

DOLOČANJE IN IDENTIFIKACIJA BAKTERIJE *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* V OKUŽENI HRUŠKI

Dejan ŠTEBIH¹, Tanja DREO², Tina DEMŠAR³, Aleš BLATNIK⁴, Nataša PETROVIČ⁵,
Maja RAVNIKAR⁶

^{1,2,3,4,5,6} Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo
¹ trenutni naslov: Omega d.o.o.

IZVLEČEK

V okviru sistematičnega nadzora rastlin, ki ga vodi Uprava RS za varstvo rastlin in semenarstvo, izvajamo na Nacionalnem inštitutu za biologijo laboratorijsko diagnostiko povzročitelje bakterijskega hruševega ožiga, bakterije *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* Pogosto prispejo vzorci z značilnimi bolezenskimi znamenji, ki pa jih lahko povzročijo drugi povzročitelji bolezni, kot na primer bakterija *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, ki smo jo v preteklosti že nekajkrat identificirali.

V letu 2001 smo v vzorcu hruške z bolezenskimi znamenji, značilnimi za bakterijski hrušev ožig, določili bakterijo *Erwinia amylovora*. To je bil prvi primer najdbe hruševega ožiga v Sloveniji. Na okuženem materialu smo uporabili različne metode, ki jih je možno uporabljati za določanje bakterije *Erwinia amylovora* in sicer na poganjkih z bolezenskimi znamenji in na poganjkih brez njih.

Za določanje bakterije *Erwinia amylovora* smo uporabili uveljavljene metode določanja te bakterije: izolacija na gojišču (KB, NSA), test patogenosti na rezinah hrušk. Od seroloških metod smo izvedli test indirektno imunofluorescence (IIF), od molekularnih pa test PCR z različnimi pari začetnih oligonukleotidov. Izolirano bakterijo smo poslali v potrditev z analizo profila maščobnih kislin v Plant Protection Service v Wageningen na Nizozemskem.

Po pričakovanju smo s testom IIF določili bakterijo v vseh vzorcih, ki so kazali bolezenska znamenja in v katerih je koncentracija bakterij velika. Bakterijo smo s tem testom dokazali tudi v poganjkih nabranih na okuženem drevesu, ki niso kazali znamenj bolezni. Ostali testi niso dajali tako zanesljivih rezultatov, še zlasti pri latentno okuženih vzorcih. Ugotovili smo, da izolacija z DNeasy™ Tissue Kit-om zmanjša učinek inhibitorjev PCR reakcije v vzorcu v primerjavi z ekstraktom pripravljenim s kuhanjem, kar je zlasti pomembno pri nizki koncentraciji bakterij. Potrdili smo pravilnost uporabe kombinacije različnih metod za določanje bakterije *Erwinia amylovora*.

Ključne besede: bakterijski hrušev ožig, detekcija, *Erwinia amylovora*, hruška, PCR

ABSTRACT

DETECTION AND IDENTIFICATION OF *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* IN INFECTED PEAR TREE

In the frame of systematic survey, conducted by official plant protection service in Slovenia, National Institute of Biology performs laboratory diagnosis of bacteria *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.*, the causal agent of fire blight. Frequently, samples with characteristic symptoms arrive to the laboratory. However, similar symptoms can be caused by other plant pathogens such as *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* which has already been demonstrated in the past.

In 2001, *Erwinia amylovora* was detected in a pear sample with symptoms of fire blight for the first time in Slovenia. Different methods that can be used for detection of *Erwinia amylovora* were used on infected material with and without symptoms.

¹ univ. dipl. biol., Dolinškova 8, SI-1000 Ljubljana

² univ. dipl. mikrobiol., Večna pot 111, SI-1001 Ljubljana

³ univ. dipl. biol., prav tam

⁴ tehn. sod., prav tam

⁵ dr. biol. znan., prav tam

⁶ prof. dr. biol. znan., prav tam

Isolation on media (KB, NSA), pathogenicity test on pear slices, indirect immunofluorescence (IIF), agglutination test and PCR with different sets of primers were performed. Isolated bacteria were sent for confirmation with analysis of fatty acids profile to Plant Protection Service in Wageningen, the Netherlands.

As expected, *Erwinia amylovora* was detected with IIF test in all samples with symptoms, where concentration of bacteria is high but also in asymptomatic samples with lower concentration of bacteria that have been collected from the same pear tree. Other tests were less reliable particularly in case of latent infection. We established, that the DNA extraction using DNeasy™ Tissue Kit reduces inhibition in PCR reaction compared to extraction by boiling of the sample. Avoiding inhibition is essential, particularly when the concentration of bacteria in sample is low. For reliable and accurate laboratory determination of *Erwinia amylovora*, the use of several properly combined detection methods is recommended.

Key words: detection, *Erwinia amylovora*, fire blight, PCR, pear

1 UVOD

Bakterijski hrušev ožig je karantenska bolezen sadnega drevja in nekaterih okrasnih rastlin. Povzročajo jo bakterija *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* Bakterija izvira iz Severne Amerike in se od druge polovice 20. stoletja širi tudi po Evropi. Slovenija, Evropska Unija in EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organisation) jo uvrščajo na A2 listo karantenskih škodljivih organizmov. Leta 2001 se je bolezen pojavila tudi v Sloveniji.

Večina gostiteljskih vrst bakterije *E. amylovora* spada v poddružino *Maloideae* družine *Rosaceae*. Med najpomembnejše gostitelje sodijo vrste iz rodov hrušk (*Pyrus*), jablan (*Malus*), gloga (*Crataegus*), jerebika (*Sorbus*), panešplje (*Cotoneaster*), kutine (*Cydonia*), šmarne hrušice (*Amelanchier*) in ognjenega trna (*Pyracantha*).

Bolezen je dobila ime po bolezenskih znamenjih, ker okuženi deli običajno potemni. Okuženi cvetovi, ki so glavno mesto vstopa bakterije v rastlino, ovenijo, se zvijejo in potemni in ostanejo pritrjeni na rastlino. Podobna bolezenska znamenja se razvijejo tudi na poganjkih in listih na njih, ki običajno ovenijo, se posušijo in počrni (pri hruškah) oz. porjavijo (pri jablanah). Vrh poganjka se pogosto ukrivi v značilno obliko, podobno vrhu pastirske palice. Rastlina se lahko okuži tudi skozi liste, kamor bakterije vstopijo skozi listne reže oz. bolj pogosto skozi rane, ki jih povzročijo žuželke, toča in veter. Ob okužbi najprej počrni osrednja žila in pecelj, listi pa ostanejo pritrjeni na vejo. Plodovi se lahko okužijo skozi naravne odprtine, pecelj ali poškodbe na površju, še posebej po toči. Okužen plod najprej potemni, se naguba, mumificira in podobno kot list ostane pritrjen na vejo. Ob okužbi se na vejah pojavijo razjede, v katerih bakterije prezimijo. Spomladi se iz njih cedi izcedek jantarne barve, ki ga žuželke, ptice in dež širijo na druge dele drevesa ter na sosednje rastline. Bakterijski izcedek se prav tako pogosto pojavlja na okuženih cvetovih, listih in plodovih. Nekatera od bolezenskih znamenj so podobna kot pri drugih povzročiteljih boleznih, kot so glive *Nectria cinnabarina*, *Nectria galligena*, *Phomopsis tanake*, hrošč *Polycaon confertus* in bakterija *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

Za določanje povzročiteljev boleznih so na voljo številne klasične, serološke in molekularne metode. Za določanje bakterije *E. amylovora* od klasičnih metod uporabljamo izolacijo na gojiščih King B in NSA, test patogenosti na rezinah hrušk in biokemijski test API 20 E. Rezine hrušk smo preizkusili kot sistem za namnožitev bakterij, ki bi jih nato izolirali z uporabo gojišč. Test indirektna imunofluorescence (IIF), kjer se specifična primarna protitelesa vežejo na bakterije, na primarna pa z barvilom označena sekundarna protitelesa, spada v skupino seroloških tehnik. Od molekularnih metod uporabljamo test verižne reakcije s polimerazo (PCR) z različnimi pari začetnih oligonukleotidov (Demšar *et al.*, 2001).

V okviru sistematičnega nadzora bakterije *E. amylovora*, ki ga vodi Uprava RS za varstvo rastlin in semenarstvo, smo poleti leta 2001 prejeli vzorec hruške z bolezenskimi znamenji, značilnimi za bakterijski hrušev ožig. Test IIF, izolacija na gojiščih, test patogenosti, API 20 E test in reizolacija iz rezin hrušk so potrdili okužbo z bakterijo *E. amylovora*. Izolati bakterij so bili poslani v verifikacijo v Plant Protection Service, Wageningen na Nizozemskem. Tam so s testi tvorbe levana na gojišču s sorbitolom, testom aglutinacije, testom IIF in testom profila maščobnih kislin potrdili bakterijo *E. amylovora*. Ob ponovnem vzorčenju z istega drevesa so bile nabrane veje z znamenji boleznin in brez njih, uporabili pa smo jih za primerjavo zanesljivosti različnih metod pri določanju okužbe z bakterijo *E. amylovora*.

2 MATERIAL IN METODE

Na vejicah z znamenji boleznin smo opazili razjede, počrneli vrh vejice, posušene liste pod vrhom vejice in marmorirano tkivo pod lubjem. Površino na meji med zdravim in obolelim tkivom smo sterilizirali s 70% etanolom, odvzeli koščke tkiva in jih 1,5 ure inkubirali v 4,5 ml pufra PBS (vzorec A).

Vejice brez znamenj boleznin smo razdelili na dva dela, od prvega smo koščke tkiva odvzeli kot pri vzorcu A (vzorec B), vejice drugega dela pa razrezali na približno 120, 1 cm velikih koščkov ter jih 1,5 ure pri sobni temperaturi stresali v 60 ml pufra PBS. Vzorec smo nato 10 min centrifugirali pri 4500 rpm (3000 g), supernatant prelili in ponovno centrifugirali 10 min pri 10000 rpm (14700 g). Supernatant smo odstranili, usedlino pa resuspendirali v 1 ml pufra PBS (vzorec C).

10 µl ekstrakta vzorcev A in B smo nanесли na gojišča King B in NSA, 10 µl ekstrakta vzorca C pa na gojišče NSA z dodanim cikloheksimidom. Gojišča smo inkubirali tri dni na 28°C in sumljive kolonije preceppljali na gojišča NSA in King B ter opazovali morfolgijo kolonij. Test IIF smo izvedli na neredčenih in 10^{-1} do 10^{-3} redčenih ekstraktih ter suspenzijah izolatov. Za test aglutinacije smo protitelesa redčili 1:10 in jih 10 µl zmešali z 100 µl ekstrakta. Za obogatitev na rezinah hrušk smo na le-te nanесли 100 µl, oz. 10 µl v primeru vzorca C, ekstrakta in jih inkubirali na 28°C. Iz rezin hrušk smo naredili ekstrakcijo in poskušali izolirati bakterijo z razmazovanjem nastalih suspenzij in ekstrakta tkiva na gojišče NSA. Za test patogenosti smo na rezine hrušk nanесли suspenzije sumljivih kolonij, opazovali razvoj belkastih kapljic na površju ter bakterijo reizolirali z razmazovanjem s cepilno zanko in z ekstrakcijo tkiva na gojišče NSA.

Za test PCR smo DNA bakterij vzorcev A in B izolirali na tri načine:

- 1) 10 µl ekstrakta smo razredčili v 100 µl sterilne bidestilirane vode, segrevali 5 min na 95°C, 10 min ohlajali na ledu, centrifugirali 1 min pri 7000 rpm (5200 g) ter supernatant prenesli v svežo mikrocentrifugirko;
- 2) 1 ml ekstrakta smo 10 min centrifugirali pri 10000 rpm (14700 g), supernatant zavrgli, usedlino pa resuspendirali v 500 µl pufra PBS. 10 µl suspenzije smo nato redčili v 100 µl sterilne bidestilirane vode in nadaljevali kot v primeru 2);
- 3) DNA smo izolirali s kompletom za izolacijo DNA DNeasy™ Tissue Kit. Uporabili smo 2 ml ekstrakta.

Iz vzorca C smo DNA izolirali le po postopku 2.

Za identifikacijo smo uporabili štiri pare začetnih oligonukleotidov: 1A/2B (Bereswill *et al.*, 1992), AJ75/AJ76 (McManus in Jones, 1995), ki smo jih uporabili samostojno in v vgnezdene verižne reakciji s polimerazo (nested PCR), kjer smo pomnoževali produkte PCR, dobljene z začetnimi oligonukleotidi 1A/2B, začetne oligonukleotide Ea71(1)/Ea71(2) (Guilford *et al.*, 1996) ter začetne oligonukleotide 16SF/16SR (Jeng *et al.*, 1999), kjer smo dobljene fragmente DNA razrezali z restrikcijskim encimom *EcoR1* (metoda polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov, RFLP). Produkte smo analizirali z agarozno elektroforezo.

Kot pozitivno kontrolo smo uporabili tipski izolat bakterije *Erwinia amylovora* (NCPFB 683).

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Preglednica 1: Rezultati testov za določanje bakterije *E. amylovora* v vzorcih iz okužene hruške
Table 1: Results of tests for identification of bacteria *E. amylovora* from samples from infected pear tree

Vzorec	Izolacija na gojiščih	IIF	Obogatitev na rezinah hrušk in reizolacija	Test patogenosti in reizolacija	PCR
A	+	+	-	+	Pos. 1 + ^a Pos. 2 + Pos. 3 +
B	-	-	-	-	Pos. 1 - Pos. 2 - Pos. 3 + ^b
C	+	+	-	+	Pos. 2 -

A izolacija iz vejic z znamenji bolezn, ~ 1 gram tkiva

B izolacija iz vejic brez znamenj bolezn, ~ 1 gram tkiva

C izolacija iz vejic brez znamenj bolezn, 120 koščkov vejic (dolžine 1 cm)

a, b: Test PCR je bil pozitiven le v primeru vgnezdene verižne reakcije s polimerazo

Test izolacije na gojiščih in test IIF sta se izkazala kot najbolj občutljiva. Na gojiščih se je pojavljala bakterija *Erwinia herbicola*, ki je precej pogosta v vzorcih sadnega drevja in inhibira rast bakterije *E. amylovora*. Zaradi zastopanosti bakterije *E. herbicola*, ki lahko preraste bakterijo *E. amylovora* in jo zato lahko spregledamo, testa izolacije na gojiščih ne moremo uporabljati kot edinega presejalnega testa, saj bi zaradi zanesljivosti morali vsak posamezen vzorec redčiti do posameznih kolonij, kar pa ni praktično. Zato za presejalni test uporabljamo test IIF, ki ima podobno občutljivost. Obogatitev na rezinah hrušk ni selektivna, ker se precej namnožijo ostale bakterije. Selektivnost se ne izboljša z reizolacijo iz rezin in nanosom na gojišča, zato je test uporaben le v postopku potrjevanja izolirane bakterije kot test patogenosti. Test PCR je ustrezen za določanje bakterije *E. amylovora* iz vzorcev z bolezenskimi znamenji in za potrjevanje izolatov. Za določanje v vzorcih brez znamenj bolezn je potrebno uporabiti vgnezdene verižne reakcije s polimerazo, s čimer povečamo občutljivost PCR testa ter izolacijo DNA s kompletom DNeasy™ Tissue Kit, da odstranimo inhibitorje PCR reakcije. Bakterijo lahko tudi predhodno namnožimo na gojišču in jo s testom PCR potrjujemo.

4 SKLEPI

Od preizkušenih metod sta bili najbolj občutljivi metodi izolacije na gojiščih in test IIF, ki je tudi uporaben kot presejalni test tako za vzorce z bolezenskimi znamenji, kot za vzorce brez njih, vendar mora biti ekstrakcija bakterij iz rastlinskega tkiva narejena iz večje količine rastlinskega materiala, kot je to predvideno za testiranje latentnih okužb. Test PCR je bolj ustrezen za določanje bakterije *E. amylovora* iz vzorcev z bolezenskimi znamenji ter kot potrditveni test na izoliranih kulturah. Kot potrditveni test je uporaben tudi test patogenosti na rezinah hrušk. Kombinacija različnih metod omogoča zanesljivo določitev bakterije *E. amylovora* tako v vzorcih z bolezenskimi znamenji kot v vzorcih brez njih.

5 ZAHVALA

Zahvaljujemo se Upravi RS za varstvo rastlin in semenarstvo, MKGP, fitosanitarnim inšpektorjem Inšpektorata RS za kmetijstvo, gozdarstvo, lovstvo in ribištvo ter mag. Urši Pečar, Kmetijski inštitut Slovenije, za posredovane vzorce.

6 LITERATURA

- Bereswil, S., Pahl, A., Bellemann, P., Zeller, W., Geider, K. 1992. Sensitive and Species Specific Detection of *Erwinia amylovora* by Polymerase Chain Reaction Analysis. Applied and Environmental Microbiology, 58, 11: 3522-3526.
- Demšar, T., Petrovič, N., Štebih, D., Dreo, T., Blatnik, A., Ravnikar, M. 2001. Uporaba molekularnih metod za določanje fitopatogenih bakterij na primeru *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* V: Dobrovoljc, D., Urek, G. (ur.). Zbornik predavanj in referatov s 5. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Čatež ob Savi, 6.-8. marec 2001. Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin, 2001: 197-202.
- Guilford, P. J., Taylor, R. K., Clark, R. G., Hale, C. N., Forster, R. L. S. 1996. PCR-Based Techniques for the Detection of *Erwinia amylovora*. Acta Horticulturae, 411: 53-56.
- Jeng, R. S., Beliaeva, L., Hubbes, M., Svircev, A. M., Myers, A. L. 1999. The use of 16S and 16S-23S rRNA internal transcribed spacers to detect and differentiate *Erwinia amylovora*. V: Momol, M. T., Saygili, H. (ur.). Proc. of the 8th Int. Workshop on Fire Blight, Acta Horticulturae 489: 49-54.
- McManus, P. S., Jones, A. L. 1995. Detection of *Erwinia amylovora* by Nested PCR and PCR-Dot-Blot and Reverse-Blot Hybridizations. Phytopathology, 85, 5: 618-623.
- Van der Zwet, T. Beer, S. V. 1995. Fire Blight – Its Nature, Prevention, and Control. A Practical Guide to Integrated Disease Management. Agriculture Information Bulletin, 631, United States Department of Agriculture.
- Bereswil, S., Jock, S., Bellemann, P., Geider, K. 1998. Identification of *Erwinia amylovora* by Growth Morphology on Agar Containing Copper Sulfate and by Capsule Staining with Lecitin. Plant Disease, 82: 152-164.