

**POMEN UPORABE RAZLIČNIH LABORATORIJSKIH METOD PRI
RUTINSKEM TESTIRANJU KARANTENSKE BAKTERIJE *RALSTONIA
SOLANACEARUM* (SMITH) SMITH**

Maja RAVNIKAR¹, Tanja DREO², Mateja GRUM³, Aleš BLATNIK⁴, Romana
MARINŠEK-LOGAR⁵, Gorazd AVGUŠTIN⁶, Andrej POTOČNIK⁷, Nataša PETROVIČ⁸

^{1,2,3,4,8}Nacionalni inštitut za biologijo,

^{5,6} Biotehniška Fakulteta, Oddelek za zootehniko, Inštitut za mikrobiologijo in mikrobno
biotehnologijo, ⁷IRSKGLR, Fitosanitarna inšpekcija, Enota Jesenice

IZVLEČEK

Da bi preprečili vnos in širjenje karantenske fitopatogene bakterije, povzročiteljice rjave gnilobe krompirjevih gomoljev (*Ralstonia solanacearum* (Smith) Smith), smo razvili shemo za rutinsko laboratorijsko testiranje semenskega in jedilnega krompirja, ki dopolnjuje vizualne preglede gomoljev in rastlin krompirja ob uvozu ali med rastjo na polju. V postopku laboratorijskega testiranja uporabljamo vse metode, ki jih predpisuje organizacija EPPO. Uvedene standardne metode zajemajo serološke tehnike kot sta ELISA in IF, gojenje bakterij na polselektivnih in neselektivnih bakterijskih gojiščih in uporabo paradižnika in jajčevca kot testnih rastlin. Kot dopolnilo k hitrejšemu in zanesljivejšemu potrjevanju rezultatov pa smo uvedli tudi določitev bakterijske DNA s testom PCR in določitev profila maščobnih kislin z uporabo plinske kromatografije.

Ključne besede: določanje, laboratorijske metode, rastlinske patogene bakterije, rjava gniloba krompirjevih gomoljev

ABSTRACT

**IMPORTANCE OF USE DIFFERENT LABORATORY METHODS IN ROUTINE
TESTING OF POTATO BROWN ROT (*RALSTONIA SOLANACEARUM* (SMITH)
SMITH)**

In order to prevent the introduction and spread of quarantine phytopathogenic bacteria causal agent of potato brown rot in Slovenia, we have developed a routine laboratory testing scheme, for seed and ware potato, which complete visual inspection of potato tubers and plants at sites of import as well as in the fields. In laboratory testing procedure all methods recommended by EPPO are used. Applied standard methods include serological techniques as ELISA and IF, growth of bacteria on semiselective and nonselective nutrient media and use of tomato and eggplant as test plants. For quicker and more reliable confirmation of results, detection of bacterial DNA with PCR and determination of fatty acid profil with gas chromatography were introduced.

Key words: detection, laboratory methods, plant pathogenic bacteria, potato brown rot

¹ doc. dr. biol. znan., SI-1001 Ljubljana, Večna pot 111

² študentka mikrobiol., prav tam

³ mag., dipl. biol., prav tam

⁴ tehn. sod., prav tam

⁵ asist., dr. biol. znan., SI-1230 Domazale, Groblje 3

⁶ doc. dr. biol. znan., prav tam

⁷ mag., dipl. ing. kmet., SI-4270 Jesenice, Titova 18

⁸ dr. biol. znan., SI-1001 Ljubljana, Večna pot 111

1 UVOD

Bakterija, povzročiteljica rjave gnilobe gomoljev krompirja, *Ralstonia solanacearum* (Smith) Smith, je že dolgo zastopana v Evropi, vendar so do leta 1994 poročali le o posameznih pojavih bolezni na krompirju. Po letu 1994 pa je izbruhnila okužba na paradižniku v Franciji, kasneje pa še na krompirju v Italiji, na Portugalskem in Španiji. Leta 1995 so ugotovili epidemijo na krompirju na Nizozemskem, leto kasneje pa še v Angliji (EPPO Reporting service No. 6, 1997). V Sloveniji je še nismo našli, intenzivni pregledi skupaj z laboratorijskim testiranjem pa potekajo od zime 96/97.

Bakterija okužuje poleg rastlin, pri katerih povzroča močna in jasna bolezenska znamenja kot so krompir, paradižnik in jajčevce, tudi grenkoslad (*Solanum dulcamara*). V rastlinah grenkoslada se bakterija nahaja ves čas v latentni obliki, torej ne povzroča vidnih znamenj okužbe, ker pa je to rastlina, ki naseljuje vodotoke tako rekoč po vsej Evropi, zastopana je tudi v Sloveniji, je izredno nevaren vir okužb. Bakterije prezimijo v grenkosladu in se v pomladnih in poletnih mesecih sproščajo v vodotoke v velikem številu. Ta način širjenja predstavlja veliko nevarnost zlasti v predelih kjer polja namakajo. V Sloveniji je zlasti ogroženo Dravsko polje, Prekmurje in predeli na Primorskem. Primarni način širjenja bakterije poteka predvsem prek sadilnega materiala – semenski krompir, v katerem se bakterija lahko nahaja v latentni obliki. Prav tako pa se bakterija lahko prenaša z strojnim obdelovanjem, torej mehansko, z okuženimi tlemi, zlasti če zimske temperature ne ostanejo dlje časa pod lediščem, z gospodinjstskimi in industrijskimi odpadki predelave krompirja in kakor je že omenjeno z namakanjem. Glavni ukrepi zatiranja so predvsem pregled in ugotavljanje okuženosti na poljih in v gomoljih semenskega in jedilnega krompirja, pregled okuženosti rastlin grenkoslada in površinskih voda.

Ker v Sloveniji ta nevarna bakterija, uvrščena v Evropsko AII listo karantenskih organizmov še ni bila ugotovljena, smo razvili shemo laboratorijskega določanja bakterije v gomoljih semenskega in jedilnega krompirja, ki nam pomaga pri preprečevanju vnosa in širjenja bakterije v Sloveniji. Ugotavljanje okuženosti na terenu vodi Služba za varstvo rastlin pri Ministrstvu za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, skupaj z Inšpektoratom Republike Slovenije, Fitosanitarno enoto in ob pomoči strokovnjakov Kmetijskega inštituta Slovenije. Za vzorce gomoljev, ki jih sodelavci omenjenih inštitucij dostavijo na Nacionalni inštitut za biologijo smo razvili laboratorijsko shemo testiranja, ki sledi navodilom EPPO.

Namen tega prispevka je predvsem razložiti pomen uporabe posameznih laboratorijskih tehnik v shemi testiranja *Ralstonia solanacearum* (Smith) Smith.

2 MATERIALI IN METODE

Za ugotovitev latentnih okužb bakterije, povzročiteljice rjave gnilobe gomoljev krompirja *Ralstonia solanacearum* (Smith) Smith, (v nadaljevanju uporabljamo kratico Rs), v gomoljih krompirja, smo razvili shemo laboratorijskega testiranja, ki je uporabna za obdelavo velikega števila vzorcev (Ravnikar, 1998). Pri tem smo upoštevali navodila EPPO (EPPO Legislation (1997) L 273, Vol. 40). Iz 200 gomoljev izrežemo hilum – popek gomolja, kjer je koncentracija bakterij če so zastopane, največja, in z maceracijo in zaporednimi centrifugiranjmi pripravimo bakterijsko zgoščino. V nadaljnjih testiranjih uporabimo serološki tehniki ELISA in IF kot prvi pregledni testni metodi, poleg tega pa tudi razmaz bakterijske zgoščine na polselektivno gojišče SMSA. Poleg tega gojišča v nadaljevanju testiranj uporabljamo še dve gojišči, pri katerih opazujemo specifično morfologijo kolonij, to sta SPA in TSBA gojišči.

Če uspe izolacija čiste kulture na gojišču, lahko uporabimo metodo določanja profila maščobnih kislin s plinsko kromatografijo. Bakterije izoliramo po postopku opisanem v Stead (1992). PCR s katerim dokazujemo DNK bakterije lahko izvedemo na zgoščini bakterij ali z uporabo izolirane bakterije na gojišču.

Za specifično DNA pomnoževanje bakterije Rs v vzorcih uporabljamo nespecifično lovko Y2 (5'CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT3' (Young *et al.*, 1991) skupaj s specifično lovko OL11 (5'GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC3') (Seal *et al.*, 1993). PCR proceduro izvedemo po opisu Seala in avtorjev (1993).

3 REZULTATI IN DISKUSIJA

Kot prvi pregledni testni metodi uporabimo serološki tehniki ELISA ali IF (imunofluorescenčna mikroskopija), poleg tega pa tudi razmaz bakterijske zgoščine na polselektivno gojišče SMSA, bakterije vcepimo tudi v tekoče gojišče SMSA. Slednje služi za obogatitev števila bakterij v vzorec in hkrati za razredčitev inhibitorjev soka gomoljev, ki so lahko zastopani v pripravljenem koncentratu vzorca. To je posebej pomembno za rezultate testov ELISA in PCR, saj lahko pri teh testih prihaja v postopku do inhibicijske reakcije zaradi zastopanosti inhibitorjev. Po dveh dneh pregledamo rast na gojiščih in prenesemo bakterijske kolonije, ki so morfološko podobne bakteriji Rs na tri gojišča (SMSA, SPA in TSBA), na katerih bakterija raste s tipično morfologijo. V primeru, da ni rasti na gojiščih, oziroma, da so rezultati seroloških testiranj negativni, štejemo vzorec kot negativen. V primeru da je serološki test pozitiven ali da se na vseh treh gojiščih razvijejo kolonije s tipično morfologijo, nadaljujemo s testiranjem. Najprej moramo okužiti testne rastline paradiznika ali jajčevcev v katerih se bakterija selektivno razmnožuje. Če je bila bakterija, ki je reagirala s protitelesi res *Ralstonia solanacearum* se bodo v štirih tednih gojenja izrazili simptomi v obliki venenja in nato odmiranja rastlin. Če je bila v izvornem vzorec bakterija zastopana v zelo nizki koncentraciji, se bo verjetno namnožila v rastlinah brez vidnih znamenj okužbe, zato moramo tudi take rastline uporabiti na koncu poskusa za izolacijo bakterij na gojišče in pripravo potrditvenega testa. Za potrditveni test lahko uporabimo IF, PCR ali profil maščobnih kislin.

Med vsemi uporabljenimi metodami je uporaba polselektivnega trdnega gojišča SMSA najobčutljivejša metoda za dokazovanje bakterije *Ralstonia solanacearum* v zgoščini bakterij izoliranih iz popkov gomoljev krompirja. Ugotovimo lahko tudi do 10 bakterij v koncentratu vzorca. Le nekoliko nižjo občutljivost lahko dosežemo z uporabo pomnoževanja DNA s PCR, vendar le, če uporabljamo predhodno obogatitev vzorca na tekočem SMSA gojišču (Elphinstone *et al.*, 1996). Avtorji navajajo, da pri nekaterih sortah krompirja lahko inhibitorji v soku gomoljev inhibirajo reakcijo, tako da dobimo lažno negativen rezultat, zato metoda ni ustrezna za uporabo kot prvi pregledni test, je pa izjemno ustrezna za dokazovanje čiste kulture, saj so lovke ki temeljijo na oligonukleotidih Rs 16S ribosomalne DNA zelo specifične. PCR test lahko uporabimo kot edini specifični potrditveni test tudi v primeru, da so bakterije v vzorec mrtve. V tem primeru bomo dobili pozitiven rezultat pri serološki reakciji, vendar bakterija ne bo zrasla na gojišču, niti se ne bo razmnožila v testnih rastlinah.

Za razliko od drugih testov, pa lahko določanje profila maščobnih kislin poteka le z uporabo čiste bakterijske kulture iz katere izoliramo maščobne kisline. Rezultat analize profila maščobnih kislin temelji v našem primeru na uporabi kontrolne bakterije in nekaterih bakterij, ki imajo zelo podoben profil maščobnih kislin. Na podlagi standarda in primerjave s kontrolno bakterijo ugotovimo za preiskovani vzorec ali so prisotne vse

specifične maščobne kisline in če je med njimi ustrezno razmerje velikosti. Čitanje kromatograma je dokaj zahtevno, ker nimamo na voljo računalniškega MIDI sistema, ki vsebuje knjižnico podatkov do sedaj pregledanih bakterij, ki bi seveda zelo olajšal delo v prihodnje na večjem številu vzorcev in na drugih bakterijah.

4 SKLEPI

Serološke metode še posebno v kombinaciji z uporabo polselektivnih in drugih izbranih gojišč so najustreznejše v začetni fazi testiranja vzorcev, pripravljenih iz gomoljev krompirja na latentno ukužbo z bakterijo, povzročiteljico rjave gnilobe krompirjevih gomoljev *Ralstonia solanacearum* (Smith) Smith. Za zanesljivo potrjevanje dobljenih pozitivnih rezultatov pa uporabljamo poleg testnih rastlin paradižnika ali jajčevca še pomnoževanje ciljne DNA bakterije s PCR in določanje profila maščobnih kislin s plinsko kromatografijo. Pri teh testih ne prihaja do križnih reakcij z dosedaj znanimi bakterijami, ki povzročajo križne reakcije pri seroloških testih, zato so izjemno pomemben del sheme za dokazovanje bakterije *Ralstonia solanacearum*, tako pri rutinskem testiranju gomoljev na latentne okužbe, kakor tudi pri dokazovanju bakterije v rastlinah, ki kažejo vidna znamenja okužbe.

5 LITERATURA

- Elphinstone J. G. / Hennessy J. / Wilson J. K. / Stead D. E. (1996): Sensitivity of different methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts.- Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 26, 663-678.
- Ravnikar M. (1998): Rutinsko testiranje rastlinskih patogenih bakterij.- Sodobno kmetijstvo 10 (31), 469-472.
- Seal S. E. / Jackson L. A. / Young J. P. W. / Daniels M. J. (1993): Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pocketti* and the Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction.- Journal of General Microbiology, 139, 1587-1594.
- Stead D. (1992): Grouping plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles. - Int. J. Syst. Bacteriol., 42(2), 281-295.
- Young K. P. W. / Downer H. L. / Eardly B. D. (1991): Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTA11 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. - Journal of Bacteriology 173, 2271-2277.