

## RAZVOJ METODE PCR V REALNEM ČASU ZA DOLOČANJE BAKTERIJE *ERWINIA AMYLOVORA* IN NJENA UPORABA V DIAGNOSTIKI

Manca PIRC<sup>1</sup>, Tanja DREO<sup>2</sup>, Maja RAVNIKAR<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup>Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo,  
Ljubljana

### IZVLEČEK

Detekcija bakterije *Erwinia amylovora* v simptomatičnih vzorcih je relativno enostavna, saj je bakterij navadno veliko in dobro rastejo na umetnih gojiščih. Težave lahko imamo pri vzorcih, kjer je okužba močno napredovala in je tkivo zelo propadlo, pri vzorcih tretiranih s fitofarmaceutskimi sredstvi, ki motijo teste in pri vzorcih, ki ne kažejo znamenj bolezni in vsebujejo nizke koncentracije bakterij (prikrite ali latentne okužbe). Metoda, ki je zelo občutljiva, ter hkrati specifična in omogoča analizo težavnejših vzorcev je PCR v realnem času. Večina obstoječih molekularno-bioloških testov za detekcijo *Erwinia amylovora*, temelji na določanju plazmida pEA29, ki ga pa ni v vseh bakterijah v naravi. Bakterij brez plazmida tako ne zaznamo, kljub temu, da so še vedno sposobne povzročati bolezenska znamenja. Za zaznavanje vseh bakterij *Erwinia amylovora* ne glede na njihov plazmidni profil smo razvili PCR v realnem času s tarčo na kromosomski DNA. V povezavi z avtomatizirano izolacijo DNA lahko v vzorcih z izraženimi znamenji bolezni zanesljivo zaznamo vsaj  $10^3$  celic  $\text{mL}^{-1}$  ( $\approx 4$  celice na reakcijo). Pri analiziranju vzorcev na prikrto okužbo nam PCR v realnem času omogoča kvantifikacijo bakterije pred obogatitvijo in po njej v splošnem in selektivnem gojišču. Na ta način ugotavljamo živost *E. amylovora*, tudi kadar bakterij po obogatitvi na gojišču ne moremo izolirati v čisti kulturi.

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

### ABSTRACT

#### DEVELOPMENT OF REAL-TIME PCR FOR DETECTION OF *ERWINIA AMYLOVORA* AND ITS USE IN DIAGNOSTICS

Detection of *Erwinia amylovora* in symptomatic samples is usually straightforward as bacteria are present in large numbers and grow well on artificial media. Reliable diagnosis, however, can be difficult when bacteria are hindered in their growth on artificial media or their numbers are low due to abundant tissue necrosis, samples treated with pesticides or bactericidal compounds, and symptomless samples. For such samples there is a need for a sensitive method of detection i.e. real-time PCR. Existing real-time PCR systems for detection of *E. amylovora* target pEA29 which is relatively stable but is not present in all pathogenic isolates in nature. We have developed real-time PCR systems targeting chromosomal DNA that enables specific detection of all *E. amylovora* regardless of their plasmid profile. Combined with an automated DNA extraction method the real-time PCR assays reliably detected at least  $10^3$  cells  $\text{mL}^{-1}$  of the pathogen from blighted woody plant material ( $\approx 4$  cells per reaction). In testing of symptomless samples, absolute quantification of *E. amylovora* before

<sup>1</sup> univ. dipl. biol., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana, e-mail: manca.pirc@nib.si

<sup>2</sup> dr. biol. znan., prav tam

<sup>3</sup> prof. dr. biol. znan., prav tam

and after enrichment in liquid media provided proof of *E. amylovora* viability and ability to multiply also in cases when subsequent isolation in pure culture was not possible.

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

## 1 UVOD

*Erwinia amylovora* (Burill) Winslow *et al.* je bakterija, ki povzroča bolezen hrušev ožig. Bakterija je patogena za rastline iz družine rožnic (*Rosaceae*) kjer okužuje približno 200 različnih vrst v 40-ih rodovih. Najpogosteje omenjeni rodovi so: *Malus*, *Pyrus*, *Crataegus*, *Chaenomeles*, *Cotoneaster* in *Cydonia*. Bakterija je uvrščena na II.A.II seznam škodljivih organizmov v EU in Sloveniji. Vsako leto se pri nas vrši uradni nadzor hruševnega 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 hruševnega ožiga (Uradni list RS, št. 18/04, 44/04, 21/05 in 21/07). Testiranje vzorcev na bakterijo *E. amylovora* poteka v skladu s EPPO diagnostičnimi protokoli (EPPO, 1992, 2004). Pri določanju novejših molekularno – bioloških metode (PCR, vgnezdni PCR in PCR v realnem času) dopolnjujejo starejše serološke metode (ELISA, IF). Tako smo tudi v letu 2006 v našem laboratoriju uvedli metodo PCR v realnem času s setom oligonukleotidnih začetnikov in sondo s tarčo na plazmidu pEA29, ki sta jih razvila Salm in Geider (2004). Prednost metode PCR v realnem času pred klasično metodo PCR je v hitrosti izvedbe, zmanjšanju možnosti navzkrižne kontaminacije med vzorci, navadno je bolj specifična in bolj občutljiva. Pomankljivost že razvite metode PCR v realnem času (Salm in Geider, 2004) je v tem, da oligonukleotidni začetniki nalegajo na specifični del sekvence plazmida pEA29, ki ga pa ni v vseh patogenih sevih bakterije *E. amylovora* (Llop *et al.*, 2006). S testom tako ne zaznamo vseh sevov *E. amylovora*. Teh sevov v naravi po znanih podatkih ni veliko, so pa jih našli na različnih geografskih območjih (Llop *et al.*, 2008), zato smo za določanje vseh sevov *E. amylovora* razvili dva seta oligonukleotidnih začetnikov in sond na specifičnem delu kromosoma bakterije *E. amylovora*. En sistem smo razvili na delu gena ki je pomemben za sintezo amilovorana, polisaharida, ki je zelo pomemben pri patogenosti bakterije in drugega na ITS regiji, ki se zaradi velike raznolikosti med sorodnimi bakterijami velikokrat uporablja za razvoj molekularnih metod (Li in DeBoer, 1995; Pastrik *et al.*, 2002). Specifičnost in občutljivost metode PCR v realnem času s tarčo na kromosomski DNA je opisana v Pirc *et al.* (2009, v tisku). V nadaljevanju bomo prikazali primerjavo občutljivosti nove metode z uveljavljeno metodo vgnezdene PCR reakcije (Llop *et al.*, 2000).

## 2 MATERIAL IN METODE

### 2.1. Rastlinski material

Izbrali smo 8 rastlinskih ekstraktov iz simptomatičnih vzorcev različnih gostiteljskih rastlin (jablana, hruška, panešplja, kutina, nešplja, skorš, glog in ognjeni trn). Ekstrakti so bili predhodno testirani s standardnimi metodami na bakterijo *E. amylovora* in so bili negativni. Vsak ekstrakt smo razdelili 3 x po 90  $\mu$ l in dodali 10  $\mu$ l suspenzije bakterije *E. amylovora* v različnih koncentracijah. Končne koncentracije bakterije *E. amylovora* v pripravljenih vzorcih so bile  $1,8 \times 10^4$ ,  $1,8 \times 10^3$  in  $1,8 \times 10^2$  celic *E. amylovora* mL<sup>-1</sup> rastlinskega ekstrakta.

### 2.2 Izolacija DNA

Iz ekstraktov z dodano bakterijo *E. amylovora* smo izolirali DNA z uporabo QuickPick™ SML Plant DNA kita (Bio-Nobile) in KingFisher<sup>R</sup> mL sistema (Thermo LabSystem; Pirc *et al.*, 2009, v tisku).

### 2.3 Vgnezdena PCR reakcija

Vgnezdeno reakcijo smo izvajali kot je opisano v Llop *et al.*, (2000). PCR produkte smo analizirali na 1,5 % agaroznem gelu obarvanem z etidijevim bromidom. Vgnezdeno reakcijo smo za vse vzorce ponovili najmanj dvakrat.

### 2.3 PCR v realnem času

Sekvence začetnih oligonukleotidov, sonde, reakcijska mešanica ter pogoji pomnoževanja so opisani v Pirc *et al.* (2009, v tisku) ter Salm in Geider (2004). Po 8  $\mu$ l pripravljene reakcijske mešanice smo nanесли na optično ploščico (Applied Biosystems) in v vsako reakcijsko mešanico dodali 2  $\mu$ l izolirane DNA. Vsak vzorec smo na ploščico nanесли v treh ponovitvah. Ploščico smo pokrili z lepljivo folijo, centrifugirali in jo vstavili v detektor ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). PCR v realnem času smo analizirali z računalniškim programom SDS 2.2.2. (Applied Biosystems).

## 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Z metodo PCR v realnem času smo ne glede na uporabljen sistem zanesljivo zaznali bakterijo *E. amylovora* v vseh ekstraktih s koncentracijami  $1,8 \times 10^4$  in  $1,8 \times 10^3$  celic  $\text{mL}^{-1}$ .

Koncentracija (celic $\text{mL}^{-1}$ )	Gostiteljska rastlina	PCR v realnem času			vgnezdeni PCR
		Ams	ITS	pEA29	
$1,8 \times 10^4$	Jablana	+	+	+	+
	Hruška	+	+	+	+
	Panešplja	+	+	+	+
	Kutina	+	+	+	-
	Nešplja	+	+	+	+
	Skorš	+	+	+	+
	Glog	+	+	+	-
	Ognjeni trn	+	+	+	+
$1,8 \times 10^3$	Jablana	+	+	+	+
	Hruška	+	+	+	+
	Panešplja	+	+	+	-
	Kutina	+	+	+	-
	Nešplja	+	+	+	-
	Skorš	+	+	+	-
	Glog	+	+	+	+
	Ognjeni trn	+	+	+	+
$1,8 \times 10^2$	Jablana	-	+	-	-
	Hruška	+	+	-	-
	Panešplja	-	+	+	-
	Kutina	-	+	+	-
	Nešplja	-	-	-	-
	Skorš	-	+	-	-
	Glog	-	+	-	-
	Ognjeni trn	-	+	+	-

Preglednica 1: Primerjava treh sistemov PCR v realnem času in vgnezdene PCR reakcije pri določanju bakterije *E. amylovora* v ekstraktih z dodano bakterijo v koncentraciji  $1,8 \times 10^4 - 1,8 \times 10^2$  celic  $\text{mL}^{-1}$ . + (pozitiven končni rezultat) pomeni, da smo v vsaj 50% zabeležili pozitiven rezultat med ponovitvami in - (negativen končni rezultat), če smo pozitiven rezultat zabeležili v manj kot 50% ponovitev.

V nasprotju pa smo z metodo vgnezdene PCR reakcije zaznali *E. amylovora* pri 75% ekstraktov s koncentracijo  $1,8 \times 10^4$  *E. amylovora* celic  $\text{mL}^{-1}$  (6 pozitivnih/8 testiranih) in le pri 50 % ekstraktov s koncentracijo  $1,8 \times 10^3$  *E. amylovora* celic  $\text{mL}^{-1}$  (4 pozitivni/8 testiranih; preglednica 1). Pri ekstraktih s koncentracijo *E. amylovora*  $1,8 \times 10^2$  celic  $\text{mL}^{-1}$  z vgnezdene PCR reakcijo nismo dobili pozitivnega rezultata. V istih vzorcih smo z metodo PCR v realnem času dobili pozitiven rezultat v 88 % ekstraktov z ITS sistemom (7 pozitivnih/8 testiranih), medtem ko sta procenta uspešnosti določevanja pri Ams in pEA29 sistemu precej nižja (Ams – 13 % (1 pozitiven/8 testiranih) ; pEA29 – 38 % (3 pozitivni/8 testiranih)). Večja občutljivost sistema ITS sistema v primerjavi s sistemom Ams je posledica pojava tarčnega zaporedja v večjem številu kopij na genomu.

#### 4 SKLEPI

Kot smo pokazali v Pirc *et al.* (2009, v tisku) je uvedena metoda specifična, s poskusom opisanem v tem prispevku, kjer smo jo primerjali z metodo vgnezdene PCR reakcije (Llop *et al.*, 2000) pa smo potrdili njeno boljšo občutljivost in zanesljivost. S specifičnim pomnoževanjem tarčnega zaporedja na kromosomu omogoča tudi zaznavanje sevov *E. amylovora* brez plazmida pEA29. Dodatne prednosti: z razvojem različnih sistemov s katerimi pomnožujemo različne dele genoma bakterije *E. amylovora* zmanjšamo možnost navzkrižnih reakcij in s tem lažno pozitivnih rezultatov. Uporabljamo jo lahko tako pri problematičnih simptomatičnih vzorcih kot tudi pri testiranju latentnih vzorcev. Metoda je ustrezna tudi za določanje *E. amylovora* v cvetovih.

#### 5 ZAHVALA

Projekt je bil sofinanciran s strani Fitosanitarne uprave RS, Agencije za raziskovalno dejavnost in Slovenske tehnološke agencije (TIA-MISIS). Zahvaljujemo se fitosanitarnim inšpektorjem Fitosanitarne inšpekcije RS, ter drugim strokovnjakom s področja varstva rastlin za nabrane vzorce ter Lidiji Matičič, Alešu Blatniku in Špeli Prijatelj Novak za pomoč pri izvedbi laboratorijskih testov.

#### 6 LITERATURA

- EPPO (European Plant Protection Organization), 1992. EPPO Standards PM 3/40 *Erwinia amylovora*. Sampling and test methods. EPPO Bulletin 22, 225-231.
- EPPO (European Plant Protection Organization), 2004. Diagnostic protocols for regulated pests PM 7/20, *Erwinia amylovora*. EPPO Bulletin 34, 159-171.
- Li, X., DeBoer, S.H., 1995. Selection of polymerase chain reaction primers from an RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Phytopathology 85, 837–842.
- Llop, P., Bonaterra, A., Peñalver, J., and López, M.M., 2000. Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in symptomless plant material. Applied and Environmental Microbiology 66, 2071-2078.
- Llop, P., Donat, V., Rodríguez, 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
- Llop, P., López, M.M., Cabrefiga, J., Ruz, L., Montesinos, E., 2008. Study of the virulence in wild-type strains of *Erwinia amylovora* devoid of the plasmid pEA29. Acta Horticulturae 793, 145-148.
- Pastrik, K.H., Elphinstone, J.G., Pukall, R., 2002. Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification of 16S-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control. European Journal of Plant Pathology 108, 831-842.
- Pirc, M., Ravnikar, M., Tomlinson, J., Dreo, T., Improved fire blight diagnostics using quantitative real-time PCR detection of chromosomal DNA. Plant Pathology. (sprejeto v publikacijo januarja 2009)
- Salm, H., in Geider, K. 2004. Real – time PCR for detection and quantification of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fireblight. Plant Pathology, 53. 602 – 610