

RAZŠIRJENOST VRST RODU *Globodera* IN POSTOPKI ZA NJIHOVO IDENTIFIKACIJO V SLOVENIJI

Saša ŠIRCA¹, Gregor UREK²

Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana

IZVLEČEK

Prve najdbe ogorčic iz rodu *Globodera* v Sloveniji segajo v leto 1970. Od takrat smo naleteli na tri vrste iz tega rodu, in sicer: rumeno krompirjevo ogorčico *G. rostochiensis* pri rednem zdravstvenem pregledu njiv v letih 1971, 1975, 1999 in 2001 ter leta 2002 pri uvoznih pošiljkah krompirja iz Hrvaške; belo krompirjevo ogorčico *G. pallida* leta 2001 in 2002 pri uvozu krompirja iz Italije; rmanova ogorčica *G. achilleae* pa je pogostejša, večkrat najdena vrsta v različnih območjih Slovenije. Zaradi pomembnosti krompirjevih ogorčic je nujna pravilna diagnostika in identifikacija vrst znotraj tega rodu. Osnova za identifikacijo so morfološki parametri, ki so podlaga v ključih za identifikacijo *Globodera* vrst. V novejšem času se za namene potrjevanja morfometrijskih metod razvijajo modernejše molekularne in biokemijske metode, katere smo vpeljali na Kmetijskem inštitutu. Z molekularno metodo PCR-RFLP uspešno ločujemo med omenjenimi vrstami. S pomočjo PCR reakcije se pomnoži fragment rDNA, razreže z petimi različnimi restrikcijskimi encimi ter analizira število in dolžine restrikcijskih fragmentov (RFLP) po ločitvi na agaroznem gelu. Za ločevanje omenjenih vrst smo vpeljali tudi biokemijsko metodo proteinske elektroforeze IEF (izoelektrično fokusiranje), kjer s pomočjo poliakrilamidne gelske elektroforeze ločimo med celičnimi proteini na podlagi izoelektrične točke PI.

Ključne besede: *Globodera*, identifikacija, IEF, PCR, razširjenost krompirjevih ogorčic

ABSTRACT

GEOGRAPHICAL DISTRIBUTION OF *Globodera* SPECIES AND METHODS USED FOR THEIR IDENTIFICATION IN SLOVENIA

The first findings of *Globodera* species in Slovenia date back to 1970. Three *Globodera* species have been found in Slovenia since then: yellow potato cyst nematode *G. rostochiensis*, in frame of the annual sanitary field inspection in 1970, 1975, 1999 and 2001, which was also intercepted in soil samples taken from the imported potatoes from Croatia in 2002; white potato cyst nematode *G. pallida* was intercepted in the imported potatoes from Italy in 2001 and 2002; yarrow cyst nematode *G. achilleae* is more frequent, often found species in different areas of Slovenia. Due to the importance of potato cyst nematodes a correct diagnostic and identification of *Globodera* species is required. *Globodera* species identification is based on specific morphological characteristics which are included in the majority of keys used for *Globodera* identification. To verify the morphometrical method, other methods have been developed. At Agricultural Institute of Slovenia molecular and biochemical methods are applied. With the use of PCR-RFLP method we try to distinguish between all three species mentioned. Patterns of nematode rDNA digested with restriction endonucleases and subjected to agarose gel electrophoresis are analysed. Differences in DNA sequence result in the number and size of fragments produced (RFLPs). For the differentiation of all three nematodes we have introduced a method for protein electrophoresis IEF (isoelectric focusing). The isoelectric point PI is determined after the separation by polyacrilamide slab gel electrophoresis.

Key words: *Globodera*, identification, PCR, IEF, geographical distribution of PCN

1 UVOD

V Sloveniji smo že večkrat naleteli na okrogle cistotvorne ogorčice iz rodu *Globodera*, kamor uvrščamo tudi rumeno krompirjevo ogorčico *Globodera rostochiensis* in belo

¹ univ. dipl. inž. agr., Hacquetova 17, SI-1000 Ljubljana

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

krompirjevo ogorčico *Globodera pallida*. Krompirjeve ogorčice spadajo med najpomembnejše škodljivce krompirja. Z ogorčicami močno napaden krompir raste počasneje in začne v začetku junija kazati znamenja napada podobna fiziološkim motnjam: izrazita zaknelost, majhni listi, rumeni vršički, ki kasneje porjavijo in se zvijejo. V drugi polovici junija se na koreninah pojavijo bradavičasti izrastki (ciste), ki imajo velikost bucikine glavice in proti koncu junija odpadejo. Škodo, ki jo povzročajo krompirjeve ogorčice, ocenjujejo na 10 do 30 odstotno zmanjšanje pridelka. Učinkoviti ukrepi za obvladovanje napada so uporaba ustreznih nematicidov in parjenje zemlje, vendar je na večjih površinah vprašljiva izvedba in ekonomičnost. Zaradi opisanega je najučinkovitejši način obvladovanja okužbe ustrezen nadzor nad zastopanostjo ogorčic pri proizvodnji semenskega materiala, proizvodnji krompirja in uvozu gomoljev krompirja ter uvedba primerne kolobarja.

G. rostochiensis je bila v Sloveniji najdena pri sistematičnih zdravstvenih pregledih zemljišč za semensko pridelavo krompirja v letih 1971, 1975 v Viču oz. Dobravi in 1999 v Libeličah na Koroškem (Urek in Lapajne, 2001) ter 2001 v Šenčurju pri Kranju, v letu 2002 je bila pogosto prestrežena pri uvoznih pošiljkah krompirja iz Hrvaške. *G. pallida* je bila prestrežena pri uvoznih pošiljkah krompirja iz Italije v letih 2001 in 2002. Poleg obeh krompirjevih ogorčic je bila v Sloveniji pogosto najdena tudi neparazitska vrsta rmanove okrogle ogorčice *G. achilleae*, ki je splošno razširjena na Gorenjskem, Dolenjskem, Štajerskem in Koroškem. V rod *Globodera* uvrščamo še številne druge vrste, ki pa v Sloveniji niso zastopane.

Za namene diagnostike, primernega ukrepanja in zaradi zastopanosti neškodljivih vrst (*G. achilleae* in pri uvozu tudi druge vrste) je nujna pravilna identifikacija vrst. Na Kmetijskem inštitutu Slovenije imamo uvedene tri metode identifikacije *Globodera* vrst. Kot osnovno uporabljamo morfometrijsko metodo, za namene potrjevanja identifikacije pa uporabljamo molekularno in biokemijsko metodo.

2 MATERIAL IN METODE

Ciste krompirjevih ogorčic smo izločili iz talnih vzorcev in jih uporabili za laboratorijsko gojenje na rastlinah krompirja. Razmnožene ogorčice smo uporabili za optimizacijo molekularne in biokemijske metode identifikacije. V laboratoriju smo razmnožili populacijo *G. rostochiensis* iz Libelič na Koroškem in populacijo *G. pallida*, ki je bila prestrežena pri uvozu gomoljev krompirja iz Italije. Ciste rmanove ogorčice smo izločili iz talnih vzorcev pobranih v Naklem na Gorenjskem in Trbonjah na Koroškem.

2.1 Metoda 1: morfometrijska identifikacija

Identifikacija vrst rodu *Globodera* na podlagi morfoloških parametrov je relativno hitra in zanesljiva. Izmere in vrednotenje parametrov poteka z mikroskopom, ki je preko digitalne kamere povezan z računalnikom. S pomočjo programske opreme »Lucia image analyser« pri določeni povečavi analiziramo digitalno sliko. Izmere in oblike določenih morfoloških značilnosti nam služijo za identifikacijo vrste. Pri identifikaciji cist je potreben natančen prerez ciste, ker ji analiziramo genitalne organe. Izmerimo Granekovo razmerje (razmerje med premerom fenestralnega dela in dolžino med fenestro in anusom) ter preštejemo kutikularne grebene v predelu med fenestro in anusom. Pri ličinki izmerimo dolžino bodala, razdaljo med vrhom glave in požiralniško žlezo ter dolžino repa. Vrsto značilne so tudi oblike grč bodala.

2.2 Metoda 2: molekularna identifikacija

Na Kmetijskem inštitutu Slovenije smo uvedli molekularno metodo verižne reakcije s polimerazo in polimorfizmi dolžin restrikcijskih fragmentov (PCR-RFLP), kjer z restrikcijskimi encimi analiziramo pomnoženo ITS regijo na ribosomski DNA (rDNA). Celokupno DNA izoliramo iz ene vitalne ciste s »Promega Wizard purification« kitom. 1 μ l izolirane DNA dodamo v PCR reakcijsko mešanico ki

vsebuje 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 25 mM MgCl₂ (Promega), dNTP-mešanico 10 mM vsakega, 1 μM Ferris forward in reverse začetnih oligonukleotidov (Ferris *et al.*, 1995), 1U Taq polimeraze (Promega) in sterilno vodo do volumna 25 μl. Omenjeni začetni oligonukleotidi omogočajo pomnoževanje približno 1Kb dela rDNA, ki vsebuje del 28S gena, ITS1 regijo, 18S gen, ITS2 regijo ter del gena 5,8S (Williamson, 1991). PCR poteka v A&B gene AMP PCR system 2700 pri naslednjih pogojih: začetna denaturacija pri 94°C 2,5 min, 35 ciklov / denaturacija pri 94°C 1 min, prileganje pri 56°C 45s, polimerizacija pri 72°C 1 min in podaljševanje pri 72°C 2 min. 4 μl PCR produkta razrežemo s petimi restrikcijskimi encim: Alu1, Rsa1, Msp1, Hinf1 in Mbo1. Reakcijsko mešanico inkubiramo pri 37°C preko noči, da je restrikcija PCR produktov popolna. Restriksijske fragmente analiziramo na 2% agaroznem gelu, označene z etidijevim bromidom s pomočjo UV lučke.

2.3 Metoda 3: IEF

IEF – izoelektrično fokusiranje je 1D elektroforeza in poteka z avtomatiziranim sistemom "PhastSystem" (Amersham Biosciences) na tankih 0,4 mm poliakrilamidnih gelih s pH gradientom 3 – 9 ali 5 – 8 in je ustrezna za identifikacijo vrst v rodu *Globodera* (Karszen *et al.*, 1995). Električni naboj proteina predstavlja seštevek nabojev aminokislin. Aminokislinsko sestavo določajo geni zato je tudi mobilnost proteinov je gensko določena. Proteini v električnem polju potujejo dokler ne dosežejo izoelektrične točke (*pI*), ko je seštevek njihovih nabojev enak 0. Pred začetkom elektroforeze je potrebno ciste 12 ur namakati v 1% glicerolu. Posamezno cisto prestavimo v 0,7 μl 1% glicerol in zdrobimo z stekleno paličico. Na gel naneseemo 0,3 μl vsakega vzorca in spustimo električni tok. Po končani elektroforezi proteine detektiramo z barvanjem gela s srebrom nitratom.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

3.1 Morfometrijska identifikacija

Preglednica 1: Izmere in oblike določenih morfometrijskih parametrov pri različnih vrstah rodu *Globodera* v Sloveniji.

Vrsta	Oblika grč bodala ličink (μm)	Dolžina bodala ličink (μm)	Št. kutikularnih grebenov	Premer fenestre (μm)	Razdalja med fenestro in anusom (μm)	Granek. razmerje
<i>G. rostochiensis</i>	Okrogla	21-23 (22)	21-31(>14)	18-20 (<19)	37-77 (>55)	>3
<i>G. pallida</i>	S konico	21-26 (23)	18-20(<14)	18-21 (>19)	22-67 (<50)	<3
<i>G. achilleae</i>	Okrogla	24-25,5 (25)	4-5	12-18 (16)	22-34 (27)	1,6

3.2 Molekularna identifikacija

Analiza RFLP: med *G. rostochiensis* in *G. pallida* ločijo 4 encimi (Alu I, Rsa I, Hinf I, in Mbo I), med *G. rostochiensis* in *G. achilleae* ločijo 3 encimi (Alu I, Rsa I in Hinf I), med *G. pallida* in *G. achilleae* ločijo 4 encimi (Alu I, Rsa I, Hinf I in Mbo I).

3.3 IEF

Izoelektrično točko proteina določimo s proteini označevalci (Pharmacia broad pI calibration kit 3.5 – 9,3). Na gelu s pH gradientom 3 – 9 ima *G. rostochiensis* izrazito liso pri pI 5,9 in šibkejšo pri pI 8,7. *G. pallida* ima izrazito liso pri pI 5,7 in šibkejšo pri pI 6,9. Za vidnejše razlike uporabimo gel z ožjim pH gradientom 5 – 8.

4 SKLEPI

Molekularne in biokemijske tehnike omogočajo relativno hitro in zanesljivo identifikacijo. Pri obeh metodah pa je pomembno, da imamo na voljo sveže in polne ciste, ki včasih niso na voljo. V takih primerih se zanašamo na morfometrijsko metodo identifikacije, ki je še danes zaradi nižjih stroškov, zanesljivosti in hitre izvedbe osnovno orodje za identifikacijo omenjenih vrst. Molekularne in biokemijske metode ustrezajo za potrjevanje in so zagotovilo za natančno identifikacijo vrst iz rodu *Globodera*.

5 LITERATURA

- Ferris, V. R., Ferris, J. M., Miller, L. I., Faghihi, J. 1995. Ribosomal DNA Comparisons of *Globodera* from Two Continents. *Journal of Nematology*, 27 (3): 273 – 283.
- Karssen, G., van Hoeselaar, T., Vererk-Bakker, B., Janssen, R. 1995. Species identification of cyst and root-knot nematodes from potato by electrophoresis of individual females. *Electrophoresis*, 16: 105 - 109.
- Williamson, V. M. 1991. *Molecular Technique for Nematode Species Identification*. V: Nickle, W. R. (ur). *Manual of Agricultural Nematology*. Marcel Decker. Inc., New York.
- Urek, G., Lapajne, S. 2001. The incidence of nematode, *Globodera rostochiensis* (Woll., 1923) Behrens, in Slovenia. *Zb. Bioteh. Fak. Ljublj. Kmet.*, 77: 49 – 58.