

RAZVOJ DIAGNOSTIČNE METODE ZA DOLOČANJE FITOPLAZME ASTER YELLOW S NA VINSKI TRTI S PCR V REALNEM ČASU

Petra NIKOLIĆ¹, Jana BOBEN², Matjaž HREN³, Maja RAVNIKAR⁴, Marina
DERMASTIA⁵

Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Ljubljana

IZVLEČEK

Fitoplazme so patogene bakterije brez celične stene, iz zelo raznolike skupine *Mollicutes*. So med najmanjšimi znanimi organizmi in so obligatni paraziti z dvogostiteljskim življenjskim ciklom, ki vključuje žuželke in rastline. Med slednjimi so številne kmetijsko pomembne. Do sedaj so bili vsi poskusi gojenja fitoplazem v bakterijskih kulturah neuspešni. Njihova zanesljiva detekcija je možna le z molekulskimi metodami. Na Nacionalnem inštitutu za biologijo izvajamo diagnostiko fitoplazem iz skupin 16SrXII, 16SrX in 16SrV, tako na sadnem drevju in vinski trti, kot tudi na negojenih rastlinah, ki so možen rezervoar za fitoplazme in bi se z njih fitoplazme lahko razširile na gospodarsko pomembne rastline. Za fitoplazme iz skupine Aster yellows (AY)/16SrI, ki okužujejo tudi vinsko trto, uvajamo v diagnostično prakso občutljivo in specifično metodo detekcije s PCR v realnem času. Pri razvoju smo najprej iz javno dostopne baze GenBank pridobili nukleotidna zaporedja, na katerih smo po poravnavi izbrali primerna območja za načrtovanje oligonukleotidnih začetnikov in sonde. V naslednjem koraku smo *in silico* ugotavljali specifičnosti oblikovanih oligonukleotidov s pomočjo orodja BLAST. Z nadaljnjimi testi smo preverjali specifičnosti načrtovanega amplicona na izolatih DNA različnih fitoplazem. Prav tako smo preverili možne navzkrižne reaktivnosti z zdravo vinsko trto in z ekstrakti bakterij, ki trto okužujejo.

Ključne besede: fitoplazme, PCR-RČ, rumenice aster, vinska trta

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF DIAGNOSTIC METHOD FOR ASTER YELLOW S PHYTOPLASMA DETECTION ON GRAPEVINE WITH REAL-TIME PCR

Phytoplasmas are pathogenic bacteria, lacking cell wall and belong to the class *Mollicutes*. They are one of the smallest known obligate parasites with a two-host life cycle that comprises insects and plants. Phytoplasmas are associated with plant diseases of several hundred plant species, including many economically important crops. So far it has not been possible to grown them on an artificial media. Phytoplasmas can be efficiently determined and distinguished only by using molecular biology based methods. At the National institute of Biology we are performing the laboratory diagnostics for the 16SrXII, 16SrX and 16SrV phytoplasma groups on fruit trees, grapevine and on the non-cultivated plants, which might also act as reservoirs for phytoplasmas. Now we are introducing a sensitive and reliable real-time PCR method in our diagnostic practice also for the detection of Aster yellows phytoplasma (AY)/16SrI that infect many plants, including grapevine. For developing of the method we obtained nucleotide sequences from public accessible GeneBank database and

¹ univ. dipl. biol., Večna pot 111, SI-1111 Ljubljana

² dr. biol. znan., prav tam

³ dr. biol. znan., prav tam

⁴ prof. dr., prav tam

⁵ prof. dr., prav tam

designed an appropriate amplicon for the amplification of species-specific DNA region. The specificity of amplicon was analyzed *in silico* by BLAST software. For further specificity test of the designed detection system, we tested several different DNA isolates of phytoplasmas. Finally, we checked our system for potential cross-reactivities with samples from healthy field grapevine and from bacteria that infect grapevine.

Key words: aster yellows, grapevine, phytoplasma, real-time PCR

1 UVOD

Fitoplazme so rastlinske patogene bakterije brez celične stene, taksonomsko uvrščene v zelo raznoliko skupino *Mollicutes*. So med najmanjšimi znanimi organizmi in imajo enega najmanjših genomov (530 – 1350 bp). Fitoplazme so obligatni paraziti, z dvema skupinama gostiteljev, žuželkami in rastlinami. V rastlinah naseljujejo izključno floemska tkiva. Na okuženih rastlinah fitoplazme povzročajo različna bolezenska znamenja kot so rumenenje, rdečenje listov, razbarvanje in deformacije cvetov, pretvorbe cvetov v zelene poganjke, metličavost, majhne plodove, skrajšane ali podaljšane internodije. Okužba gospodarsko pomembnih rastlin je povezana z zmanjšanim pridelkom, v skrajnem primeru lahko rastline tudi povsem propadejo.

Na Nacionalnem inštitutu za biologijo smo prve analize določanja fitoplazem začeli izvajati že leta 1999 in danes jih določamo na različnem rastlinskem materialu in v žuželčnih prenašalcih. Z uvedenimi metodami določamo tri sorodne vrste fitoplazem iz skupine 16SrX na sadnem drevju – '*Candidatus* phytoplasma mali', povzročiteljico boleznih metličavost jablan (apple proliferation – AP), '*Ca.* phytoplasma pruni', povzročiteljico boleznih leptonekroza koščičarjev (european stone fruit yellows – ESFY) in '*Ca.* phytoplasma pyri', povzročiteljico boleznih odmiranja hrušk (pear decline – PD). Na vinski trti določamo fitoplazmo iz skupine 16SrXII '*Ca.* phytoplasma solani', povzročiteljico boleznih črni les (bois noir – BN) in karantensko '*Ca.* phytoplasma vitis', povzročiteljico boleznih zlate trsne rumenice (flavescence dorée – FD) iz skupine 16SrV. Vinska trta ni edini gostitelj teh fitoplazem, saj smo že dokazali pojav '*Ca.* phytoplasma solani' na slaku in pojav '*Ca.* phytoplasma vitis' na navadnem srobotu (*Clematis vitalba*). To nakazuje možnost prenosa fitoplazem z žuželčnimi vektorji z negojenih rastlin, ki morda služijo kot rezervoar fitoplazem, na gospodarsko pomembne rastline. V Sloveniji je zastopana tudi '*Ca.* phytoplasma asteris', povzročiteljica boleznih rumenic aster (Radišek in sod. 2008) iz taksonomske skupine Aster yellows (AY)/16SrI. AY je med najbolj raznolikimi in geografsko zelo razširjenimi skupinami fitoplazem. Fitoplazme iz te skupine povzročajo bolezenska znamenja predvsem na rastlinah iz družine *Asteraceae*, vendar okužujejo tudi vinsko trto (Alma in sod., 1996; Angelini in sod., 2007), na kateri povzročajo bolezen trsno rumenico. Trsne rumenice vinske trte povzročajo različne nesorodne fitoplazme. Bolezenska znamenja so si med seboj zelo podobna in fitoplazem na njihovi osnovi ni mogoče ločiti. Najprimernejša metoda za njihovo hitro, natančno in zanesljivo razlikovanje ter določanje je PCR v realnem času (PCR-RČ), vendar mora biti metoda skrbno načrtovana in preverjana. V tem prispevku predstavljamo razvoj take metode za določanje '*Ca.* phytoplasma asteris' na vinski trti in primerjavo metode z že obstoječo metodo (Angelini in sod., 2007).

2 MATERIALI IN METODE

2.1 Izvor materiala

Za primerjavo dveh metod za določanje fitoplazme AY smo uporabili izolate DNA iz vinske trte in DNA fitoplazem iz skupin

- 16SrI: *Ribes* in *Vinca*, *Rehmannia glutinosa* in Strawberry green petal, izolirane iz madagaskarskega zimzelena (*Cataranthus roseus*) in 'Ca. p. asteris', izolirano iz ameriškega slamnika (*Echinaceae purpurea*)
- 16SrII: *Vinca* coconut phyllody, Tomato big bud, Sweet potato little leaf, Soybean phyllody, Faba bean phyllody in *Crotalaria saltiana* phyllody, izolirane iz madagaskarskega zimzelena
- 16SrIV: Lethal yellows, izolirano iz madagaskarskega zimzelena
- 16SrV: 'Ca. p. vitis', izolirano iz madagaskarskega zimzelena in vinske trte
- 16SrVI: Brinjal little leaf, izolirano iz madagaskarskega zimzelena
- 16SrX, 'Ca. p. mali', 'Ca. p. pruni', 'Ca. p. piri' izolirane iz madagaskarskega zimzelena in sadnega drevja
- 16SrXI: Napier grass stunt, izolirano iz madagaskarskega zimzelena
- 16SrXII: 'Ca. p. solani', izolirano iz madagaskarskega zimzelena in vinske trte
- vzorec neznanega tipa fitoplazme, izoliranega iz ameriškega slamnika.

Poleg DNA fitoplazem smo uporabili DNA nesimptomatične vinske trte in bakterijske izolate izolirane iz različnih sort vinske trte.

2.2 Oblikovanje sistema za določanje s PCR-RČ in izvedba

Začetne oligonukleotide in sonde smo izdelali na podlagi nukleotidnih zaporedij DNA fitoplazem 'Ca. phytoplasma asteris', 'Ca. phytoplasma solani' in 'Ca. phytoplasma vitis', iz javno dostopnih baz podatkov GeneBank. Uporabili smo kemijo TaqMan[®] MGB[™]. S pomočjo programa Vector NTI[™] 9.0 (Invitrogen) smo poravnali izbrana zaporedja DNA fitoplazem iz skupin 16SrI (AF503568, AY180929, AY180926, AF268406, AF268407, AF322644, AF322645, AF268409, AF268408, AY180927, AY180928); 16SrV (AF122910, AF122911, Y16387, AF305198, AF305240, AY072722, AY576685, AY197654, AY197648, AY197650, AY197649, AY197651, AY332659) in 16SrXII (AJ964960, EU014776, EU010006, EU010010, EU010007, EU010008, EU010009, EU014779, EU014778, EU014777, AY377868, AY083605). Zaradi raznolikosti znotraj skupine AY smo se odločili za sondo z eno degeneracijo. Pozicija začetnih oligonukleotidov in sonde je na delu gena za 16S, kjer lahko ločimo fitoplazme 16SrXII in 16SrV od fitoplazme AY/16SrI. Za načrtovanje začetnih oligonukleotidov in sonde smo uporabili program PrimerExpress[™] 3.0 (Applied Biosystems). Specifičnost načrtovanih začetnih oligonukleotidov in sonde smo preverili *in silico*, s primerjavo z znanimi zaporedji v bazah podatkov s pomočjo programa Basic Local Alignment Tool – BLAST. Testiranje ni pokazalo nespecifičnih zadetkov.

Primerjavo med načrtovanim sistemom PCR-RČ za določanje fitoplazme AY (v nadaljevanju AYnib) in sistemom za določanje fitoplazme AY Angelini in sod. (2007) (v nadaljevanju AYan) smo izvedli, kot je opisano v Hren in sod. (2007). Prav tako smo, na enak način kot je zapisano v Hren in sod. (2007), določili lastnosti obeh sistemov za določanje fitoplazem AY: mejo detekcije, občutljivost amplikonov in učinkovitost pomnoževanja.

Preglednica 1. Oblikovanje začetnikov in sonde.

Ime	Nukleotidno zaporedje (5' – 3')
AYnibF začetni oligonukleotid	GGGTTAAGTCCCGCAACGA
AYnibR končni oligonukleotid	TCTTGCTAAAGTCCCCACCATTAC
AYnibS sonda	*FAM-CAACCCTTATTGTTAGTTRCCAG-MGB*

* Sonda ima na 5' koncu vezano fluorescentno barvilo FAM (6-karboksifluorescein), na 3' koncu pa vezan nefluorescentni dušilec imenovan MGB (minor groove binder).

2.3 Testi specifičnosti

Specifičnost obeh sistemov za določanje fitoplazme AY smo ugotavljali s preverjanjem pojava navzkrižnih reakcij z: (1) DNA različnih tipov fitoplazem, ki jih lahko najdemo na vinski trti (16SrXII, 16SrV in 16SrI), (2) DNA različnih tipov fitoplazem, ki jih ni na vinski trti (16SrII, 16SrIV, 16SrVI, 16SrX in 16SrXI), (3) rastlinsko DNA izolirano iz listnih žil zdravih rastlin vinske trte različnih sort in (4) bakterijskimi izolati, ki so zastopani na vinski trti.

Produkte PCR-RČ smo posredno vizualizirali s programom SDS 2.3 (Applied Biosystems), s pomočjo katerega smo naredili tudi začetne analize podatkov.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

V raziskavi smo primerjali dva sistema za detekcijo fitoplazem AY s PCR-RČ: že objavljeni sistem AYan (Angelini s sod. 2007) in sistem AYnib, oblikovan v našem laboratoriju. Dokazali smo, da oba sistema enakovredno razlikujeta fitoplazmo AY od ostalih fitoplazem, ki se pojavljajo na vinski trti (16SrV in 16SrXII) (preglednica 2A); večje razlike pa smo opazili pri drugih testih specifičnosti (preglednica 2B in D).

Preglednica 2: Testi specifičnosti.

TESTI SPECIFIČNOSTI			Izvor DNA Št. vzorcev	POMNOŽEVANJE (Št.poz.vzorcev/Št. testiranih)			
				Načrtovanje NIB (AYnib)	Načrtovanje Angelini (AYan)		
A	DNA fitoplazem vinske trte	Aster yellows (16SrXI)	<i>C. roseus</i> (4), <i>E. purpurea</i> (1)	4/4 1/1	4/4 1/1		
		Elm yellows (16SrV)	<i>V. vinifera</i> (3) <i>C. roseus</i> (1)	0/3 0/1	0/3 0/1		
		Stolbur (16SrXII)	<i>V. vinifera</i> (22) <i>C. roseus</i> (1)	0/22 0/1	0/22 0/1		
B	DNA fitoplazem, ki ne okužujejo vinske trte	Peanut WB (16SrII)	<i>C. roseus</i> (6)	4/6	0/6		
		Coconut lethal yellows (16SrIV)	<i>C. roseus</i> (1)	0/1	0/1		
		Clover proliferation (16SrVI)	<i>C. roseus</i> (1)	1/1	0/1		
		Appel proliferation (16SrX) - AP - ESFY - PD	jablane (3) <i>C. roseus</i> (2) koščičarji (3) <i>C. roseus</i> (1) hruške (3)	1/4 0/2 0/4 0/1	0/4 0/2 0/4 0/1		
				Rice yellow dwarf (16SrXI)	<i>C. roseus</i> (1)	0/1	0/1
				C	DNA fitoplazme neznanega tipa	<i>E. purpurea</i> (1)	0/1
D	Bakterijski izolati iz rastlinskih ekstraktov različnih sort vinske trte			Bakterije (41)	0/41	3/41	
E	DNA nesimptomatičnih vzorcev vinske trte	<i>V. vinifera</i> (20)	1/20	0/20			

AYnib nespecifično pomnožuje DNA fitoplazem iz treh skupin, ki ne okužujejo vinske trte (preglednica 2B). Zaradi tega naj ta navzkrižna reaktivnost ne bi bila odločilna za diagnostiko fitoplazme AY na vinski trti. Pri testiranju sistema AYnib z izolati DNA iz nesimptomatičnih vinskih trt, smo pri enem vzorcu dobili pozitivno reakcijo (preglednica 2E). Ker nimamo na voljo izolatov DNA fitoplazme AY iz vinske trte, ne moremo z gotovostjo trditi, da je pozitiven signal nespecifičen in je posledica navzkrižne reaktivnosti, ali pa je bil vzorec resnično okužen s fitoplazmo AY, katere koncentracija pa je bila zelo nizka.

Pri sistemu AYan smo dobili nespecifična pomnoževanja določenih bakterijskih izolatov (preglednica 2D), ki se pojavljajo pri vinski trti, kar lahko vpliva na verodostojnost dobljenega pozitivnega rezultata.

Oba sistema za določanje fitoplazme AY smo testirali še z dvema izolatoma DNA fitoplazem iz ameriškega slamnika. Obe rastlini sta kazali značilna bolezenska znamenja okužbe s fitoplazmami. Pri enem vzorcu je bila fitoplazma AY predhodno dokazana že z drugo metodo (Radišek in sod., 2008). Njen pojav smo potrdili z obema preizkušanima sistemoma. Pri drugem vzorcu smo dokazali okužbo s fitoplazmami z univerzalnimi začetnimi oligonukleotidi, vendar tipa fitoplazme nismo uspeli določiti. Iz tega sklepamo, da je ameriški slanik gostitelj vsaj dvema vrstama fitoplazem in bi bil lahko univerzalni gostitelj za različne vrste fitoplazem.

4 SKLEPI

Metoda, ki smo jo razvili za določanje fitoplazme AY na vinski trti, v primerjavi z metodo Angelini in sod. (2007), ne daje nespecifičnih signalov z izolati iz vinske trte. Za razliko od metode Angelini in sod. (2007) pa daje nespecifične signale z drugimi fitoplazmami, ki niso zastopane na vinski trti. V primeru splošne detekcije fitoplazem iz skupine 16SrI na drugih gostiteljskih rastlinah zanesljivo določanje omogoča kombinacija obeh sistemov.

5 ZAHVALA

Zahvaljujemo se dr. Sebastjanu Radišku za vzorec DNA fitoplazme, izolirane iz ameriškega slamnika. Prav tako se zahvaljujemo dr. Mattu Dickinsonu za vzorce DNA fitoplazem iz skupin 16SrI, 16SrII, 16SrIV, 16SrVI in 16SrIX.

6 LITERATURA

- Alma, A., Davis, R.E., Vibio, M., Danielli, A., Bosco, D., Arzone, A., Bertaccini, A. 1996. Mixed infection of grapevines in Northern Italy by phytoplasmas including 16S rRNA RFLP subgroup 16SrI-B strains previously unreported in this host. *Plant. Disease*, 80: 418-421.
- Angelini, E., Bianchi, G.L., Filippin, L., Morassutti, C., Borgo, M. 2007. A new TaqMan method for identification of phytoplasma associated with grapevine yellows by real-time PCR assay. *Journal of Microbiological Methods*, 68: 613-622.
- Hren, M., Boben, J., Rotter, A., Kralj, P., Gruden, K., Ravnihar, M. 2007. Real-time PCR detection systems for Flavescence dorée and Bois noir phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics. *Plant. Pathology* 56: 785-796.
- Radišek, S., Ferant, N., Jakše, J., Javornik, B. 2008. Identification of a phytoplasma from the aster yellows group infecting purple coneflower (*Echinacea purpurea*) in Slovenia. *New Disease Reports*. (Accepted for publication 19 Sep 2008).