

POMEN PRESEJALNIH TESTOV PRI DOLO ANJU BAKTERIJ IZ RODU *Xanthomonas* V SEMENIH FIŽOLA

Manca PIRC¹, Maja RAVNIKAR², Tanja DREO³

^{1,2,3}Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo,
Ljubljana

IZVLE EK

Navadna bakterijska pegavost fižola, ki jo povzro a bakterija *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xaph*), je ena od bolezni v pridelavi fižola, ki lahko ob utno zmanjša pridelek. Okuženo seme je najpomembnejši vir teh bakterij, zato je testiranje semena in uporaba le zdravega semena klju ni del obvladovanja bolezni. Medtem ko so se molekularne metode uveljavile za dolo anje bakterij v vzorcih rastlin, je njihova uporaba v testiranju semena kljub hitrosti manj razširjena. V prispevku navajamo naše izkušnje z izolacijo bakterij na gojiš ih kot presejalnim testom ter prednosti in slabosti uporabe molekularnih presejalnih metod, kot je npr. PCR v realnem asu v primerjavi z drugimi metodami, kot so izolacija na gojiš ih in serološkimi metodami.

Klju ne besede: testiranje semen, presejalne metode, gojiš a, PCR v realnem asu

ABSTRACT

THE IMPORTANCE OF THE SCREENING TESTS IN BEAN SEED TESTING ON THE PRESENCE OF BACTERIA FROM THE GENUS *Xanthomonas*

Common bacterial blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xaph*) is one of the major diseases in bean production with infected seeds representing the major source of infection and seed testing and use of healthy seeds is crucial for disease management. While molecular methods are commonly used for detection of bacteria in plant samples, their use in seed testing is less prevalent. Here, we describe our experiences with isolation on media as a screening test in bean seed testing and the advantages and disadvantages of molecular method e.g. real-time PCR in comparison with isolation on media and serological methods.

Key words: seed testing, screening tests, plating, real time PCR, testing time, identification tests

1 UVOD

Pri bakterijskih boleznih, ki se prenašajo s semenom, so ta pogosto najpomembnejši dejavnik za njihovo pojavljanje in širjenje. Ob odsotnosti ustreznega kemi nega varstva je poleg toplotne in kemi ne obdelave semena, zagotavljanje zdravega semenskega materiala najpomembnejši ukrep prepre evanja s semenom prenosljivih bakterijskih bolezni rastlin. Okužba semena je le izjemoma vidna s prostim o esom, hkrati pa lahko že izredno nizka stopnja okuženosti pozneje na njivi privede do mo nega pojava bolezenskih znamenj (EFSA, 2014). Za zaznavanje bakterij in drugih škodljivih organizmov v semenu zato uporabljamo

¹ dr., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana, e-mail: manca.pirc@nib.si

² prof., dr. biol. znan., prav tam

³ dr. bioteh. znan., prav tam

razli ne laboratorijske diagnostične teste. Smernice za testiranje semen oblikujejo organizacije, kot so International Seed Testing Association (ISTA), International Seed Federation (ISF), določene postopke pa tudi European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). Za preverjanje zdravstvenega stanja fižola imamo na Nacionalnem inštitutu za biologijo že mnogo let vpeljane metode za določanje bakterije *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xaph*).

Metode, ki jih izvajamo, so povzete po standardu ISTA 7-021 (2014). Glede na najnovejša strokovna in znanstvena dognanja jih dopolnjujemo z modificiranimi identifikacijskimi testi, npr. z določanjem rtingov kod DNA (Parkinson in sod., 2007). Presejalni test, torej test, ki ga izvajamo na vseh vzorcih in s katerim v prvem koraku izločimo negativne vzorce, temelji na nanašanju ekstraktov, pripravljenih iz semen, na delno selektivna in splošna gojišča (XCP1, MT in Wilbrink), ki imajo mnoge prednosti, vendar so osnovno izredno zahtevna metoda.

Zanesljivost in kakovost presejalnega testa je ključna za zmanjšanje tveganja tako lažno pozitivnih kot tudi lažno negativnih rezultatov testiranja. V prispevku primerjamo uporabo presejalnih testov, ki temeljijo na dveh različnih principih ter naše izkušnje z njimi: nanos ekstraktov iz semen na splošna in delno selektivna gojišča, ki je najpogostejše priporočena metoda za analizo semen, ter molekularno metodo PCR v realnem času.

2 REZULTATI IN RAZPRAVA

2.1 Izolacija na gojiščih, identifikacija bakterij in potrjevanje njihove patogenosti

Presejalni test izolacije na gojiščih je najstarejši pristop določanja bakterijskih boleznih rastlin. Ekstrakte, pripravljene iz semen fižola, nanašamo na delno selektivna in splošna gojišča. Delno selektivna gojišča vsebujejo snovi (npr. antibiotike), ki vsaj deloma preprečujejo ali zavirajo rast drugih, netarjih bakterij, ki so prisotne na in v semenu, medtem ko je njihov vpliv na tarjno bakterijo manjši. Z uporabo delno selektivnih gojišč povečamo možnost izolacije bakterij *Xanthomonas* iz semen fižola, vendar je število netarjih bakterij in običajno tudi gliv, ki jih opazimo na gojiščih, še vedno lahko veliko. Gojišča inkubiramo v ustreznih razmerah (temperaturi 25 °C in povišani relativni zračni vlažnosti).

Žive bakterije, ki so sposobne rasti na gojiščih, po določenem času oblikujejo kolonije, ki so vidne s prostim očesom in se glede na vrsto lahko razlikujejo po morfologiji (barvi, velikosti, obliki, robu, vlažnosti, hrapavosti idr.). Navadno na gojiščih poleg iskanih bakterij zrastejo mnoge druge, ki jih od tarjih poskušamo razlikovati po morfologiji. Bakterije iz rodu *Xanthomonas* na splošnih gojiščih večinoma oblikujejo okrogle, vlažne, rumeno obarvane kolonije (posledica pigmentov ksantomonadinov), vendar se lahko izolati iste vrste med sabo tudi precej razlikujejo, kar otežuje izbor kolonij za nadaljnja testiranja, še posebej, kadar so prisotne druge, netarjne bakterije s podobno morfologijo. Zaradi pogoste prisotnosti morfološko podobnih drugih bakterij, večinoma postopkov za testiranje semen priporočamo izbor 10 in več kolonij za nadaljnjo identifikacijo, kar lahko poveča stroške analiz.

Pri semenih je nivo okužbe z bakterijo *Xaph* navadno nizek, zato lahko prisotnost ostalih mikrobov v večjih koncentracijah privede do lažno negativnih rezultatov zaradi prerašanja *Xaph*. Prerašanje gojišč z netarjimi bakterijami preprečujemo z redčenjem ekstraktov (ekstrakte nanašamo v več reditvah, npr. nereden ekstrakt, 10x, 100x in 1000x reden ekstrakt), s čimer zmanjšamo število netarjih bakterij, vendar z redčenjem zmanjšamo tudi količino tarjih bakterij.

Kolonije, ki jih izberemo za nadaljnja testiranja, identificiramo z drugimi testi, ki lahko vključujejo opazovanje morfologije kolonij na različnih gojiščih, preverjanje patogenosti izoliranih bakterij s hipersezitivno reakcijo na rastlinah paradižnika, imunofluorescenčni test z uporabo specifičnih protiteles, določanje delnega sekvencnega zaporedja izbranih genov

(angl. "DNA barcoding") in drugimi molekularnimi testi. Ob pozitivnih rezultatih potrjujemo patogenost izoliranih bakterij z okuževanjem rastlin fižola.

Uporaba izolacije na gojiščih kot presejalnega testa ima mnoge prednosti. Tipi no lahko analiziramo ve je koli ine vzorca kot z drugimi metodami (100 µL in ve). To je tudi generalna metoda, ki za razliko od metod, pri katerih uporabljamo specifi ne reagente, zazna bakterijo, etudi se bakterija tekom evolucije spremeni. Rast bakterije na gojiščih potrjuje tudi njeno živost, kar je velika prednost v primerjavi s serološkimi in molekularnimi metodami, ki temeljijo na zaznavanju delov membran ali DNA, ki so lahko prisotni še dolgo po propadu bakterije.

Poleg pomanjkljive selektivnosti je najve ja slabost uporabe gojiščih kot presejalne metode dolgotrajnost testiranja, saj bakterije potrebujejo vsaj nekaj dni, da zrastejo do ustrezne velikosti za pregledovanje, nakar sledi še njihova precepitev in iš enje. Posebno ob poznem vzor enju lahko ob uporabi asovno zahtevnih metod pride do zamud pri dostavi semena na tržiš e in pridelovalcem.

as, ki je potreben za rast bakterij, je odvisen od vrste bakterije, njenega fiziološkega stanja in gojiš a. Osnovna gojiš a pregledujemo ve krat, saj lahko ostali organizmi, ki so prisotni na gojiščih povzro ijo, da tar na bakterija raste po asneje. Tako je pri bakteriji *Xaph* potrebnih navadno vsaj 3-4 dni za rast, ki omogo a prvi pregled na splošnih gojiščih in 5-7 dni za prvi pregled delno selektivnih gojiščih . Gojiš a se pregledujejo tudi po tem asu. Po izboru kolonij, le-te istimo s precepljanjem na sveža gojiš a, za kar je potrebnih nadaljnjih 2-4 dni. V tabeli 1 je prikazan as analize gojiščih pri 26 vzorcih semena fižola, ki smo jih na Nacionalnem inštitutu za biologijo testirali na prisotnost bakterije *Xaph* od leta 2011. Iz tabele je razvidno, da je bilo za to analizo v povpre ju potrebnih kar 13 koledarskih dni. Le 9/26 vzorcev (27 %) smo lahko zaklju ili kot negativne na osnovi rezultatov izolacije na gojiščih brez opravljanja dodatnih testov. Pri ve ini vzorcev (19/26, 73 %) smo opazili kolonije, ki so bile morfološko podobne bakterijam *Xaph* in smo jih dodatno preverjali s testom hipersenzitivne reakcije. Pri kar 13 takšnih vzorcih (50 % vseh vzorcev) so izolati povzro ili hipersenzitivno reakcijo na paradižniku, zato smo njihovo identiteto preverjali s sekveniranjem dela gena *GyrB* in v dolo enih primerih tudi *AvrBs2*.

Alternativna rešitev uporabe gojiščih kot prvega presejalnega testa, je vpeljava drugih, hitrejših presejalnih testov, s katerimi bi lahko v ekstraktih vzorcev semen specifi no zaznavali prisotnost karantenskih bakterij.

2.2 Serološke presejalne metode

Serološke presejalne metode, ki se uporabljajo za analizo semena, so test ELISA in test imunofluorescence (IF) na ekstraktu. Posebno za ELISA test je zna ilna nizka ob utljivost metode, zaradi esar se v bakteriologiji malo uporablja. Pri obeh testih se relativno pogosto pojavljajo navzkrižne reakcije in posledi no lažno pozitivni rezultati. Pri imunofluorescen nem testu se poleg fluorescen nega signala opazuje tudi velikost in oblika bakterij, s imer lahko v nekaterih primerih pove amo specifi nost testa. Nespecifi nost testa IF smo opazili pri dveh vzorcih iz leta 2011, pri katerih smo izolirali morfološko ustrezne, HR pozitivne kolonije, ki so reagirale s protitelesi v testu IF, vendar na fižolu niso povzro ale bolezenskih znamenj (preglednica 1). Pozneje smo test IF nadomestili z bolj zanesljivo identifikacijo *Xaph* na podlagi sekveniranja dela gena *GyrB* in/ali *AvrBs2*. Na ta na in lahko bolj zanesljivo identificiramo *Xaph*, kar je bistveno zmanjšalo pogostost izvajanja testa patogenosti pri vzorcih s kon nim negativnim rezultatom analize (preglednica 1).

Preglednica 1: Testiranje vzorcev semena fižola na prisotnost bakterije *Xaph* v letih 2011-2015. Prikazani so koledarski dnevi izvajanja presejalnega testa izolacije na gojiščih, ki vključuje uje pripravo ekstraktov z namakanjem, nanos na gojišča, izbor in išenje izolatov ter izvedeni identifikacijski testi in končni rezultat testiranja. HR- test hipersenzitivne reakcija na paradižniku, Sekveniranje – sekveniranje dela gena *GyrB* in/ali *AvrBs2*, IF – test indirektna imunofluorescence.

Leto	Zaporedna številka vzorca	Čas analize gojišč	Izvajanje identifikacijskih testov				Končni rezultat
			HR	Sekveniranje	IF	Test patogenosti	
2011	1	10	✓		✓	✓	Xaph neg
	2	9	✓		✓	✓	Xaph neg
	3	18	✓		✓	✓	Xaph poz
2012	4	16	✓	✓		✓	Xaph neg
	5	16	✓	✓		✓	Xaph neg
	6	16	✓	✓		✓	Xaph neg
	7	16					Xaph neg
	8	14	✓	✓		✓	Xaph poz
	9	16					Xaph neg
	10	16					Xaph neg
	11	9	✓	✓		✓	Xaph poz
	12	9	✓				Xaph neg
2014	13	14	✓				Xaph neg
	14	14	✓	✓			Xaph neg
	15	10					Xaph neg
	16	15	✓	✓			Xaph neg
	17	11	✓	✓			Xaph neg
	18	11	✓	✓			Xaph neg
	19	11	✓	✓			Xaph neg
	20	11	✓	✓			Xaph neg
	21	11	✓	✓			Xaph neg
	22	11	✓	✓			Xaph neg
2015	23	9					Xaph neg
	24	11					Xaph neg
	25	11					Xaph neg
	26	9	✓				Xaph neg

226

2.3 Molekularne presejalne metode

V zadnjih dveh desetletjih se v diagnostiki vedno bolj uporabljajo in uveljavljajo molekularne metode, kot sta metodi PCR in PCR v realnem času. Metoda PCR v realnem času temelji na spremljanju pomnoževanja DNA v realnem času. Če je bakterija v vzorcu prisotna, se povečuje fluorescenca, ki jo zaznavamo z ustreznimi detektorji. Glede na nivo fluorescence lahko v primerjavi s kontrolnimi vzorci rezultat interpretiramo kot negativen ali pozitiven. Dodatno lahko s primerjavo s standardno krivuljo določimo tudi število bakterij v vzorcu. Metoda PCR v realnem času se uspešno uporablja za določanje karantenskih organizmov v semenu, npr. za določanje virusa PepMV (Gutierrez-Aguirre in sod., 2009) in viroida PSTVd (Verhoeven in sod., 2004).

Poseben izziv uporabe PCR v realnem času pri testiranju semena je oblikovanje specifičnih oligonukleotidnih začetkov in sond. Z njimi namreč želimo zaznati vse izolate *Xaph* in hkrati omejiti lažno pozitivne reakcije z drugimi bakterijami različnih vrst, ki so pogosto prisotne v in na semenu. Zanesljivost molekularnih metod, še posebno, kadar jih uporabljamo

pri vzorcih brez bolezenskih znamenj, mo no pove amo s kombinacijo ve testov PCR v realnem asu, ki zaznavajo razli ne dele genoma (Dreo in sod., 2012).

Pri analizi semena navadno opažamo ve je koli ine inhibitornih snovi, ki zavirajo pomnoževanje DNA in se nahajajo na in v semenu ali so posledica kemijske obdelave semena. Ve ino inhibitornih substanc lahko zadovoljivo izlo imo med izolacijo in iš enjem DNA, preostanku inhibitorjev pa zmanjšamo aktivnost z red enjem vzorcev pred analizo.

Kljub dejstvu, da z metodo PCR v realnem asu ne moremo razlikovati med mrtvimi in živimi bakterijami, kot je to možno pri uporabi gojiš , je njena velika prednost hitrost in relativna neodvisnost od prisotnosti drugih mikroorganizmov v vzorcih. Primerjava trajanja prve presejalne analize pri uporabi gojiš ali PCR v realnem asu je prikazana na sliki 1. Tako vidimo da bi z uporabo metode PCR v realnem asu, ki bi specifi no zaznala bakterijo *Xaph*, lahko ob utno skrajšali as presejalne analize pri negativnih vzorcih. Rezultat takšne analize bi lahko dobili že v 2 dneh po za etku analiz.

Presejalni test	Koledarski dnevi																												Rezultat testiranja
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
Gojišča	Priprava vzorca	Nanos in pregled gojišč							Osamitev in čiščenje bakterij					HR	Sekveniranje				Test patogenosti na rastlinah fižola							<i>Xaph</i> neg ^a			
		Nanos in pregled gojišč							Osamitev in čiščenje bakterij					HR	Sekveniranje				Test patogenosti na rastlinah fižola							<i>Xaph</i> neg ^b			
Molekularna metoda PCR v realnem času	Priprava vzorca Izolacija DNA in qPCR	Nanos in pregled gojišč							Osamitev in čiščenje bakterij					HR	Sekveniranje				Test patogenosti na rastlinah fižola							<i>Xaph</i> neg ^c			
		Nanos in pregled gojišč							Osamitev in čiščenje bakterij					HR	Sekveniranje				Test patogenosti na rastlinah fižola							<i>Xaph</i> poz			

227

Slika 1: Primerjava asovnega poteka testiranja pri uporabi različnih presejalnih testov (svetlo sivo), izolacije na gojiših in PCR v realnem asu, ter predvideno izvajanje identifikacijskih testov (temno sivo). Prikazan je najkrajši as potreben za izvedbo posameznega testa. HR - test hipersenzitivne reakcije na paradižniku; Sekveniranje – sekveniranje dela gena *GyrB* in/ali *AvrBs2*; ^aNa gojiših ni kolonij morfološko podobnih *Xaph*; ^bna gojiših so prisotne kolonije, ki so morfološko podobne *Xaph*, vendar so negativne na testu hipersenzitivne reakcije na paradižniku; ^cna gojiših so prisotne kolonije morfološko podobne *Xaph*, ki so pozitivne na testu hipersenzitivne reakcije na paradižniku, vendar na podlagi delnega sekveniranja genov *GyrB* in/ali *AvrBs2* niso bile identificirane kot *Xaph*.

V primerjavi z gojiš i in serološkimi metodami je volumen vzorca, ki ga analiziramo s PCR v realnem asu manjši. To lahko kompenziramo z ve jim številom ponovitev, deloma pa je za to že poskrbljeno z ve jo absolutno ob utljivostjo PCR v realnem asu. Ob utljivost PCR v realnem asu lahko dodatno izboljšamo, e ga izvajamo v obliki digitalnega PCR, ki je pogosto manj ob utljiv na inhibicijo v reakciji pomnoževanja (Ra ki in sod., 2014), še posebno v zahtevnejših vzorcih, ter omogo a absolutno kvantifikacijo, kar pomeni, da ni potrebno dodatno pripravljati standardne krivulje s tar no bakterijo v znani koncentraciji, na kateri bi primerjali naše rezultate (Dreo in sod., 2014). Informacija glede števila bakterij v vzorcu nam omogo a tudi prilagoditev nanosa na gojiš a, kar uporabljamo pri latentnem testiranju na bakterijo *Erwinia amylovora* (Pirc in sod., 2009).

Za dolo anje bakterij *Xanthomonas* ni na voljo mnogo molekularnih testov. Pri testih, ki so razviti, pogosto ni na voljo validacijskih podatkov, zato je potrebno za diagnostiko preizkusiti njihovo specifi nost, ob utljivost, ponovljivost in robustnost (EPPO PM 7/98 (2), 2014). Za dolo anje bakterije *Xaph* in njegove varietete *fuscans*, je He (2010) oblikoval PCR v realnem asu s oligonukleotidnimi za etniki in sondo, ki specifi no zaznavajo in tudi lo ijo oba seva

na podlagi pomnoževanja dveh lo enih delov genoma, izbranih na podlagi RAPD-PCR analize (He, 2010). Preverili so specifičnost in občutljivost testa pri dolo anju različnih izolatov ter umetno okuženih vzorcih semen, vendar niso preverili morebitnih navzkrižnih reakcij v vzorcih zdravega semena, pomembnega parametra, ki je pogosto vezan na geografsko lokacijo pridelave semena.

3 SKLEPI

Uporaba gojišč kot presejalne metode ima zagotovo veliko prednosti, vendar ima lahko zaradi dolgotrajnosti neželene gospodarske posledice. Z uvedbo hitrejših molekularnih metod v postopek identifikacije izolatov smo že skrajšali celotni čas analiz. Z uvedbo PCR v realnem času kot presejalnega testa želimo v prihodnosti skrajšati tudi čas od prejema vzorca do prve informacije ter povečati zanesljivost presejalnih testov. Poseben izziv je izbor oligonukleotidnih zaporedij za etnikov in sond, ki bi bili tako specifični, da ne bi zaznali bakterij, ki so zelo sorodne in predstavljajo mikrofloro na/v semenih.

4 ZAHVALA

Zahvaljujemo se Upravi RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin za financiranje, sodelavcem Inšpekcije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin za nabrane vzorce ter Lidiji Matičič, Špeli Prijatelj Novak in Alešu Blatniku za pomoč pri izvedbi laboratorijskih testov.

5 LITERATURA

- Dreo T., Pirc M., Ravnikar M. 2012. Real-time PCR, a method fit for detection and quantification of *Erwinia amylovora*. *Trees*, 26, 1: 165-178.
- Dreo T., Pirc M., Ramšak Ž., Pavšič J., Milavec M., Žel J., Gruden K. 2014. Optimising droplet digital PCR analysis approaches for detection and quantification of bacteria: a case study of fire blight and potato brown rot. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406, 26: 6513-6528.
- EPPO PM 7/98 (2). 2014. Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. *EPPO Bulletin* 44, 2: 117-147.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2014. Scientific Opinion on the pest categorisation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas fuscans* subsp. *Fuscans*, *EFSA Journal* 2014; 12, 10: 3856
- Gutierrez-Aguirre, I., Mehle, N., Delgado, D., Gruden, K., Mumford, R., Ravnikar, M. 2009. Real-time quantitative PCR based sensitive detection and genotype discrimination of Pepino mosaic virus. *J. virol. methods.*, 1-2, 162: 46-55.
- He Y. 2010. Improved seed health tests for *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in common bean. *Graduate Theses and Dissertations*. Paper 11565.
- International Seed Testing Association (ISTA). 2014. 7-021 Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* on *Phaseolus vulgaris* (bean)
- Parkinson N., Aritua, V., Heeney J., Cowie C., Bew J., Stead, D. 2007. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2881-2887.
- Pirc M., Ravnikar M., Tomlinson J., Dreo T. 2009. Improved fireblight diagnostics using quantitative real-time PCR detection of *Erwinia amylovora* chromosomal DNA. *Plant Pathology*, 58, 5: 872-881.
- Rakić N., Dreo T., Gutierrez-Aguirre I., Blejčič A., Ravnikar M. 2014. Reverse transcriptase droplet digital PCR shows high resilience to PCR inhibitors from plant, soil and water samples. *Plant methods*, 1746-4811, 10: 42.
- Verhoeven J.Th.J., Jansen C.C.C., Willems T.M., Kox L.F.F., Owens R.A., Roenhorst J.W. 2004. Natural infections of tomato by Citrus exocortis viroid, Columnea latent viroid, Potato spindle tuber viroid and Tomato chlorotic dwarf viroid. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 823-831.