

NOWOCZESNE METODY DIAGNOSTYCZNE W IDENTYFIKACJI MOLEKULARNEJ BAKTERII KWARRANTANNOwych ZIEMNIAKA

mgr inż. Katarzyna Salamońska, mgr inż. Wioleta Stochła
dr inż. Włodzimierz Przewodowski
IHAR-PIB, Zakład Nasiennictwa i Ochrony Ziemniaka w Boninie
e-mail: w.przewodowski@ihar.edu.pl

Streszczenie

Tradycyjne, dobrze dopracowane, ale niskoczułe i pracochłonne metody diagnostyki *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* i *Ralstonia solanacearum* nie zawsze wykluczają infekcję bakteryjną, zwłaszcza bezobjawową. Szczególnie kiedy na roślinach i bulwach pojawiają się różne objawy chorobowe, mylone często z objawami innych chorób ziemniaka lub suszy. Omówiono: test PCR i jego modyfikacje (Multiplex PCR i Real-Time PCR, nested PCR), metody hybrydyzacji DNA (FISH, Southern Blot i Northern Blot), test LAMP oraz test filtracyjny typu Flow-Through, opracowany i opatentowany w ZNiOZ w Boninie, umożliwiający szybkie usunięcie inhibitorów hamujących amplifikację badanego DNA przy jednoczesnym zwiększeniu czułości i specyficzności testu molekularnego.

Słowa kluczowe: bakterie kwarantannowe, diagnostyka, metody molekularne, ziemniak

W ostatnich latach, wraz z dynamicznym rozwojem nowych technologii i elektroniki, obserwuje się również rozwój wielu nowych metod diagnostycznych. Bazują one na wykorzystaniu różnych technik molekularnych, wiele z nich w odróżnieniu od tradycyjnych metod diagnostycznych pozwala na uzyskanie dokładnych i wysoce specyficznych wyników w krótkim czasie (Boonham, Tomlinson, Mumford 2016).

Prawidłowa i szybka diagnostyka ma szczególne znaczenie w przypadku roślin takich jak ziemniak, których uprawy są zagrożone na całym świecie wieloma chorobami bakteryjnymi. Wśród nich największe utrudnienie diagnostyczne powodują kwarantannowe choroby ziemniaka – brunatna zgnilizna zwana potocznie śluzakiem, wywoływana przez bakterie *Ralstonia solanacearum*, oraz bakterioza pierścieniowa ziemniaka, której sprawcą jest *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Lebecka, Zimnoch-Guzowska 2005).

Diagnostyka tych chorób jest szczególnie kłopotliwa ze względu na szerokie spektrum

objawów chorobowych na roślinach i bulwach, mylonych często z objawami innych chorób ziemniaka lub suszy. Z drugiej strony tolerancja danych odmian ziemniaka na obecność komórek bakterii lub zbyt niska koncentracja komórek bakteryjnych w tkankach ziemniaka w fazie infekcji latentnej (bezobjawowej) sprawiają, że roślina nie wykazuje charakterystycznych dla patogenu objawów chorobowych (Przewodowski, Barnyk 2010).

Zgodnie z obowiązującymi wymogami fitosanitarnymi prawidłowa diagnostyka chorób kwarantannowych wymaga stosowania wiarygodnych testów opartych na metodach immunologicznych i molekularnych, w połączeniu z testami patogeniczności na roślinach wskaźnikowych (OEPP/EPPO 2006). Zazwyczaj dla postawienia wstępnej diagnozy stosuje się test immunofluorescencyjny (IFAS), natomiast dla potwierdzenia uzyskanego wyniku dodatniego, jak również rozstrzygnięcia wyniku niejednoznacznego – wysoce specyficzne i nowoczesne metody molekularne.

Test PCR i jego modyfikacje

Jedną z najczęściej używanych do identyfikacji patogenów bakteryjnych ziemniaka metod molekularnych jest test oparty na reakcji łańcuchowej polimerazy DNA (PCR). **Klasyczny test PCR**, polegający na powielaniu (amplifikacji) specyficznego fragmentu DNA, charakterystycznego dla danego rodzaju/gatunku bakterii, pozwala na uzyskanie do 10^9 kopii DNA w ciągu kilku godzin (Raszka, Ziemiańska, Wiechetek 2009). Aby namnożyć fragment DNA, należy przygotować mieszaninę reakcyjną, w której skład wchodzi:

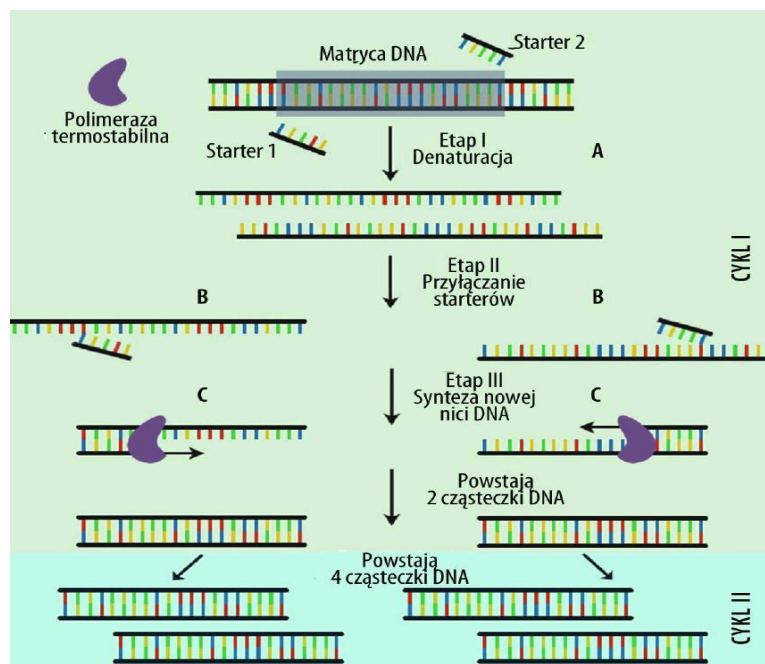
- DNA – materiał genetyczny (matryca DNA) wyizolowany z badanej próby i zawierający poszukiwany, przeznaczony do powielenia, fragment DNA (lub nie zawierający go);
- startery (ang. primery) – krótkie fragmenty DNA komplementarne do specyficznych odcinków matrycy;
- dNTP – wolne nukleotydy wykorzystywane do tworzenia nowej nici DNA;

- polimeraza DNA – odporny na wysokie temperatury enzym wyizolowany z bakterii *Thermus aquaticus* (Taq polimeraza) lub z *Pyrococcus furiosus* (polimeraza Pfu) (Adaszek, Twaróg, Winiarczyk 2009);

- bufor dla polimerazy oraz jony magnezowe Mg^{2+} będące katalizatorem reakcji PCR.

Do rozpoczęcia reakcji PCR wymagane są także specyficzne warunki temperaturowe, które może zapewnić jedynie termocykler – sprzęt umożliwiający bardzo szybką zmianę temperatur w bloku grzejmym, w którym umieszcza się próby z mieszaniną reakcyjną. Jeden cykl łańcuchowej reakcji polimerazy ma trzy etapy (rys. 1):

- inkubacja prób w temperaturze 90-95°C – rozdzielenie podwójnej nici DNA (Etap I),
- przyłączenie starterów do komplementarnej sekwencji DNA – proces zachodzi w temperaturze 40-65°C (Etap II),
- wydłużanie nici – przyłączanie kolejnych nukleotydów do nowej nici DNA. Na tym etapie próby podgrzewane są do temperatury ok. 72°C (Etap III).



Rys. 1. Schemat przebiegu reakcji PCR (Kazubek i in. 2010)

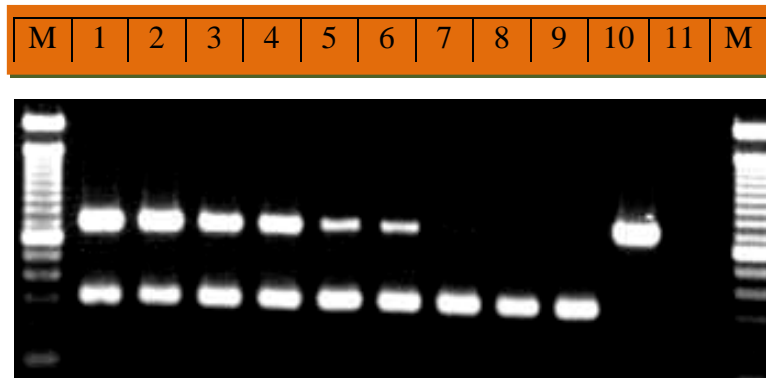
Ten 3-etapowy cykl jest powtarzany 30-40 razy. Po każdym cyklu wyjściowa liczba nici DNA jest podwajana (Palka 2007), dzięki czemu po kilkudziesięciu cyklach powstaje nawet miliard kopii powielanego fragmentu DNA. Metoda ta znalazła zastosowanie w przypadku identyfikacji zarówno bakterii *Cms*, jak i *R. solanacearum*. Reakcja PCR jest szybką i czułą metodą wykrywania patogenów roślinnych,

niestety, ma także swoje wady. W próbach pobranych ze środowiska znajduje się wiele substancji – inhibitorów polimerazy DNA (np. polisacharydy i polifenole), które mogą zahamować powielanie DNA i dać fałszywie negatywny wynik (Goerke, Bayer, Wolz 2001; Chołuj, Przewodowski 2014).

Modyfikacją testu PCR jest **Multiplex PCR**. W jednej reakcji używa się kilku par starterów, specyficznych dla różnych organizmów/patogenów, co umożliwia jednoczesne powielenie więcej niż jednego fragmentu DNA i przez to jednoczesne wykrywanie i identyfikację dwóch lub więcej gatunków patogenów. Innym przykładem jest praca Pastrik, Elphinstone i Pukall (2002), której autorzy do wykrywania *R. solanacearum* w bulwach ziemniaka użyli 2 par starterów: Rs-1-F i Rs-1-R (do wy-

krywania biotypu 2A, NCPPB 1331, *R. solanacearum*) oraz NS-5-F i NS-6-R (do wykrywania specyficznych fragmentów eukariotycznego DNA roślin). Na żelu agarozowym (rys. 2) zaobserwowali oni dwa produkty reakcji polimerazy DNA – jeden na poziomie 718 pz (świadczący o obecności DNA *R. solanacearum*), a drugi w ilości 310 pz (charakterystyczny dla DNA roślinnego). Metoda ta jest także przy-

datna do równoczesnego wykrywania kilku gatunków patogenów lub ich biotypów w jednej próbce, co znacząco skraca czas i koszt badania.



Rys. 2. Multiplex PCR z użyciem dwóch par starterów (*Rs-1-F/Rs-1-R* i *NS-5-F/NS-6-R*). 1-8: 10-krotne rozcieńczenia *R. solanacearum* w ekstrakcie z bulw zdrowych ziemniaków, począwszy od 5×10^6 do 0,5 jtk na mieszaninę PCR; 9: zdrowa próbka ziemniaczana; 10: genomowe DNA *R. solanacearum* (NCPPB 1331); 11: kontrola negatywna; M: marker (100bp ladder, Life Technologies, Germany) (Patrik, Elphinstone, Pukall 2002)

Czasem dla uzyskania potrzebnej wysokości czułości i specyficzności reakcji względem poszukiwanego patogenu używa się testu **nested PCR** (tzw. gniazdowy PCR). Jest to modyfikacja klasycznego PCR, która polega na tym, że na początku wykonuje się pierwszą reakcję PCR, a następnie przeprowadza kolejną reakcję PCR, w której stosuje się drugą parą starterów, a jako matrycy DNA używa produktu pierwszej reakcji PCR. Nested PCR pozwala na namnożenie wysoce specyficznego fragmentu DNA znajdującego się w obrębie fragmentu powielonego w pierwszej reakcji, dlatego też metoda ta zwana jest również „gniazdowym” PCR (Kowalchuk i in. 1999).

Jedną z ostatnich modyfikacji testu PCR jest PCR w czasie rzeczywistym, czyli **Real-Time PCR**. Jest to taka modyfikacja łańcuchowej reakcji polimerazy, w czasie której można na bieżąco obserwować przyrost ilości powielanego DNA. Obserwacja przyrostu produktów reakcji PCR jest możliwa dzięki zastosowaniu odpowiednich barwników fluorescencyjnych oraz termocyklera Real-Time PCR, urządzenia pozwalającego na obserwację i rejestrację danych pomiarowych w czasie trwania reakcji amplifikacji. Intensywność fluorescencji jest zależna od ilości powstającego produktu, dzięki temu można oznaczyć ilość powielonego DNA i

oszacować przybliżoną koncentrację bakterii w badanej próbce (Harms i in. 2003).

Podobnie jak w teście Multiplex-PCR także i w Real-Time PCR istnieje możliwość jednoczesnego, specyficznego wykrywania dwóch lub więcej gatunków patogenów, ich biotypów, poprzez stosowanie testu **Multiplex Real-Time PCR** (Massart, Nagy, Jijakli 2014). W tym wypadku DNA każdego z wykrywanych patogenów musi być znakowane innym barwnikiem fluorescencyjnym.

Metody hybrydyzacji DNA

Oprócz testu PCR i jego modyfikacji w identyfikacji bakterii *Cms* powszechnie stosuje się również metody hybrydyzacyjne. Są to techniki, w których krótki fragment DNA bądź RNA (tzw. sonda) łączy się, czyli hybryduje, z komplementarnym odcinkiem materiału genetycznego obecnego w badanej próbce. Aby rozpoznać powstały kompleks nici, stosuje się znakowanie sond. Wyodrębniono m.in. takie typy hybrydyzacji, jak:

- **fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (FISH)**. Obok testu IFAS jest jedną z najbardziej polecanych metod we wstępnej diagnostyce *Cms*. Polega na jednoczesnej molekularnej i immunologicznej analizie badanych bakterii. Bakterie są wykrywane dzięki stosowaniu znakowanych fluorescencyjnie oligonukleotydowych sond 16S rRNA, jak również przeciwciał specyficznych wobec

komórek *Cms*. Wynik uzyskany za pomocą mikroskopu epifluorescencyjnego pozwala jednocześnie ocenić obecność (świecenie pod mikroskopem komórek przy użyciu barwnika 1 przyłączonego do przeciwciał skierowanych na komórki *Cms*) i żywotność (świecenie komórek przy użyciu barwnika 2 przyłączonego do sondy RNA). Świecenie obu barwników świadczy o wykryciu żywych komórek *Cms*, świecenie jednego – o tym, że bakterie *Cms* są w próbie, ale są martwe. Brak świecenia jest równy wynikowi negatywnemu (Van Beuningen, Derks, Janse 1995);

- **fluorescencyjna hybrydyzacja in situ z immunofluorescencją.** Polega na jednoczesnej molekularnej i immunologicznej analizie bakterii *Cms*. Komórki bakterii są wykrywane dzięki znakowaniu dwoma różnymi barwnikami fluorescencyjnymi, tj. rodaminie – czerwonemu barwnikowi połączonemu z oligonukleotydową sondą 16S rRNA oraz fluoresceinie (FITC) – zielonemu barwnikowi skoniugowanemu z wysoce specyficznymi, monoklonalnymi przeciwciałami skierowanymi na komórki *Cms*. Wynik uzyskany za pomocą mikroskopu epifluorescencyjnego polegający na jednoczesnym świeceniu obu barwników świadczy o wykryciu żywych komórek *Cms*. Świecenie komórek na zielono świadczy o tym, że bakterie *Cms* są w próbie, ale są martwe, natomiast brak świecenia jest równy wynikowi negatywnemu (Li, De Boer, Ward 1997);

- **hybrydyzacja Southern Blot.** Polega na inkubacji DNA (przeniesionego z żelu na membranę nitrocelulozową lub nylonową) z sondami DNA o znanej sekwencji znakowanymi izotopami. Sondy są komplementarne do wykrywanego fragmentu DNA, a powstający kompleks można obserwować po wykonaniu zdjęcia rentgenowskiego membrany;

- **hybrydyzacja Northern Blot.** Polega na wykrywaniu charakterystycznych fragmentów RNA. W tym typie hybrydyzacji stosuje się sondy DNA znakowane radioaktywnie, komplementarne do transkryptu RNA. W metodzie tej można badać ekspresję pojedynczych genów (Raszka, Ziemińska, Wiechetek 2009).

Test LAMP

Coraz bardziej popularną techniką w diagnostyce bakteryjnych patogenów roślinnych jest izotermiczny **test LAMP** (Loop-Mediated Isothermal Amplification). Charakteryzuje go krótki czas trwania reakcji oraz stosowanie izotermicznych warunków podczas amplifikacji DNA. Reakcja namnażania DNA przebiega w stałej temperaturze, a do jej przeprowadzenia nie jest potrzebny termocykler, jak w przypadku klasycznego testu PCR czy Real-Time PCR. Już po kilku do kilkudziesięciu minutach ilość uzyskanego DNA oscyluje w granicach 10^9 kopii DNA (Adaszek i in. 2013). Dla porównania, tradycyjnym testem PCR taki wynik uzyskuje się zazwyczaj po kilku godzinach amplifikacji DNA. Dodatkowo technika LAMP jest bardzo specyficzna i mniej wrażliwa na inhibitory polimerazy w porównaniu z klasycznym PCR. Do reakcji używa się trzech par starterów, które hybrydując kolejno z komplementarnymi fragmentami matrycy DNA, powodują szybsze uzyskanie dużej ilości swoistego produktu.

Inne modyfikacje testu PCR stosowane w diagnostyce molekularnej bakterii kwarantannowych ziemniaka

Pomimo opracowania coraz to nowych rozwiązań diagnostycznych jednym z największych wyzwań stojących nadal zarówno przed laboratoriami analizującymi próby, jak i naukowcami opracowującymi molekularne metody diagnostyczne jest znalezienie sposobu skutecznego usuwania inhibitorów ze środowiska reakcji. Substancje te, znajdując się powszechnie w próbach środowiskowych (w tkance roślinnej, glebie i wodzie), zmniejszają czułość testu molekularnego, a w skrajnych przypadkach można otrzymać wynik fałszywie negatywny, czyli taki, w którym pomimo obecności poszukiwanych bakterii nie są one wykrywane.

Jednym z przykładów stosowania modyfikacji pozwalającej na usunięcie inhibitorów reakcji PCR jest **test filtracyjny typu Flow-Through** do szybkiej i specyficznej identyfikacji bakterii *Cms*, opracowany i opatentowany przez naukowców z Zakładu Nasiennictwa i Ochrony Ziemniaka w Boninie (Przewodowski 2012). Poprzez zastosowanie prostego, a zarazem skutecznego rozwiązania, opartego na reakcji immunokon-

centracji wykorzystującej porowate membrany, opracowano metodę pozwalającą na szybkie usunięcie inhibitorów hamujących proces amplifikacji badanego DNA przy jednoczesnym zwiększeniu czułości i specyficzności testu molekularnego (Przewodowski 2012).

Udoskonalone metody są mniej wrażliwe na inhibitory polimerazy DNA i umożliwiają efektywne wykrywanie oraz identyfikację patogenów nawet w trudnych próbach środowiskowych. Ich stosowanie daje szansę na polepszenie zdrowotności materiału sadzeniakowego i skuteczną walkę z rozprzestrzenianiem się bakterii powodujących choroby ziemniaka.

Literatura

- 1. Adaszek Ł., Twaróg D., Winiarczyk S. 2009.** Techniki molekularne w rozpoznawaniu parwowirusów psów. – *Życie Weter.* 84(5): 385-388;
- 2. Adaszek Ł., Jankowska M., Wyłupek D., Winiarczyk S. 2013.** Przydatność techniki LAMP w szybkim rozpoznawaniu babeszjozy u zwierząt. – *Med. Weter.* 69(3): 145-149;
- 3. Boonham N., Tomlinson J., Mumford R. 2016.** *Molecular Methods in Plant Disease Diagnostics - Principles and Protocols.* CABI, 2016; DOI: 10.1111/ppa.12560;
- 4. Chołuj J., Przewodowski W. 2014.** Technika PCR i jej modyfikacje w identyfikacji patogenów ziemniaka. – *Ziemn. Pol.* 3: 40-45;
- 5. Gorerke C., Bayer M. G., Wolz C. 2001.** Quantification of bacterial transcripts during infection using competitive reverse transcription-PCR (RT-PCR) and LightCycler RT-PCR. – *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8(2): 279-282;
- 6. Harms G., Layton A., Dionisi H., Gregory I., Garrett V., Hawkins S., Robinson K., Saley G. 2003.** Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal water treatment plant. – *Environ. Sci. Technol.* 37(2): 343-351;
- 7. Kazubek M., Długosz A., Pawlik K. 2010.** Zastosowanie technik PCR w toksykologii. – *Post. Hig. Med. Dośw.* 64: 482-489;
- 8. Kowalchuk G. A., Naoumenko Z. S., Derikx P. J. L., Felske A., Stephen J. R., Arkhipchenko I. A. 1999.** Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β subdivision of the class *Proteobacteria* in compost and composted materials. – *Appl. Environ. Microbiol.* 65(2): 396-403;
- 9. Lebecka R., Zimnoch-Guzowska E. 2005.** Choroby bakteryjne ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) – strategie ochrony. – *Biul. IHAR* 237/238: 161-168;
- 10. Li X., De Boer S. H., Ward L. J. 1997.** Improved microscopic identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* cells by combining in situ hybridization with immunofluorescence. – *Letters Appl. Microbiol.* 24: 431-434;
- 11. Massart S., Nagy C., Jijakli M. H. 2014.** Development of the simultaneous detection of *Ralstonia solanacearum* race 3 and *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by a multiplex real-time PCR assay. – *Eur. J. Plant Pathol.* 138: 29-37;
- 12. Palka R. 2007.** Zastosowanie osiągnięć biologii molekularnej w mikrobiologii żywności. – *Przem. Spoż.* 2: 6-8;
- 13. Pastrik K. H., Elphinstone J. G., Pukall R. 2002.** Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification of 16S-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control. – *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 831-842;
- 14. OEPP/EPPO 2006.** *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. – *Bull. OEPP* 36: 99-109;
- 15. Przewodowski W. 2012.** Sposób wykrywania obecności bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* z wykorzystaniem membran zawierających immobilizowane przeciwciała. Patent UP RP nr 213857;
- 16. Przewodowski W., Barnyk A. 2010.** Nowe metody diagnostyczne do wykrywania fitopatogennych bakterii ziemniaka. – *Ziemn. Pol.* 1: 1-4;
- 17. Raszka A., Ziemińska A., Wiechetek A. 2009.** Metody i techniki biologii molekularnej w biotechnologii środowiskowej. – *Czas. Tech. Środ.* 2-Ś: 101-114;
- 18. Van Beuningen A. R., Derks H., Janse J. D. 1995.** Detection and identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* with special attention to fluorescent in situ hybridization (FISH) using a 16S rRNA targeted oligonucleotide probe. – *Zücht. Forsch.* 1(2): 266-269