiva EU (93/85/ECC) in zajema klasične teste: serološki imunofluorescenčni test, test patogenosti na testnih rastlinah, barvanje po Gramu in številne potrditvene biokemijske teste. Kot presevni test uporabljamo serološki test indirektno imunofluorescence z monoklonskimi protitelesi z mejo občutljivosti 10^3 do 10^4 celic/ml. Za vse vzorce, ki so pozitivni na imunofluorescenčnem testu, uporabimo obogatitveni test na testnih rastlinah. Uporabljamo testne rastline jajčevcev *Solanum melongena* cv. Black Beauty. Z vzorcem inokuliramo 25 rastlin, ki so v fazi razvoja drugega do tretjega pravega lista. Pri testu uporabljamo še negativno kontrolo (pufer) in pozitivno kontrolo (suspencijo bakterije v pufru). Rastline inkubiramo 40 dni pri temperaturi 21⁰-24⁰C. V primeru okuženosti z bakterijo se na listih razvijejo tipična bolezenska znamenja v obliki kloroz in nekroz tkiva med listnimi žilami. Bakterijo iz testnih rastlin izoliramo na semiselektivna (De la Cruz *et al.*, 1990 in Jansig *et al.*, 1998) ali splošna gojišča. Izolirano bakterijsko kulturo potrdimo z imunofluorescenčnim testom. Patogenost izolata preverimo s ponovno inokulacijo na testne rastline, kjer se bolezenska znamenja razvijejo 12. do 14. dan po inokulaciji. Bakterijski izolat potrdimo z naslednjimi biokemijskimi testi, ki trajajo do 20 dni: test oksidativne in fermentativne razgradnje glukoze, oksidaza, katalaza, redukcija nitrata, prisotnost ureaze, produkcija H₂S, indol test, citrat test, razgradnja škroba, rast pri 37⁰C, rast pri 7% NaCl, razgradnja želatine, razgradnja eskulina, produkcija kislin iz glicerola, laktoze, ramnoze in salicina. Testiranje pozitivnih vzorcev je zelo dolgotrajno, saj od pozitivnega imunofluorescenčnega testa do izolacije in potrditve bakterije poteče vsaj 10 tednov.

V shemo testiranja smo vključili različne molekularne metode: FISH (angl. *Fluorescent In Situ Hybridization*), verižno reakcijo s polimerazo (PCR) in PCR v realnem času (Real Time PCR), ki jih uporabljamo za preverjanje vzorcev, ki so pozitivni na imunofluorescenčnem testu in za potrjevanje bakterijskih kultur.

2 MATERIAL IN METODE

FISH je postopek hibridizacije v katerem se na 16S rRNA fiksnih bakterijskih celic veže sonda, ki je označena s fluorescentnim barvilom. Uporabljamo dve označeni sondi: nespecifično, ki se veže na vsako fiksirano bakterijsko celico in specifično sondo, ki se veže le na bakterije *Cms*. Nespecifična sonda je označena s fluorescein (FITC) barvilom, specifična pa s Cy3 indokarbocianin barvilom. Postopek priprave preparatov traja 3 dni in zajema naslednje korake: fiksacija vzorcev v paraformaldehidu, prehibridizacija, hibridizacija, posthibridizacijsko spiranje in pregled preparatov pod mikroskopom za epifluorescenčno mikroskopijo. Z menjavo filtrov za obe barvili v preparatu iščemo bakterije *Cms*. Občutljivost metode smo preverili z lestvico suspenzij bakterije *Cms* v pufru in krompirjevem ekstraktu in sicer od 10^9 celic/ml do 10^1 celic/ml.

Z metodo PCR smo preverjali različne začetne oligonukleotide. Prvi par začetnih oligonukleotidov (*Cms6*, *Cms7*) pomnožuje 258 bp dolg odsek plazmida pCS1 (Schneider *et al.*, 1993), drugi par začetnih oligonukleotidov (*Cms50-2F*, *Cms133R*) pomnožuje 160 bp dolg odsek genomskega fragmenta *Cms50* (Mills *et al.*, 1997), tretji par začetnih oligonukleotidov (*PSA-1*, *PSA-R*) pomnožuje 502 bp dolg odsek regije med 16S in 23S rRNA (Patrik, 2000). V PCR reakciji poleg specifičnih začetnih oligonukleotidov *PSA-1*, *PSA-R* uporabljamo tudi začetne oligonukleotide interne kontrole, ki pomnožujejo 377 bp dolg odsek pri krompirju, paradižniku in jajčevcu. Občutljivost metode smo preverili z lestvico suspenzij bakterije *Cms* v pufru in krompirjevem ekstraktu in sicer od 10^9 celic/ml do 10^1 celic/ml. Primerjali smo tudi dva načina ekstrakcije DNK in sicer ekstrakcijo DNK s kuhanjem v NaOH in izolacijo DNK z DNK kitom (Invitrogen).

PCR v realnem času oziroma TaqMan® kemija je nadgradnja klasičnega PCR pri katerem uporabljamo sondo, ki se veže na odsek DNA med začetnima oligonukleotidima. Sonda je na 5' koncu označena z reporterskim fluorescentnim barvilom. Ko se sonda veže na tarčno zaporedje, jo polimeraza, zaradi eksonukleazne aktivnosti, razgradi in reportersko barvilo, v raztopini po vznurjenju z virom svetlobe, odda fotone, ki jih detektiramo s fluorimetrom oziroma CCD kamero. Izmerjena fluorescenca je čim višja, čim več je tarčne DNK v vzorcu. Rezultati so podani v vrednostih Ct, to je točka v kateri je izmerjen fluorescentni signal vzorca višji od fluorescentnega signala ozadja, torej je točka Ct čim nižja, več kot je tarčne DNA v vzorcu. Z uporabo standardne krivulje (suspenzije bakterije *Cms* od 10^9 – 10^3 celic/ml) lahko natančno kvantificiramo količino DNK v vzorcu. TaqMan kemijo smo izvedli s parom *Cms50-2F* in *Cms133R* začetnih oligonukleotidov in sondo *Cms50-53T* (Schaad, 1999). Občutljivost metode smo preverili z lestvico suspenzij bakterije *Cms* v pufru in krompirjevem ekstraktu in sicer od 10^9 celic/ml do 10^1 celic/ml. Primerjali smo tudi dva načina ekstrakcije DNK in sicer ekstrakcijo DNK s kuhanjem v NaOH in izolacijo DNK z DNK kitom (Invitrogen).

Molekularne metode smo uporabili za preverjanje štirih pozitivnih vzorcev (vzorci št. 1, 2, 3, 4) in za preverjanje vzorcev, ki so bili pozitivni na imunofluorescenčnem testu.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Metoda FISH je bolj specifična od imunofluorescenčnega testa, vendar je občutljivost metode slabša, 10^5 celic/ml. Bakterijo *Cms* smo potrdili v treh (vzorci št. 1, 2 in 3) od štirih pozitivnih vzorcev. V primeru nizke koncentracije bakterij *Cms* v vzorcu, jih, zaradi nizke občutljivosti metode, ne moremo dokazati. Vzorca, ki so bili na imunofluorescenčnem testu pozitivni, bakterije *Cms* pa v vzorcih ni bilo, so bili vsi s FISH metodo negativni. Metoda je tako uporabna predvsem za potrjevanje bakterijskih kultur.

S prvim parom začetnih oligonukleotidov (*Cms6*, *Cms7*) smo določili občutljivost le 10^6 celic/ml. Zaradi nizke občutljivosti testa in ker obstajajo sevi bakterije *Cms* brez plazmida, teh začetnih oligonukleotidov ne uporabljamo. Drugi par začetnih oligonukleotidov (*Cms50-2F*, *Cms133R*) ima zelo dobro občutljivost 10^4 celic/ml, vendar smo v ekstraktih krompirja opazili nespecifično pomnoževanje. S primerjavo dveh načinov ekstrakcije DNA smo ugotovili, da je metoda bolj občutljiva, če DNA izoliramo z DNA kitom. Pozitiven vzorec (vzorec št. 4), ki je bil negativen s FISH metodo, je bil pozitiven le s temi začetnimi oligonukleotidi, če je bila njegova DNA izolirana z DNA kitom. S tretjim parom začetnih oligonukleotidov (*PSA-1*, *PSA-R*) smo določili nekoliko slabšo občutljivost 10^5 celic/ml, vendar so začetni oligonukleotidi zelo specifični, poleg tega pa pri PCR testu uporabljamo še interno kontrolo, s katero lahko sklepamo o inhibiciji PCR reakcije in s tem na lažno

negativne rezultate. Bakterijo Cms smo, s tem parom začetnih oligonukleotidov, potrdili v treh (vzorci št. 1, 2 in 3) od štirih pozitivnih vzorcev.

Pri TaqMan kemiji smo z izbranimi začetnimi oligonukleotidi in sondo določili občutljivost med 10^4 do 10^5 celic/ml. Ugotovili smo, da pri izolaciji DNA z DNA kitom dobimo nižje Ct vrednosti, kot če DNK iz vzorca ekstrahiramo le s kuhanjem v NaOH (rezultati so prikazani v Preglednici 1 in 2). Tudi vzorec št. 4 je bil s to metodo pozitiven, če smo njegovo DNA izolirali z DNA kitom.

Preglednica 1: TaqMan kemija: Ct vrednosti in rezultati vzorcev, katerih DNK je ekstrahirana s kuhanjem v NaOH

Table 1: TaqMan Chemistry: Ct values and results for positive samples which DNK is extracted with boiling in NaOH

Vzorec	Ct vrednosti	Rezultat
1	29,03 / 28,90	poz
2	29,73 / 29,77	poz
3	27,59 / 27,39	poz
4	40,00 / 40,00	neg

Preglednica 2: TaqMan kemija: Ct vrednosti in rezultati vzorcev, katerih DNK je izolirana z DNK kitom

Table 2: TaqMan Chemistry: Ct values and results for positive samples which DNK is isolated with DNK kit

Vzorec	Ct vrednosti	Rezultat
1	22,44 / 22,28	poz
2	27,56 / 27,46	poz
3	20,78 / 20,32	poz
4	40,00 / 39,00	poz

4 SKLEPI

Postopek laboratorijskega testiranja bakterije Cms v latentno okuženih vzorcih krompirja, ki ga predpisuje direktiva EU (93/85/ECC), zajema klasične teste: serološki imunofluorescenčni test, test patogenosti na testnih rastlinah, barvanje po Gramu in številne potrditvene biokemijske teste. V shemo testiranja smo vključili različne molekularne metode: FISH (angl. *Fluorescent In Situ Hybridization*), verižno reakcijo s polimerazo (PCR) in PCR v realnem času (Real Time PCR), ki jih uporabljamo za preverjanje vzorcev, ki so pozitivni na imunofluorescenčnem testu in za potrjevanje bakterijskih kultur. Molekularne metode so specifične, vendar zaenkrat še premalo občutljive, da bi lahko nadomestile presevni imunofluorescenčni test, so pa neprecenljive pri potrjevanju bakterijskih kultur in kot dodatni testi na krompirjevih ekstraktih. Za uspešno določanje bakterije Cms je potrebno uporabljati sklop različnih metod, klasičnih in molekularnih.

5 ZAHVALA

Zahvaljujemo se Upravi RS za varstvo rastlin in semenarstvo MKGP, fitosanitarnim inšpektorjem Inšpektorata RS za kmetijstvo, gozdarstvo, lovstvo in ribištvo, Ministrstvu za šolstvo znanost in šport in dr. Jaap Janse iz bakteriološkega laboratorija Plant Protection Service, Wageningen, Nizozemska.

6 LITERATURA

- De la Cruz, A. R., Wiese, M. V. Schaad, N. W. 1990. A semiselective medium for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* from potato tissues. *Plant Disease*, 76: 830-834.
- Jansig, H., Rudolph, K. 1998. Physiological capabilities of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* and development of semi-selective medium. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 105, 6: 590-601.
- Mills D., Russell, B. W., Hanus, J. W. 1997. Specific Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by Amplification of Three Unique DNA Sequences Isolated by Subtraction Hybridization. *Phytopathology*, 87, 8: 853-861.

- Pastrik, K. H. 2000. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. *European Journal of Plant Pathology*, 106: 155-165.
- Schaad, N. W. 1999. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in Potato Tubers by BIO-PCR and an Automated Real-Time Fluorescence Detection system. *Plant disease*, 83, 12: 1095-1100.
- Schneider, B. J., Zhao, J., Orser, C. S. 1993. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by DNA amplification. *FEMS Microbiology Letters*, 109: 207-212.