

KATARZYNA ANNA KUBIAK, TOMASZ OSZAKO, TOMASZ JABŁOŃSKI

Detekcja fitopatogenów z rodzaju *Phytophthora* w glebach leśnych za pomocą analiz DNA*

Detection of *Phytophthora* in forest soils using DNA analysis

ABSTRACT

Kubiak K. A., Oszako T., Jabłoński T. 2012. Detekcja fitopatogenów z rodzaju *Phytophthora* w glebach leśnych za pomocą analiz DNA. Sylwan 156 (6): 437-443.

Pathogenic oomycetes from the genus *Phytophthora* attack the base trunks and root systems of trees causing their illness and dying. Under favorable conditions, they may cause damage to even 90% of fine roots. For this reason, they are a particular threat to seedlings in nurseries of forest trees and ornamental plants. Early detection and identification of *Phytophthora* species is a key issue in forest protection. The aim of this study was to compare the two methods of identification of pathogenic *Phytophthora* in soil samples collected around 50 selected oaks in Krotoszyn and Karczma Borowa forest districts. Each of the soil samples were analyzed in parallel: 1) direct isolation of genomic DNA from soil and 2) isolation of genomic DNA from soil, preceded by its three day pre-incubation in a selective medium for *Phytophthora*. Species identification was performed by PCR amplification with primers specific for the species of *Phytophthora*. The results indicate that the use of pre-incubation phase of soil in a medium-PARP PeaBroth before isolation of DNA, increases the sensitivity of detection of these phytopathogens using PCR. With pre-incubation, the method revealed 54% of positive findings, while simultaneously conducted the same analysis of soil samples by using only direct DNA isolation from soil and PCR amplification provided only 30% of positive findings.

KEY WORDS

Phytophthora, identyfikacja, DNA izolacja, gleba leśna, PCR

ADDRESSES

Katarzyna A. Kubiak ⁽¹⁾ – e-mail: katarzyna.kubiak82@gmail.com

Tomasz Oszako ⁽²⁾ – e-mail: T.Oszako@ibles.waw.pl

Tomasz Jabłoński ⁽²⁾ – e-mail: T.Jablonski@ibles.waw.pl

⁽¹⁾ Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów; Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie; ul. Nowourysnowska 159; 02-778 Warszawa

⁽²⁾ Zakład Ochrony Lasu; Instytut Badawczy Leśnictwa; Sękocin Stary, ul. Braci Leśnej 3; 05-090 Raszyn

Wstęp

Lęgniowce należące do rodzaju *Phytophthora* powodują fytoftorozę wielu gatunków drzew leśnych zarówno w Europie, jak i na świecie, co w konsekwencji prowadzi do zamierania nawet całych drzewostanów. Fytoftoroza jest chorobą atakującą przede wszystkim korzenie i podstawy pni, w których dochodzi do zamierania tkanek kambium. Patogeny te są szczególnie groźne dla siewek w szkółkach drzew leśnych i ozdobnych, zatem wykrywanie oraz identyfikacja patogennych gatunków *Phytophthora* jest zagadnieniem kluczowym w ochronie lasu. Przez wiele lat identyfikację do rodzaju lub gatunku wykonywano za pomocą dostępnych opisów morfologii i fizjologii, co wiązało się z pracochłonnym zakładaniem długotrwałych hodowli na różnych typach pożywek.

* Prace badawcze wykonano w ramach finansowania grantu z MNiSW nr DPN/N157/COST/2009.

Aby uzyskać szczepy łęgniowców z prób środowiskowych (gleby lub wody) stosowano przede wszystkim metodę pułapek roślinnych (liście, jabłka itp.). Przełom w wykrywaniu i identyfikacji fitopatogenów przyniosły metody biologii molekularnej. Opierają się one na identyfikacji DNA patogenów, a ich zaletą jest dokładność i krótki czas oczekiwania na wynik. Materiał genetyczny może być izolowany zarówno z czystych szczepów *Phytophthora* wyhodowanych na pożywkach selektywnych, jak i z zainfekowanych tkanek roślinnych lub bezpośrednio z wody lub gleby. Te ostatnie analizy są szczególnie trudne do wykonania ze względu na obecność w 1 g gleby nawet miliarda różnych organizmów. Identyfikacja DNA zakłócana jest przez obecność w glebie wielu inhibitorów reakcji enzymatycznych.

Celem pracy jest porównanie dwóch metod wykorzystywanych do identyfikacji łęgniowców z rodzaju *Phytophthora*. Pierwsza z nich polega na bezpośredniej izolacji DNA genomowego z gleby za pomocą komercyjnych zestawów odczynników, natomiast w drugiej metodzie zaprojektowano nowatorski etap przednamnażania organizmów w płynnej pożywce stymulującej rozwój łęgniowców, natomiast inhibującej rozwój grzybów i bakterii.

Materiał i metody

W 2010 roku pobrano próbki gleby z sześciu powierzchni badawczych, założonych w drzewostanach dębowych na terenie nadleśnictw Karczma Borowa i Krotoszyn. Ogółem zebrano 50 zbiorczych, mieszanych prób gleby na powierzchniach uszkodzonych przez miernikowce i kuprówkę rudnicę w stopniu średnim (defoliacja 31-60%) i silnym (>60%) oraz próby z powierzchni kontrolnych (nieuszkodzonych). Każda zbiorcza próba reprezentowała glebę pobraną z głębokości 10-20 cm w miejscach zlokalizowanych wokół pni w odległości około 1 m od szyi korzeniowej w kierunkach czterech stron świata.

Porównanie obu metod identyfikacji fitopatogenów z rodzaju *Phytophthora* w próbkach gleb leśnych polegało na sprawdzeniu skuteczności izolacji i wykrywania ich DNA. Do identyfikacji organizmów zastosowano techniki molekularne oparte na izolacji genomowego DNA bezpośrednio z gleby z określeniem łęgniowców należących do rodzaju *Phytophthora* za pomocą metody PCR oraz preinkubacji próbek gleby w pożywkach namnażająco-selektywnych, izolacji DNA genomowego oraz amplifikacji PCR ze starterami specyficznymi dla rodzaju *Phytophthora*.

W celu namnażania łęgniowców (preinkubacji) testowano dwa rodzaje pożywek selektywnych. Pierwszą z nich była pożywka V8-PARP o składzie: 100 ml soku przecierowo-warzywnego zwirowanego z 1 g węglanu wapnia (9000 rpm przez 30 min), gdzie supernatant zlano i dopełniono do 1000 ml. Drugą testowaną pożywką było podłoże PB-PARP (PeaBroth PARP) otrzymane ze 110 g mrożonego zielonego groszku gotowanego 30 min w 500 ml wody destylowanej, następnie ugotowany groszek przeciśnięto przez gazę i dopełniono powstałą zawiesinę wodą destylowaną do objętości 1000 ml. Następnie odmierzono po 100 ml każdej pożywki i przelano do kolb Erlenmayera (300 ml), które zamknięto korkami celulozowymi i sterylizowano w 121°C przez 30 minut. Kolejnym etapem było przygotowanie mieszaniny antybiotyków: 0,25 g ampicyliny, 400 ml pimarycyny, 0,01 g rifampicyny, 0,05 g himeksazolu rozpuszczonego w 3 ml 96% alkoholu etylowego. Przygotowano roztwór PCNB, rozpuszczając 0,1 g PCNB w 10 ml 96% alkoholu etylowego. Następnie oba roztwory połączono w ilości: 3 ml mieszaniny antybiotyków oraz 5 ml roztworu PCNB. Na 100 ml pożywki dodano 0,3 ml mieszaniny antybiotyków. Antybiotyki dodawano w warunkach sterylnych po wystygnięciu pożywki do temperatury około 35°C. Fragmenty agaru przerośniętego strzępkami *Phytophthora* (0,5×0,5 cm) włożono do kolb z obu pożywkami i po 3 dniach porównano intensywność ich wzrostu.

Z próbek gleby izolowano genomowe DNA za pomocą zestawu Power Soil DNA Isolation Kit, firmy MoBio według wskazówek producenta, stosując niewielkie modyfikacje. Pobrane próbki gleby wymieszano i pobrano z nich 0,5 g (próbka reprezentatywna), które następnie umieszczono w probówce Power Bead Tube (MoBio) z dostarczonym przez producenta buforem oraz złożem kulek. Tak przygotowane próbki zamrażano i gotowano trzykrotnie. Następnie dodano 60 µl buforu C1 i wytrząsano 40 min na Vorteksie (MoBio) przy maksymalnej szybkości. Dalsze czynności wykonywano zgodnie z zalecanym protokołem, a otrzymane DNA oczyszczano zestawem Clean Up firmy A&A Biotechnology.

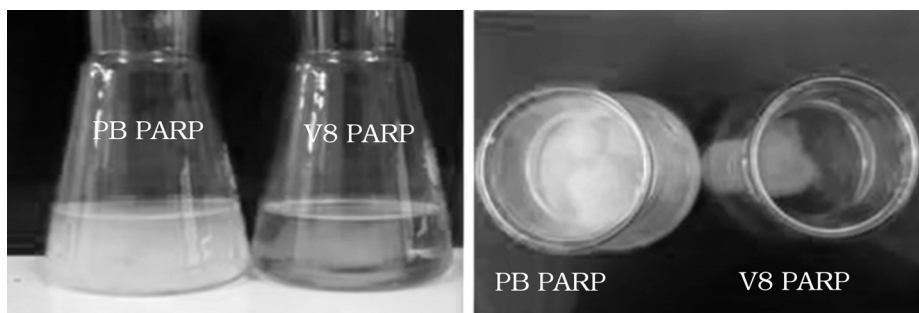
Do ostudzonej pożywki PB-PARP, przygotowanej jak w kolbach, dodano po 5 g gleby (z każdej próbki) i zamknięto korkiem. Po 3 dniowej inkubacji w ciemności w 25°C pobrano 50 ml zawiesiny pożywki z gleby i wirowano 35 min przy prędkości 9000 rpm. Osad posłużył jako materiał wyjściowy do izolacji DNA za pomocą zestawu Power Soil firmy MoBio z modyfikacjami. DNA genomowe rozdzielono elektroforetycznie. Żel agarozowy składający się ze 150 ml buforu 0,5 x TBE (Trisma base 5,4 g/l, kwas borowy 2,75 g/l, 4 ml EDTA) rozpuszczono w mikrofali z 1,5 g agarozy, następnie dodano 5 µl bromku etydyliny na każde 100 ml buforu TBE i wylano do kuwety elektroforetycznej. Po ostudzeniu na żel agarozowy nakładano mieszaninę DNA genomowego wyizolowanego z gleby (3 lub 4 µl DNA, 1 µl barwnik, 1 lub 2 µl woda). Rozdział elektroforetyczny przeprowadzono przy napięciu 100 V przez 1 godzinę. Do identyfikacji gatunków należących do rodzaju *Phytophthora* posłużono się techniką Nested-PCR ze starterami ogólnymi ITS 1/4 [White i in. 1990] oraz specyficznymi dla rodzaju *Phytophthora* ITS4/Ph2. Według Ippolito i in. [2002] startery te amplifikują fragmenty DNA o wielkości około 700 pz, które są specyficzne dla rodzaju *Phytophthora*. Mieszaninę PCR wykonano w stężeniu następującym: 1×bufor Q (Qiagen), 1×bufor PCR zawierający 1,5 mM Mg (Qiagen), 1,5 mM Mg dodatkowo (Qiagen), 0,2 mM każdego z dNTP (Qiagen), 0,15 µM każdego ze starterów poszczególnych par ITS1/4 oraz Ph2 i ITS4 (Oligo), 0,5 U/ reakcja polimeraza Taq (Invitrogen), 1 µl DNA genomowego, woda MiliQ do określonej objętości 25 µl.

DNA izolowane metodą bezpośrednią, jak i metoda z preinkubacją posłużyło jako matryca do amplifikacji Nested-PCR. Reakcja Nested-PCR składała się z amplifikacji fragmentu ze starterami ITS1/4 [White i in. 1990], obejmującej denaturację wstępną w 95°C przez 3 min, 12 cykli: denaturacja w 95°C przez 30 s, w 56°C przez 30 s i w 72°C przez 50 s, oraz końcowe wydłużanie w 72°C przez 10 min. Następnie pobrano 1 µl mieszaniny PCR i przeniesiono do nowej mieszaniny reakcyjnej PCR przygotowanej według powyższej procedury zawierającej startery ITS4/Ph2 [Ippolito i in. 2002]. Reakcje PCR prowadzono w następujących cyklach: denaturacja wstępną w 95°C przez 3 min, 40 cykli: denaturacja w 95°C przez 30 s, w 56°C przez 30 s i w 72°C przez 50 s, oraz końcowe wydłużanie w 72°C przez 10 min (4°C – 8). Produkt PCR o wielkości około 700 pz rozdzielono elektroforetycznie według ww. warunków nakładając na żel mieszaninę 7 µl produktu PCR, 1 µl barwnika i 1 µl woda.

Wyniki

Do hodowli organizmów z rodzaju *Phytophthora* najbardziej odpowiednia okazała się pożywka PB-PARP. Zaobserwowano w niej wyraźnie intensywniejszy wzrost strzępek niż w pożywce V8-PARP (ryc. 1). W związku z powyższym do dalszych doświadczeń użyto wyłącznie pożywkę PB-PARP.

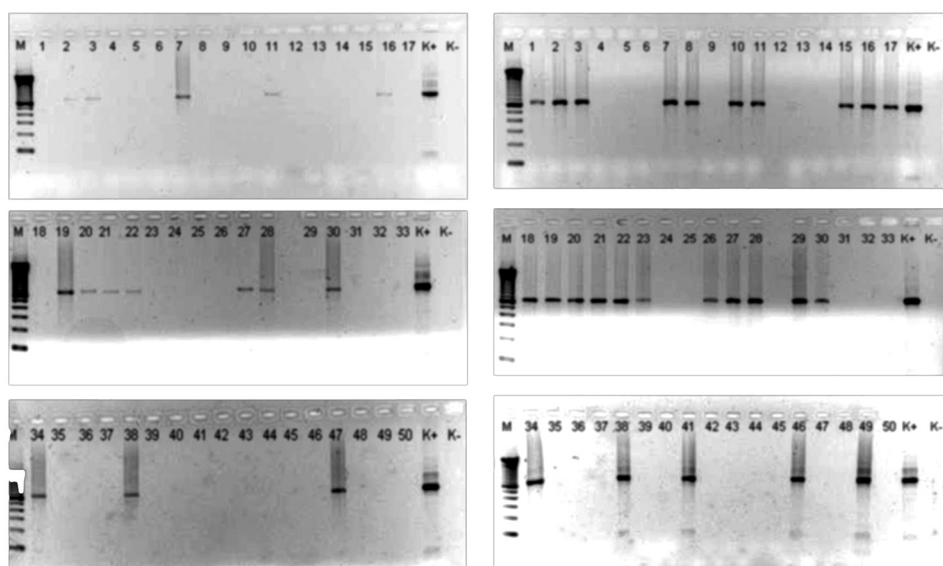
Identyfikacja lęgniowców wykonana metodą bezpośredniej izolacji DNA z gleby wykazała obecność organizmów z rodzaju *Phytophthora* w 15 próbach, natomiast analiza tych samych próbek gleby metodą przednamnażania selektywnego wykazała ich obecność w 27 próbach gleby (ryc. 2).



Ryc. 1.

Intensywność wzrostu hodowli *Phytophthora* w pożywkach płynnych V8 PARP i PB PARP po 3 dniach inkubacji w ciemności i temperaturze 25°C

Intensity of the growth of *Phytophthora* culture in liquid V8 medium and PB PARP PARP medium after 3 days of incubation in the dark and at 25°C



Ryc. 2.

Produkt amplifikacji Nested-PCR ze starterami ITS4/Ph2 z DNA genomowego izolowanego bezpośrednio z gleby (po lewej) oraz z DNA genomowego pochodzącego z gleby po zabiegu preinkubacji w pożywce BP-PARP (po prawej)

Products of nested-PCR amplification with primers ITS4/Ph2 of genomic DNA isolated directly from soil (left) and of genomic DNA isolated from soil after surgery preincubation in medium BP-PARP (right).

Różnice w czułości omawianych metod analitycznych były widoczne na wszystkich powierzchniach badawczych z wyjątkiem powierzchni w Nadleśnictwie Krotoszyn o większej defoliacji. Stwierdzono również znaczne różnice zasiedlenia przez tę grupę patogenów drzewostanów dębowych na poszczególnych powierzchniach badawczych. Najwyższy stopień zasiedlenia gleb przez lęgniowce z rodzaju *Phytophthora* stwierdzono w drzewostanach Nadleśnictwa Karczma Borowa (uszkodzonych przez kuprówkę brudnicę). Przeciętny poziom zasiedlenia kształtował się na poziomie 40% i 73% w zależności od zastosowanych metod analitycznych.

Najsilniej zasiedlona była powierzchnia silnie uszkodzona przez kuprówkę (przeciętna defoliacja >61%), na której objawy porażenia wykazano dla 50% (PCR bez preinkubacji) i 90% drzew próbnych (PCR z preinkubacją). Na powierzchniach kontrolnej (defoliacja <30%) i uszkodzonej przez kuprówkę w stopniu średnim (defoliacja 31-60%) poziom zasiedlenia był niższy (tab.). Znacznie niższy stopień porażenia przez lęgniowce z rodzaju *Phytophthora* stwierdzono na powierzchniach badawczych w Nadleśnictwie Krotoszyn uszkodzonych przez miernikowce i gatunki towarzyszące. Przeciętny poziom zasiedlenia dla tych drzewostanów wyniósł 15% (PCR bez preinkubacji) i 25% (PCR z preinkubacją). Podobnie jak w przypadku drzewostanów uszkodzonych przez kuprówkę, widoczne są różnice pomiędzy powierzchniami uszkodzonymi w różnym stopniu przez foliofagi. Najsilniej zasiedlona została powierzchnia kontrolna. Nieznacznie niższy poziom stwierdzono na powierzchni uszkodzonej przez foliofagi w stopniu średnim (tab.).

Dyskusja

Klasykne techniki identyfikacji patogenów z rodzaju *Phytophthora* oparte są o hodowle i izolacje ich szczepów na sztucznych pożywkach, bezpośrednio z roślin, wody lub z gleby, np. za pomocą roślin pułapkowych, tzw. „baiting” [Anandaraj, Sarma 1990; Orlikowski i in. 2011]. W dalszych etapach identyfikację do gatunku przeprowadza się na podstawie morfologii (plechy, zarodników konidialnych lub organów rozmnażania generatywnego), a także za pomocą parametrów fizjologicznych, takich jak np. tempo wzrostu w różnych temperaturach [Bush i in. 2006]. Z powodu naturalnej, dużej zmienności wewnątrzgatunkowej i skłonności do krzyżowania się patogenów oraz bardzo subtelnych różnic morfologicznych prowadzących do wyodrębnienia podgatunków, a także dużej czasochłonności klasycznych technik identyfikacji, nadal poszukuje się nowych metod opartych o analizy DNA. Polegają one albo na wykrywaniu specyficznych fragmentów DNA, tzw. markerów, charakterystycznych tylko dla danego gatunku *Phytophthora* [Ersek i in. 1994], albo na wykrywaniu charakterystycznego wzoru prążków DNA (ang. fingerprinting) [Trzewik i in. 2006; Mannon i in. 2008] lub też uzyskaniu produktu charakterystycznego dla szerszej grupy mikroorganizmów, aby po sekwencjonowaniu otrzymanych fragmentów DNA [Ersek i in. 1994] przyporządkować je do rodzajów lub gatunków. Kluczową zaletą analiz DNA jest możliwość wykrywania i identyfikacji patogenów z rodzaju *Phytophthora* w krótkim czasie

Tabela.

Detekcja obecności lęgniowców z rodzaju *Phytophthora* różnymi wariantami testu Nested-PCR
 Identification of the *Phytophthora* with various types of Nested-PCR test

Defoliacja [%]	N [szt.]	PCR ITS4/Ph2		PCR ITS4/Ph2 preinkubacja	
		- [%]	+ [%]	- [%]	+ [%]
Karczma Borowa					
<30	10	70	30	40	60
31-60	10	60	40	30	70
61-90	10	50	50	10	90
Razem	30	60	40	27	73
Krotoszyn					
<30	10	90	10	70	30
31-60	10	80	20	80	20
Razem	20	85	15	75	25
Całość	50	70	30	46	54

Obecność produktu PCR specyficznego dla gatunków z rodzaju *Phytophthora* oznaczono „+”, a jej brak „-”
 '+' indicates the presence of PCR product specific to genus of *Phytophthora*, while '-' the absence of it

i bezpośrednio z prób środowiskowych (gleby lub wody) lub tkanek roślinnych [Wiejacha i in. 2004]. W niniejszym eksperymencie najlepsze wyniki skuteczności wykrywania obecności organizmów rodzaju *Phytophthora* uzyskano za pomocą bezpośredniej izolacji DNA wykonanej po wstępnym etapie selektywnego namnażania patogenów w próbkach gleby (tab.).

Analizy genetyczne wykazały różnice w wykrywaniu organizmów rodzaju *Phytophthora* w zależności od zastosowanej metody. Komercyjna metoda polegająca na wyizolowaniu DNA bezpośrednio z gleby i przeprowadzaniu łańcuchowej reakcji polimerazy (Nested-PCR) okazała się mniej skuteczna w wykrywaniu organizmów rodzaju *Phytophthora* niż zastosowanie preinkubacji gleby w pożywce namnażająco-selektywnej PB-PARP. O ile metodę bezpośredniej izolacji DNA z gleby stosowało wielu badaczy [Ippolito i in. 2002; Tomlinson i in. 2005], to etap selektywnego namnażania w pożywce PB PARP został zaproponowany po raz pierwszy. W przedstawionych badaniach stwierdzono, że skuteczność wykrywania obecności patogenicznych lęgniowców w próbkach środowiskowych w dużym stopniu zależy od zastosowanej metody ich identyfikacji. Zaletą wykorzystywania metod biologii molekularnej jest krótki czas cyklu diagnostycznego oraz wysoka czułość w porównaniu do metod mikrobiologii klasycznej lub metody z wykorzystaniem roślin pułapkowych („baiting”). Wadą metod opartych na analizie DNA są trudności w izolacji DNA ze środowisk heterogennych, jakimi są gleby (szczególnie leśne), a zwłaszcza obecność w glebach kwasów humusowych hamujących reakcje PCR. Uzyskane amplikony DNA charakterystyczne dla rodzaju *Phytophthora* w dalszych badaniach zostaną poddane sekwencjonowaniu w celu ustalenia przynależności systematycznej do gatunku i przeprowadzenia analizy filogenetycznej umożliwiającej poznanie wzajemnego pokrewieństwa wykształconego w procesie ewolucji.

Literatura

- Anandaraj M., Sarma Y. R. 1990. A simple baiting technique to detect and isolate *Phytophthora capsici* ('P. palmivora' MF4) from soil. *Mycological Research* 94 (7): 1003-1004.
- Bush E. A., Stromberg E. L., Hong C. X., Richardson P. A., Kong P. 2006. Illustration of key morphological characteristics of *Phytophthora* species identified in Virginia nursery irrigation water. *Plant Health Prog.*
- Ersek T., Schoelz J. E., English J. T. 1994. PCR amplification of species-specific DNA sequences can distinguish among *Phytophthora* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2616-2621.
- Ippolito A., Schena L., Soleti Ligorio V., Yaseen T., Nigro F. 2002. Real time detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. citrophthora* in citrus roots and soils. *European Journal of Plant Pathology* 110: 833-843.
- Mannon E. G., Hong Ch. 2000. *Phytophthora*: Identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints. American Phytopathological Society (APS Press), St. Paul, USA.
- Orlikowski L. B., Ptaszek M., Trzewik A., Orlikowska T. 2011. Przydatność pułapek liściowych do detekcji *Phytophthora* spp. z wody. *Sylwan* 155 (7): 493-499.
- Tomlinson J. A., Boonham N., Hughes K. J. D., Griffin R. L., Barker I. 2005. On-site DNA extraction and real-time PCR for detection of *Phytophthora ramorum* in the field. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 6702-6710.
- Trzewik A., Wiejacha K., Orlikowski L. B., Orlikowska T. 2006. Identification of five *Phytophthora* species, causal agents of diseases of nursery perennials, trees and shrubs on the base of DNA markers amplified with non-specific primers. *Phytopathol. Pol.* 41: 27-37.
- Wiejacha K., Szkuta G., Orlikowski L. B., Orlikowska T. 2004. *Phytophthora* – patogeny drzew i krzewów. Detekcja i dentyfikacja. *Biotechnologia* 66 (3): 55-68.
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. W Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T., Innis M. [red.]. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*, Academic Press, USA. 315-322.

SUMMARY

Detection of *Phytophthora* in forest soils using DNA analysis

Oomycetes belonging to the genus *Phytophthora* infect root systems and bases of trunks of forest trees, causing diseases called phytophthorosis. As a result of infection progresses the cambium tissues are damaged and / or almost all fine roots (less than 2 microns in diameter), which leads to decline phenomenon of even entire stands, both in Europe and worldwide. Particularly high mortality among young plants is observed in both forest and ornamental nurseries. The possibility of early detection of pathogens in soil, water and / or in plant tissues is crucial in decision making process concerning protective treatments. Identification of pathogenic *Phytophthora* species is usually performed using morphological, physiological, and molecular methods. The latter represented a breakthrough in the detection and identification of phytopathogens because they characterized by high sensitivity, accuracy and fast execution. The problem with their use in environmental samples is involved with isolation of genomic DNA because of the presence of multiple inhibitors disturbing PCR reactions.

The aim of this study was to compare the two methods used for the identification of the *Phytophthora* genus in forest soils samples collected around 50 oak trees in Krotoszyn and Karczma Borowa forest districts. The first method consisted in the direct isolation of genomic DNA from 50 soil samples (according to the manufacturer's instructions for DNA extraction kit), while the second method performed on the same soil samples first applied selective multiplication step (preincubation), followed by the isolation of their DNA. Polymerase chain reaction (PCR) performed twice for each DNA sample obtained from soil were carried out with both methods simultaneously. Used a pair of molecular primers specific for *Phytophthora* revealed positive results, showing the presence of *Phytophthora* species in the sample or negative showing the absence of the characteristic for *Phytophthora* DNA. The pre-incubation of soil method was more sensitive (efficient) because it allowed to detect DNA of *Phytophthora* species in 54% of all samples, while the direct DNA extraction method from soil detected *Phytophthora* DNA only in 30% of all samples. The study shows that the sensitivity and effectiveness of monitoring of pathogenic *Phytophthora* species in forest soil depends largely on chosen method of DNA isolation.