

RAZVOJ HITREGA PRESEJALNEGA TESTA ZA LABORATORIJSKO DOLOČANJE PRIKRITE OKUŽBE Z *Erwinia amylovora* (Burill) Winslow *et al.*

Manca PIRC¹, Tanja DREO², Maja RAVNIKAR³

¹Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo,
Ljubljana

IZVLEČEK

Testiranje rastlin na prikrito (latentno) okužbo z bakterijo *Erwinia amylovora* se v Sloveniji izvaja že od leta 1998. Testiranje poteka po EPPO diagnostičnem protokolu in tudi z uporabo novejših metod. Trenutno obstoječe in validirane presejalne serološke metode so ELISA in obogatitvena ELISA ter test indirektna imunofluorescence. Ker je pričakovano število bakterij *Erwinia amylovora* v vzorcih brez bolezenskih znamenj zelo nizko, je to ponavadi omejujoči dejavnik pri seroloških metodah. Novejša hitra metoda, ki se uporablja, je molekularna metoda PCR (verižna reakcija pomnoževanja DNA s polimerazo). Vendar reakcijo lahko motijo snovi, ki so v ekstraktu (polifenolne substance iz rastlinskega soka, ostanki fitofarmaceutskih sredstev,...) in s tem zmanjšajo občutljivost reakcije; možne so tudi navzkrižne reakcije s sorodnimi bakterijami. V zadnjih nekaj letih se je razvoj molekularnih metod usmeril iz konvencionalnega PCR v PCR v realnem času, ki poleg kvalitativnih omogoča tudi kvantitativne analize. Zaradi direktne detekcije signala med pomnoževanjem ni več potrebe po dodatnem koraku detekcije produktov na agoroznem gelu. Tako nam PCR v realnem času omogoča analizo velikega števila vzorcev z zmanjšano možnostjo navzkrižne kontaminacije in je zato primeren kot presejalna metoda pri velikem številu vzorcev. Za detekcijo *Erwinia amylovora* je bil razvit PCR v realnem času z oligonukleotidnimi začetniki in sondo, ki nalegajo na plazmidno DNA pEA29 (Salm *et al.*, 2004). Slabost testa je, da je tarčni plazmid sicer relativno stabilen, ni pa zastopan v vseh bakterijah v naravi. Bakterij brez plazmida s to metodo ne zaznamo, kljub temu, da so še vedno sposobne povzročati bolezenska znamenja. V ta namen smo razvili PCR v realnem času s tarčo na kromosomski DNA, ki naj bi zajemal vse izolate *Erwinia amylovora*.

Ključne besede: *Erwinia amylovora*, hrušev ožig, PCR v realnem času, plazmid pEA29, latentna okužba

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A RAPID SCREENING METHOD FOR TESTING OF *Erwinia amylovora* (Burill) Winslow *et al.* FROM ASYMPTOMATIC PLANT MATERIAL

In Slovenia testing of *Erwinia amylovora* from latent samples has been conducted since 1998 using methods described in EPPO diagnostic protocols as well as using new approaches. ELISA, enrichment ELISA, and immunofluorescence (IF) present three rapid and validated serological screening tests. These serological methods may not be sensitive enough due to the low concentrations of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. PCR (polymerase chain reaction) presents a new molecular screening method. Different compounds present in the extract (polyphenolic compounds, phytopharmaceutical

¹ univ. dipl. biol., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

² univ. dipl. mikrobiol., prav tam

³ prof., dr. biol. znan., prav tam

residues,...) can inhibit such PCR reaction and lower the sensitivity of the test. Cross-reactivity with closely related bacteria was also noticed and presents another problem. In the last few years real-time PCR has been introduced. The method can be used as either qualitative or quantitative test where the risk for cross-contamination is lowered due to the direct monitoring of the results. Because of the high throughput of samples, real-time PCR can be used as a screening assay. A real-time PCR method for detection of *Erwinia amylovora* has already been developed (Salm *et al.*, 2004). The target for the test is located on the pEA29 plasmid that is relatively stable but is not present in all bacterial isolates. *Erwinia amylovora* without pEA29 can still cause appearance of the disease symptoms. For this reason a new real-time PCR targeting chromosomal DNA is being developed in our laboratory.

Key words: *Erwinia amylovora*, fire blight, real time – PCR, plasmid pEA29, latent infection

1 UVOD

Erwinia amylovora (Burill) Winslow *et al.* je bakterija, ki povzroča bolezen hrušev ožig. Ima zelo širok krog gostiteljskih rastlin iz družine *Rosaceae*, ki jih lahko okužuje. Večina gospodarsko pomembnih rastlin je iz poddružine *Maloideae*, kot so jablane, hruške in kutine ter okrasne rastline kot so panešplja, ognjeni trn, japonska kutina in ostale. Bakterija pa ni omejena samo na to poddružino, ampak lahko naravno okužuje tudi rastline iz rodu *Rubus* (podružina *Rosoideae*) in sicer maline ter robide (Starr in sod. 1951, Evans 1996). Izolirali pa so jo tudi iz japonske slive (podružina *Amygdaloideae*) (Mohan in Thomson, 1996). Bakterija je na II.A.II seznamu škodljivih organizmov v EU in Sloveniji. Vsako leto se vrši uradni nadzor hruševga ožiga, ki ga vodi Fitosanitarna uprava Republike Slovenije. Gre za zdravstvene preglede gostiteljskih rastlin v skladu s Pravilnikom o ukrepih za preprečevanje širjenja in zatiranja hruševga ožiga (Uradni list RS, št. 18/04, 44/04 in 21/05) in sicer kot vizualni pregledi in opazovanja, jemanja vzorcev rastlin s sumljivimi znamenji bolezni in jemanje vzorcev za testiranje na latentno okuženost rastlin v drevesnicah in matičnih nasadih. Testiranje vzorcev z bolezenskimi znamenji in latentno testiranje izvajamo na Nacionalnem inštitutu za biologijo. Določanje bakterije *Erwinia amylovora* je neprimerno lažje v vzorcih, kjer so se že pojavila bolezenska znamenja. Testiranje le teh ponavadi poteka od spomladi do jeseni. Lahko se zgodi, da v jesenskem času iz starih razjed in zastarelih okužb bakterije ne moremo izolirati, lahko pa sklepamo na njen pojav glede na rezultate pridobljene z molekularnimi in serološkimi tehnikami.

Erwinia amylovora se lahko nahaja v rastlinah tudi brez bolezenskih znamenj. V tem primeru govorimo o prekriti okužbi oz. o latentni zastopanosti bakterije. Te rastline so verjetno pomembnejši vir širjenja bolezni na nova geografska področja (Boon in van der Zwet, 2000). Zato je pomembnost takega testiranja izredno velika. Ker pa je bakterija v teh vzorcih navadno zastopana v izredno nizkih koncentracijah je potrebna uporaba zelo občutljivih tehnik. Testiranje poteka v skladu z EPPO diagnostičnim protokolom PM 7/20 (OEPP/EPPO, 2004), vendar nam pojav novih tehnik, predvsem na molekularnem nivoju, omogočajo še občutljivejšo in bolj specifično določanje bakterije v vzorcih. Eno izmet teh metod smo uvedli in preizkusili na vzorcih iz leta 2006.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Rastlinski material

Na latentno okužbo smo v letu 2006 testirali 33 vzorcev. Gostitelji, ki so bili zajeti v testiranje prikazuje preglednici 1.

Preglednica 1: Število vzorcev po gostiteljskih rastlinah

Gostiteljska rastlina	Št. vzorcev
Jablana	16
Hruška	1
Kutina	1
Panešplja	2
Jablana , hruška	8
Jablana, panešplja	1
Jablana, kutina	1
Jablana, hruška, kutina	1
Hruška, nešplja, kutina	1
Panešplja, glog	1
SKUPAJ	33

2.2 Priprava vzorcev

Iz vzorca smo naključno izbrali 30 poganjkov. Če je v vzorcu več različnih rodov smo izbrali vejice iz vseh rodov. Iz vsake vejice smo izrezali 4 približno 1 cm dolge koščke in jih prelili s fosfatnim pufrom z NaCl in Tweenom in inkubirali na stresalniku 90 minut pri sobni temperaturi. Po 10 min centrifugiranju pri 1500 g smo supernatant prenesli v novo centrifugirko in centrifugirali 20 min pri 7000 g. Supernatant smo odlili in usedlino resuspendirali v 2 ml fosfatnega pufru z NaCl. Vzorec je bil tako pripravljen za nadaljnjo analizo.

2.3 Hitri presejalni testi

- Test imunofluorescence (IF)

Test smo izvedli po predpisanem EPPO protokolu (OEPP/EPPO, 2004) in navodilu proizvajalca protiteles. Uporabljamo primarna protitelesa proizvajalca Plant Research International (kataloška številka Eam-C) in kot konjugirana protitelesa uporabljamo protitelesa proizvajalca Sigma (kataloška številka F-6005).

- PCR v realnem času

Pred PCR v realnem času smo izvedli obogatitev vzorcev v KB in CCT gojišču. Obe gojišči smo pripravili po EPPO protokolu (OEPP/EPPO, 2004) in ga razdelili po 500 µl v posamezno mikrocentrifugirko. Vsaki mikrocentrifugirki smo dodali po 500 µl vzorca. Vse vzorce smo inkubirali 72 ur pri 25°C. Po inkubaciji smo odvzeli 50 µl vzorca in izvedli PCR v realnem času.

Sekvence začetnih oligonukleotidov, sonde, reakcijska mešanica ter pogoji pomnoževanja so prikazani v preglednici 2. Po 8 µl pripravljene reakcijske mešanice smo nanesti na optično ploščico (Applied Biosystems) in v vsako reakcijsko mešanico dodali 2 µl obogatene vzorca. Vsak vzorec smo na ploščico nanesti v treh ponovitvah. Ploščico smo pokrili z lepljivo folijo, centrifugirali in jo vstavili v detektor ABIPRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems)

PCR v realnem času smo analizirali z računalniškim programom SDS 2.2.2. (Applied Biosystems). S pomočjo standardne krivulje iz redčitvene vrste suspenzije *Erwinia amylovora* z znano koncentracijo smo lahko določili limito detekcije uvedene metode in izvedli kvantifikacijo bakterije v vzorcih.

Preglednica 2: Sekvence, reakcijska mešanica in pogoji pomnoževanja pri PCR v realnem času

Sekvence oligonukleotidnih začetnikov in sonde (Salm in Geider, 2004) - 5' – 3'		
Smiselni začetni oligonukleotid	Protismiselni začetni oligonukleotid	Taqman sonda
P29TF CACTGATGGTGCCGTTG	P29TR CGCCAGGATAGTCGCATA	P29TM TACCTCCGCAGCCGTCATGG
Reakcijska mešanica (na 1 vzorec)		
Taqman univerzalna mešanica za PCR (Applied Biosystem)		5 µl
P29TF (10 pmol/µl)		0,9 µl
P29TR (10 pmol/µl)		0,9 µl
P29TM (10 pmol/µl)		0,2 µl
Sterilna dH ₂ O		1 µl
Pogoji pomnoževanja		
Aktivacija UNG AmpErase [®]		2 min, 50°C
Aktivacija polimeraze DNA AmpliTaq [®] Gold		10 min, 95°C
		45 ciklov
Denaturacija DNA		15 s, 95°C
Vezava začetnih oligonukleotidov in prepisovanje DNA		1 min, 60°C

- Izolacija *Erwinia amylovora* na gojiščih po obogatitvi v KB in CCT gojišču

Po obogatitvi v KB in CCT gojišču smo izvedli tri 10 – kratne redčitve v vodi. Na vsako CCT gojišče smo nanесли po 50 µl neredčenega vzorca ali ustrezne redčitve. Plošče smo inkubirali 3 – 4 dni in precepljali značilne kolonije.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Za vsak vzorec smo izvedli dva presejalna testa in sicer PCR v realnem času in test imunofluorescence. Pri vseh vzorcih je bil test imunofluorescence negativen. Rezultati PCR v realnem času so bili pri 8 vzorcih sumljivi na zastopanost bakterije *Erwinia amylovora*. Glede na primerjavo s standardno krivuljo smo lahko relativno kvantificirali koncentracijo bakterije v vzorcih. Vrednosti so bile od 250 do 10⁴ cfu/ml. Slednja koncentracija je na meji detekcije drugih metod. Z nanosom teh vzorcev na selektivno gojišče CCT smo želeli bakterijo *Erwinia amylovora* izolirati. Vendar pri nobenem od vzorcev nismo bili uspešni. Razlogov za pozitiven signal pomnoževanja DNA in negativen rezultat izolacije na gojiščih je lahko več.

- Bakterije so žive, vendar zastopane v prenizki koncentraciji, da bi jih bilo mogoče izolirati na gojiščih. Velikokrat zaradi prenizke koncentracije bakterijo prerastejo druge saprofitske bakterije, ki se v postopku obogatitve lahko zelo namnožijo
- Bakterije so zastopane, vendar so mrtve. Podobno kot s serološkimi testi, s testi DNA zaznamo tudi mrtve bakterije. Glede na šibke signale pri PCR v realnem času ni presenetljivo, da bakterij ni bilo videti v testu imunofluorescence.
- V testu pomnoževanja DNA lahko prihaja o navzkrižnih reakcij z drugimi, neznanimi bakterijami
- Bakterije so žive, vendar niso zmožne rasti na gojiščih.

Glede na veljavno zakonodajo, dogovore in protokole za določanje bakterije *Erwinia amylovora*, je v primerih, ko so sumljivi nekateri od presejalnih testov, bakterije pa ni mogoče izolirati v čisti kulturi, rezultat negativen. Ker pa ne moremo ugotoviti ali je bakterija živa ali mrtva in tudi ni znano kaj pomeni za prenos in razvoj bolezni nizka koncentracija bakterij priporočamo intenzivnejši nadzor na lokacijah, kjer so bili ti vzorci odvzeti.

4 SKLEPI

Metoda PCR v realnem času za določanje *Erwinia amylovora* se je izkazala kot zelo občutljiva in specifična metoda. Pri primerjavi z klasičnim PCR lahko večje število vzorcev testiramo v krajšem času. Pomanjkljivost razvitega testa pa je v tem, da ne določimo vseh patogenih sevov *Erwinia amylovora*, ki jih lahko najdemo v naravi (Llop in sod., 2006). Na podlagi tega smo se odločili, da razvijemo nov PCR v realnem času z tarčo na kromosomski DNA in na tak način lahko zelo natančno in specifično določimo vse seve.

5 ZAHVALA

Zahvaljujemo se fitosanitarnim inšpektorjem Fitosanitarne inšpekcije Inšpektorata RS za kmetijstvo, gozdarstvo in hrano, ter drugim strokovnjakom s področja varstva rastlin za nabrane vzorce in Fitosanitarni Upravi za sofinanciranje ter Lidiji Matičič, Alešu Blatniku in Špeli Prijatelj Novak za pomoč pri izvedbi laboratorijskih testov.

6 LITERATURA

- Bonn, W. G., van der Zwet, T. 2000. Distribution and economic importance of fire blight. V: Vanneste, J.L. Fire Blight – The Disease and causative agent, *Erwinia amylovora*. CABI Publishing, N., 37-54
- Evans, I. R. 1996 Fire blight of raspberries in Alberta. *Acta Horticulturae* 411, 69-72
- Llop, P., Donat, V., Rodriguez, M., Cabrefiga, J., Ruz, L., Palomo, J. L., Montesinos, E., Lopez, M. M. 2006. An Indigenous Virulent Strain of *Erwinia amylovora* Lacking the Ubiquitous Plasmid pEA29. *Phytopathology*, 96, 8: 900–907
- Mohan, S. K., Thomson, S. V. 1996 An outbreak of fire blight in plums. *Acta Horticulturae* 411, 73–76
- OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO, Bulletin 34, 155-171
- Salm, H., Geider, K. 2004. Real – time PCR for detection and quantification of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fireblight. *Plant Pathology*, 53. 602 – 610
- Starr, M. P., Cardona, C., Folsom, D. 1951. Bacterial fire blight of raspberry. *Phytopathology* 41, 915–919