

LABORATORIJSKE METODE DOLOČANJA BAKTERIJE *XYLELLA FASTIDIOSA* V VZORCIH VINSKE TRTE

Jana SKUBIC¹, Maja RAVNIKAR², Gabrijel SELJAK³, Tanja DREO⁴

^{1,2,4}Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo,
Ljubljana

³Kmetijsko gozdarski zavod Nova Gorica

IZVLEČEK

Bakterija *Xylella fastidiosa* Wells *et al.* 1987 je povzročiteljica Piercove bolezni vinske trte ter drugih gospodarsko pomembnih bolezni rastlin. Bolezen razširjajo sesajoče žuželke, ki se hranijo z rastlinskim sokom in je zelo razširjena v ZDA, v Evropi pa je še ni. Bakterija je zato uvrščena na I.A.I seznam škodljivih organizmov. Bakterijo *X. fastidiosa* je navadno težko izolirati iz rastlinskega tkiva, zato je pomembno, da imamo na voljo dovolj občutljivo metodo, ki bo zaznala nizke koncentracije bakterij v vzorcu. Naš namen je bil vpeljati različne metode določanja te bakterije, in sicer gojenje bakterije *X. fastidiosa*, na gojiščih, imunofluorescenčni test (IF) in ELISA test.

Ključne besede: Piercova bolezen, ELISA, vinska trta, *Xylella fastidiosa*

ABSTRACT

METHODS FOR DETECTING *XYLELLA FASTIDIOSA* IN VINE SAMPLES

Xylella fastidiosa Wells *et al.* 1987 is a causal agent of Pierce's disease on grape (PD) and many other economically important plant diseases. The disease is spread by sap-feeding insect vectors and in many areas in the United States the disease is endemic; however, it is not yet present in Europe. The pathogen is therefore included in the I.A.I list of harmful organisms. Since isolation of the pathogen is difficult even from symptomatic samples, a reliable detection method of the pathogen is essential for monitoring the presence and spread of the disease. Our objective was to implement classical and serological methods for detecting *Xylella fastidiosa* in our laboratory.

Key words: Pierce's disease, ELISA, grapevine, *Xylella fastidiosa*

1 UVOD

Bakterija *Xylella fastidiosa* (Wells *et al.*, 1987) je majhna (0,2-0,4 µm x 1,0-4,0 µm), po Gramu negativna, aerobna bakterija. Povzroča Piercovo bolezen vinske trte in še nekatere druge bolezni na različnih gostiteljskih rastlinah. Bolezenska znamenja, ki jih povzroča so prvič opazili leta 1892 v vinogradih v južni Kaliforniji. Sprva so mislili, da bolezen povzročajo virusi, dokler niso s Kochovimi postulati potrdili, da gre za bakterijsko okužbo. *X. fastidiosa* lahko okuži več kot 100 rastlinskih vrst iz vsaj 46 rastlinskih družin. V rastlinah je bakterija omejena na ksilem. *X. fastidiosa* lahko povzroča veliko gospodarsko škodo na

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

² prof. dr., prav tam

³ mag. agr. znan., prav tam

⁴ dr. biol. znan., prav tam

rastlinah kot so vinska trta, agrumi in nekatere druge drevesne vrste (Hopkins and Purcell, 2002).

Bolezni, ki jih povzroča se večinoma pojavljajo v toplejših predelih Severne (vinska trta) in Južne Amerike (agrumi), o bolezni na hruškah poročajo s Taiwana, pojavljajo pa se tudi osamljeni primeri okužb, kot na primer okužba vinske trte na Kosovu in mandljev v Indiji (EPPO/OEPP, 2004). Po poročanju organizacij za varstvo rastlin v Evropi bolezni ni, zato bakterijo *X. fastidiosa* kot tudi njene prenašalce uvrščamo na seznam I.A.I škodljivih organizmov.

Bolezni, ki jih povzroča bakterija *X. fastidiosa* prenašajo nekatere vrste ksilofagnih škrtatkov kot so: *Carneocephala fulgida*, *Homalodisca vitripennis*, *Graphocephala atropunctata* (Hewitt *et al.*, 1964). Bolezenska znamenja se pri vinski trti navadno ne pojavijo na rastlinah mlajših kot eno leto. Znamenja bolezni največkrat opazimo pozneje v sezoni, ko so temperature višje, rastline pa imajo manj vode. Kažejo se v obliki kloroz in nekroz listov, ki se z napredovanjem bolezni popolnoma posušijo, vendar ne odpadejo. Močno okužene rastline lahko odmrejo v letu ali dveh (Hopkins, 1981). Bolezenska znamenja težko ločimo od tistih, ki so posledica glivnih okužb, škropljenja s herbicidi ali suše, kar pogosto oteži identifikacijo bolezni na terenu. Redni pregledi rastlin, vzorčenje in laboratorijska diagnostika, so zato bistveni za zgodnje odkrivanje bolezni.

Bakterija *X. fastidiosa* je počasi rastoča bakterija, prve kolonije se na selektivnih gojiščih pojavijo po desetih do štirinajstih dneh (Campanharo *et al.*, 2002). Ker bakterijo navadno težko izoliramo iz rastlinskega tkiva, je zelo pomembno, da imamo na voljo drugo dovolj občutljivo metodo, ki bo zaznala nizke koncentracije bakterij v tkivu. Najpogosteje se za detekcijo bakterije uporablja test ELISA (ang. Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), test imunofluorescence ali molekularne metode (Schaad *et al.*, 2002; Francis *et al.* 2006).

Naš namen je bil vpeljati različne metode določanja te bakterije, in sicer gojenje bakterije *X. fastidiosa* na gojiščih, imunofluorescenčni test (IF) in ELISA test.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Bakterijski sevi in gojišča

Kontrolni sevi bakterije *X. fastidiosa* ATTC 35879T, 2683 PCE-RR (ICPB 50025), ATTC Peach 4#5 (ICPB 50032) in ATTC 35871, PL788, 2679 PLM G83 (ICPB 50039), ATTC 93-1F (ICPB 50047), ki smo jih uporabili v naših testih so sevi izolirani iz vinske trte, slive in breskve, ki smo jih dobili iz zbirke ATTC (ang. »American Type Culture Collection«). Za gojenje smo uporabili tekoči in trdni gojišči PD2 in PW (Schaad *et al.*, 2000), po inokulaciji smo gojišča inkubirali vsaj 3 tedne pri temperaturi 28 °C. Po končani inkubaciji smo bakterije prenesli na sveža gojišča. Najbolje rastoči sev (ICPB 50032) smo izbrali kot kontrolni sev za nadaljnje testiranje.

2.2 Test indirektne imunofluorescence (IIF)

Kontrolne seve *X. fastidiosa* smo opazovali s fluorescentno mikroskopijo (oznaka mikroskopa Axioskop 2 Plus, Nikon) s testom IIF. Na stekelca smo nanесли 25 μ L čiste bakterijske suspenzije, koncentracijo smo umerili na 10^6 cfu/mL po McFarland standardu in fiksirali na vroči plošči 20 minut pri 60 °C. Za detekcijo smo uporabili poliklonska protitelesa proizvajalca Loewe (Lot No.220601) in sekundarna protitelesa proizvajalca Sigma (Lot No. 065K6224), označena s FITC.

2.3 Detekcija *Xylella fastidiosa* z ELISA testom

2.3.1 Priprava rastlinskega materiala

V petih slovenskih vinogradih smo vzorčili vinske trte sort Chardonnay, Šentlovrenka, Kerner in Tokaj. Zbrali smo 19 vzorcev iz katerih smo pripravili ekstrakte na več načinov. Pri prvem smo izrezovali listno ploskev skupaj z listnimi žilami, tkivo inkubirali 20 minut v ekstrakcijskem pufu in ekstrakt nato prestavili v novo mikrocentrifugirko. Pri drugem načinu smo izrezali listne žile in liste peclje ter tkivo macerirali. Pri tretjem načinu pa smo iz enoletnih poganjkov ekstrahirali vsebino žilnega sistema tako, da smo prek cevke pritrjene na poganjek posrkali ekstrakcijski pufer v katerega je bil namočen drugi del poganjka. V vse ekstrakte smo dodali glicerol in jih shranili pri -80°C do uporabe.

Z ELISA testom smo spremljali tudi vpliv tipa rastlinskega tkiva na detekcijo bakterije ter potencialno navzkrižno reaktivnost protiteles z rastlinskim tkivom. V ta namen smo pripravili ekstrakte *Catharanthus roseus* in *Nicotiana tabacum* tako, da smo 1 g rastlinskega tkiva macerirali v 10 mL ekstrakcijskega pufra, večje delce centrifugirali 3 min pri 3000 g in približno 4-5 mL supernatanta prenesli v novo centrifugirko. Vzorec smo nato centrifugirali 20 minut pri 7000 g, zavrgli supernatant in pelet resuspendirali v 4-5 mL ekstrakcijskega pufra.

2.3.2 Priprava bakterijskih suspenzij in izvedba ELISA testa

Suspenzijo pozitivne kontrole *X. fastidiosa* smo pripravili v koncentracijah od 10^6 cfu/mL do 10^1 cfu/mL v ekstrakcijskem pufu, ekstraktih vinske trte, ekstraktu *Catharanthus roseus* in ekstraktu *Nicotiana tabacum*. Navzkrižno reaktivnost protiteles smo preverjali tudi z nekaterimi patogenimi bakterijami vinske trte, in sicer *Agrobacterium tumefaciens*, *A. vitis* in *A. rhizogenes* tako, da smo pripravili suspenzijo čiste kulture 10^6 - 10^7 cfu/mL ter fitoplazmami Bois Noir (BN), Flavescence dorée (FD) in Aster Yellows (AY), ki smo jih ekstrahirali iz okuženih kontrolnih rastlin. Za negativno kontrolo smo uporabili ekstrakcijski pufer.

Za detekcijo *X. fastidiosa* smo uporabili protokol in set reagentov DAS ELISA (Agdia, Inc., Indiana, ZDA). V ELISA ploščico smo nanесли 100 μL posameznega vzorca v dveh paralelkah in pri izvedbi testa sledili protokolu proizvajalca.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

3.1 Bakterijski sevi in gojišča ter test indirektne imunofluorescence (IIF)

Vse bakterijske seve smo uspešno gojili v tekočih PD2 in PW gojiščih, manj uspešno pa je bilo gojenje na trdnih gojiščih. V nasprotju s trdnim gojiščem, pa v tekočem gojišču s stresanjem zagotavljamo enakomerno razporeditev hranil ter kisika, kar pozitivno vpliva na razmnoževanje bakterij, ne glede na začetno koncentracijo.

Bakterijske celice kontrolnih sevov smo uspešno opazovali pod mikroskopom s testom IIF. Celice so bile značilne ozke in podolgovate oblike in so dobro fluorescirale.

3.2 Detekcija *Xylella fastidiosa* z ELISA testom

Rezultate ELISA testa smo odčitali s spektrofotometrom pri 690 nm. Pri pozitivnih vzorcih smo zaznali močno barvno reakcijo. Z ELISA testom smo glede na pripravljeno umeritveno krivuljo v pozitivnih kontrolah določili koncentracijo najmanj 10^5 do 10^6 celic/mL, ne glede na to ali smo določali bakterije suspendirane v pufu ali mešane z ekstrakti vinske trte (ekstrakt listov, ekstrakt pecljev in žil ter vsebina žilnega sistema) oziroma ekstraktoma *C. roseus* in *N. tabacum*. Na podlagi tega smo zaključili, da način ekstrakcije ali tip tkiva ne vpliva na mejo detekcije ELISA testa. Protitelesa niso kazala navzkrižne reaktivnosti z

nobeno od testiranih bakterij iz rodu *Agrobacterium* kot tudi ne s fitoplazmami in rastlinskim tkivom *C. roseus* in *N. tabacum*.

Vpeljava PCR v realnem času kot presejalnega testa in vzpostavitev celotne sheme testiranja za detekcijo *X. fastidiosa* je v pripravi. Uvedene metode bomo uporabili na rastlinah vinske trte s sumljivimi bolezenskimi znamenji.

4 SKLEPI

- Bakterijo *Xylella fastidiosa* smo uspešno gojili v čisti kulturi v tekočem gojišču ter jo opazovali pod mikroskopom s testom indirektna imunofluorescence
- ELISA test za detekcijo *Xylella fastidiosa* je specifičen, saj protitelesa niso navzkrižno reagirala z nobeno od testiranih patogenih bakterij vinske trte, kot tudi ne z rastlinskim tkivom. Občutljivost testa je približno 10^5 do 10^6 celic/mL. Občutljivost ELISA testa se ni razlikovala glede na tip rastlinskega tkiva oziroma ekstrakta v katerem smo bakterijo določali.

5 ZAHVALA

Raziskave so bile sofinancirane preko projekta CRP (V4-0313). Iskreno se zahvaljujemo dr. Normanu W. Schaadu (United States Department of Agriculture) za pomoč pri izbiri sevov ter prispevane bakterijske seve bakterije *Xylella fastidiosa*, dr. Magdi Tušek Žnidaršič in mag. Nataši Mehle (Nacionalni inštitut za biologijo) za svetovanje pri izvedbi in interpretaciji ELISA testa in Alešu Blatniku (Nacionalni inštitut za biologijo) za pomoč pri izvedbi in analizi testa indirektna imunofluorescence.

6 LITERATURA

- Campanharo, J. C., Lemos, M. V. F., Lemos, E. 2002. Growth optimization procedures for the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Current Microbiology*, 46: 99-102
- Carbajal, D., Morano, K. A., Morano, L. D. 2004. Indirect immunofluorescence microscopy for direct detection of *Xylella fastidiosa* in xylem sap. *Current Microbiology*, 49: 372-375
- Council Directive 2000/29/EC of 8 May 2000 on protective measures against the introduction into the Community of organisms harmful to plants or plant products and against their spread within the Community (L169/1,10/07/2000)
- Direktiva sveta 2000/29/ES (UL L 169, 10.07.2000) z dne 8. maja 2000 o varstvenih ukrepih proti vnosu organizmov, škodljivih za rastline ali rastlinske proizvode, v Skupnost in proti njihovemu širjenju v Skupnost
- Francis, M., Lin, H., Rosa, J C-L., Doddapaneni, H., Civerolo, E. L. 2006. Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*. *European J. of Plant Pathology*, 115:203-213
- Francis, M., Civerolo, E. L., Bruening, G. 2008. Improved bioassay of *Xylella fastidiosa* using *Nicotiana tabacum* cultivar SR1. *Plant. Dis.*, 92, 1: 14-20
- Hewitt, W. B., Frazier, N.W., Freitag, J. H. 1942. Transmission of Pierce's disease of grapevines with a leafhopper. (Abstr.) *Phytopathology* 32:8
- Hopkins, D. L. 1981. Seasonal concentration of Pierce's disease bacterium in grapevine stems, petioles and leaf veins. *Phytopathology* 71:415-418
- Hopkins, D. L., Purcell, A. H. 2002. *Xylella fastidiosa*: cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. *Plant Dis.* 86, 1056-1066
- Normes OEPP/EPPO Standards. 2004. Diagnostic protocols for regulated pests, *Xylella fastidiosa*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 34: 187-19
- Pravilnik o ukrepih in postopkih za preprečevanje vnosa in širjenja škodljivih organizmov rastlin, rastlinskih proizvodov in nadzorovanih predmetov (Uradni list RS, št. 31/04, 142/04 in 66/07)
- Schaad, N. W., Ogenorth, D., Gaush, P. 2002. Real-time polymerase chain reaction for one-hour on-site diagnosis of Pierce's disease of grape in early season asymptomatic vines. *Phytopathology*, 92, 7: 721-728

- Schaad, N. W., Jones, J. B., Chun, W. 2000. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 3rd ed., 373p
- Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G., Fatmi, M., Chang, C-J. 2004. *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. *piercei*, subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *multiplex*, subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, subsp. nov. System. Appl. Microbiol. 27, 290-300
- Smart, C. D., Hendson, M., Guilhaert, M. R., Saunders, S., Friebertshouser, G., Purcell, A., Kirkpatrick, B. C. 1998. Seasonal detection of *Xylella fastidiosa* in grapevines with culture, ELISA and PCR. (Abstr.) Phytopathology 88(suppl.):S83
- Wells, J. M., Raju, B. C., Hung, H. Y., Weisburg, W. G., Mandeico-Paul, L., Brenner, D. J. 1987. *Xylella fastidiosa* gen. Nov., sp. Nov.: Gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. Int. J. Syst. Bacteriol. 37, 136-143