

WPŁYW SOKU Z BULW ZIEMNIAKA NA CZUŁOŚĆ WYKRYWANIA KWARRANTANNOYCH BAKTERII *RALSTONIA SOLANACEARUM* (SPRAWCY BRUNATNEJ ZGNILIZNY ZIEMNIAKA) KLASYCZNYM TESTEM PCR

EFFECT OF POTATO TUBER SAP ON THE SENSITIVITY OF DETECTION OF QUARANTINE BACTERIA *RALSTONIA SOLANACEARUM* (THE CULPRIT OF BROWN ROT IN POTATOES) USING THE CLASSIC PCR TEST

mgr inż. Katarzyna Salamońska, mgr inż. Dorota Szarek
dr hab. inż. Włodzimierz Przewodowski, dr inż. Małgorzata Łabańska
IHAR-PIB Oddział w Boninie, Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Biochemii
e-mail: k.salamonska@ihar.edu.pl

Streszczenie

Brunatna zgnilizna ziemniaka jest chorobą kwarantannową wymagającą czulej, szybkiej i specyficznej diagnostyki. Jedną z bardziej skutecznych metod wykrywania bakterii *R. solanacearum* jest molekularny test PCR. Przedstawiono metodę izolacji DNA, która umożliwia usunięcie inhibitorów polimerazy DNA znajdujących się m.in. w soku z bulw ziemniaka. Efektem obecności tych związków w badanej próbce DNA może być fałszywie negatywny wynik testu. Na podstawie otrzymanych rezultatów stwierdzono skuteczność opisanego sposobu izolacji DNA do wykrywania bakterii *R. solanacearum*. Uzyskano porównywalne wyniki klasycznego testu PCR z DNA izolowanego z bakterii zawieszonych w soku z bulw ziemniaka oraz z zawiesin w wodzie – bez inhibitorów reakcji PCR. Dzięki opracowanej metodzie izolacji DNA czułość testu PCR osiągnęła stosunkowo wysoki poziom wykrywania 5-15 komórek bakteryjnych w badanej próbce.

Słowa kluczowe: brunatna zgnilizna ziemniaka, diagnostyka, PCR, *Ralstonia solanacearum*, śluzak

Abstract

Brown rot of potato is a quarantine disease that requires sensitive, quick, and specific diagnostics. One of the most effective methods of detecting *R. solanacearum* is the molecular PCR test. The paper presents a DNA isolation method that enables the removal of DNA polymerase inhibitors occurring in plant extracts, including the sap from potato tubers. The presence of these compounds in the tested DNA sample may result in a false-negative diagnosis. The described method of DNA isolation was effective for the detection of *R. solanacearum*. The classic PCR test results with DNA isolated from bacteria suspended in potato tuber sap were comparable to those from controls suspended in water - without PCR inhibitors. Thanks to the developed method of DNA isolation, the sensitivity of the PCR test reached a relatively high level of detection of 5-15 bacterial cells in the tested sample.

Keywords: brown rot, diagnostics, PCR, *Ralstonia solanacearum*

R*alstonia solanacearum* jest niebezpiecznym patogenem roślin, porażającym ok. 200 gatunków (Hayward 1991). Przyczynia się do strat gospodarczych na całym świecie (Maćkowiak-Sochacka, Borodynsko-Filas 2018). Taksonomicznie jest to zespół spokrewnionych gatunków, wśród których wyodrębniono cztery filotypy, różniące się m.in. pochodzeniem i gospoda-

rzem. Filotyp II wywołuje choroby takie jak brunatna zgnilizna ziemniaka (śluzak) oraz bakteryjne więdnienie pomidora (OEPP 2018). *R. solanacearum* została wpisana na listę A2 Europejskiej i Śródziemnomorskiej Organizacji Ochrony Roślin (OEPP/EPPO), co wiąże się z obowiązkiem zwalczania tego patogenu z urzędu przez wszystkie kraje członkowskie EPPO (OEPP 2011).

Dużym problemem w przypadku *R. solanacearum* jest jej przeżywalność w środowisku. Patogen ten potrafi przeżyć w wodzie o odpowiedniej temperaturze (20-25°C) nawet 40 lat. Dodatkowo sprawca śluzaka może zasiedlać bezobjawowo tkanki chwastów, porażonych roślin i bulw (Denny 2007). Jak dotąd nie opracowano w pełni skutecznych środków chemicznych ani biologicznych, służących do zwalczania chorób wywołanych przez ten patogen (Maćkowiak-Sochacka, Borodynko-Filas 2018). Jednym ze skutecznych sposobów walki z rozprzestrzenianiem się bakterii jest profilaktyka polegająca na stosowaniu zdrowego materiału siewnego.

Aby mieć pewność, że materiał sadzeniowy jest wolny od *R. solanacearum*, konieczna jest odpowiednia diagnostyka. Aby uzyskać wiarygodny wynik, zgodnie z zaleceniami EPPO należy wykonać co najmniej dwa testy opierające się na różnych zasadach działania, np. test molekularny – PCR (ang. Polymerase Chain Reaction) lub Real-time PCR i test immunofluorescencyjny – IF (ang. Immunofluorescence) (Dyrektywa 2006/63/WE). Z uwagi na swoje zalety, takie jak wysoka specyficzność i czułość, coraz częściej do wykrywania *R. solanacearum* używa się metod molekularnych. Niestety, pomimo wielu zalet mają one także wady. Jedną z nich jest wrażliwość enzymu polimerazy DNA używanego w teście PCR na substancje hamujące (inhibitory) występujące w tkance roślinnej. Ich obecność może skutkować zafałszowaniem wyniku testu molekularnego. Bardzo ważnym etapem jest więc przygotowanie odpowiednio oczyszczonego

materiału genetycznego, czyli opracowanie metody izolacji kwasów nukleinowych, która umożliwi całkowite usunięcie niechcianych komponentów z badanej tkanki roślinnej, np. rośliny lub bulwy ziemniaka.

Celem niniejszej pracy była ocena skuteczności izolacji DNA (kwasu dezoksyrybonukleinowego) z bakterii *R. solanacearum* zawieszanej w soku z bulw ziemniaka oraz ocena wpływu soku na czułość ich wykrywania za pomocą testu PCR.

Materiały i metody

W badaniach zastosowano metodę izolacji DNA opierającą się na użyciu wysokich stężeń soli w obecności enzymu proteolitycznego (enzym rozkładający białka). Materiał stanowiły dwa referencyjne szczepy bakterii *Ralstonia solanacearum* (NCPBP 4029 i NCPBP 4156). Do identyfikacji tych szczepów za pomocą reakcji PCR użyto dwóch par starterów zalecanych wg dyrektywy 2006/63/WE: Oli-1/Y-2 (Seal i in. 1993) i Ps-1/Ps-2 (Patrik, Maiss 2000).

Badania rozpoczęto od sporządzenia mianowanych zawiesin ze szczepów bakterii *R. solanacearum*. Zawiesiny (1,5 ml) rozdzielono do probówek eppendorf i podzielono na dwie równe porcje. Jedną z nich uzupełniono sterylną wodą do wyjściowej objętości, a do drugiej dodano równą objętość uprzednio przygotowanego soku z bulw ziemniaka odmiany Cyprian. Sok przygotowano ze zdrowej bulwy ziemniaka, umytej i osuszonej. Bulwę starto na tarce i przesączono przez fizele. Przygotowane próby o objętości 1,5 ml użyto do dalszych badań.

Zestawienie starterów do wykrywania bakterii *R. solanacearum*

Nazwa startera	Sekwencje od końca 5' -> 3'	Końcowy produkt
Oli-1	GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC	288 bp
Y-2	CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT	
Ps-1	AGTCGAACGGCAGCGGGGG	553 bp
Ps-2	GGGGATTCACATCGGTCTTGCA	

bp – para zasad (ang. base pair)

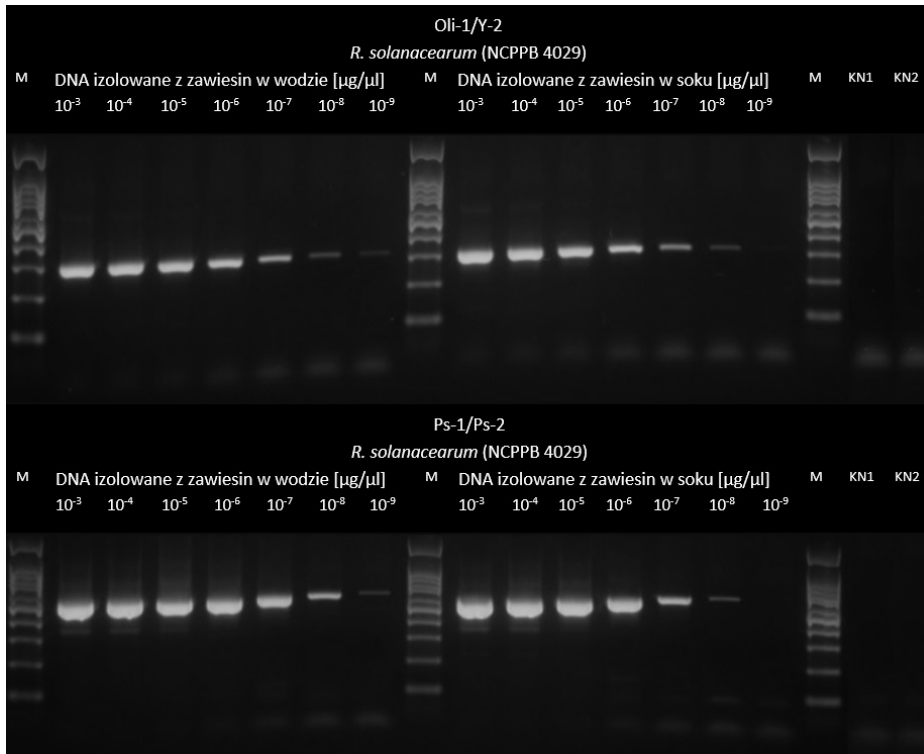
Zawiesiny z bakteriami *R. solanacearum* w wodzie i w soku wirowano w wirówce laboratoryjnej, następnie odebrano supernatant, pozostawiając 200 µl nad osadem. Dodano jedną objętość buforu Tris-Cl pH 8,0 (chlorowodorek

Tabela 1

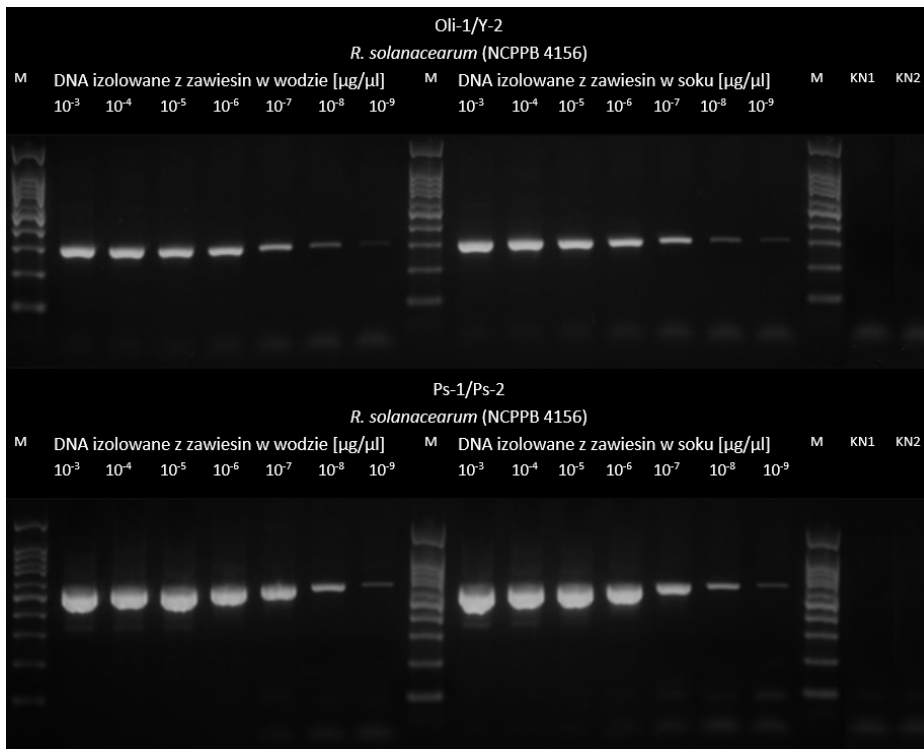
tri(hydroksymetylo)aminometanu) zawierającego NaCl (chlorek sodu) i EDTA (kwas etylenodiaminotetraoctowy). Następnie dodano 20-proc. roztwór SDS (dodecylosiarczan sodu) oraz proteinazę K i inkubowano w 50°C przez noc. Do prób dodano NaCl, zwortekowano 30 sekund na maksymalnych obrotach i zwirowano. Supernatant przeniesiono do nowych probówek i dodano po 1 objętości zimnego izopropanolu oraz barwnik

RotiPink. Próby dokładnie wymieszano i umieszczono na 0,5 godziny w -20°C . Po wyjęciu z zamrażarki wirowano ponownie w wirówce laboratoryjnej z chłodzeniem. Osad przepłukano 70-proc. etanolem, który następnie odebrano, a jego pozostałość usunięto, odciągając pipetą z końcówką kapilarną oraz poprzez suszenie w temperaturze 55°C w

termobloku. Do osuszonego osadu dodano odpowiednią objętość sterylnej wody i umieszczono w 4°C .



Rys. 1. Elektroforegram produktów PCR namnażanych za pomocą dwóch par starterów z DNA izolowanego z zawiesin szczepu *R. solanacearum* (NCCPB 4029) w obecności wody i soku z ziemniaka; M – marker Nova 100bp DNA ladder, KN1 – kontrola negatywna z wody, KN2 – kontrola negatywna z soku z ziemniaka



Rys. 2. Elektroforegram produktów PCR namnażanych za pomocą dwóch par starterów z DNA izolowanego z zawiesin szczepu *R. solanacearum* (NCCPB 4156) w obecności wody i soku z ziemniaka; M – marker Nova 100bp DNA ladder, KN1 – kontrola negatywna z wody, KN2 – kontrola negatywna z soku z ziemniaka

Wyzolowane DNA ze wszystkich prób doprowadzono do jednakowej koncentracji 0,1 µg/µl. Następnie wykonano serię rozcieńczeń dziesiętnych, uzyskując stężenia w zakresie od 10^{-3} do 10^{-9} µg/µl. Z każdego rozcieńczenia DNA dodano po 5 µl do reakcji PCR przeprowadzonej z użyciem dwóch par starterów: Oli-1/Y-2 (Seal i in. 1993) i Ps-1/Ps-2 (Patrik, Maiss 2000) – tabela 1. Skuteczność izolacji DNA z wody i soku bulw ziemniaka oceniano na podstawie obecności otrzymanych produktów PCR w żelu agarozowym (rys. 1 i 2).

Wyniki i dyskusja

Obecność bakterii kwarantannowych jest powodem do urzędowego zakazu uprawy ziemniaków przez pięć lat i niesie za sobą obowiązek utylizacji bulw w określony sposób. Oba te czynniki mogą doprowadzić do upadku małych producentów i stanowić poważne utrudnienie dla większych. Ponadto bakteria często nie wywołuje widocznych objawów ani na roślinach, ani na bulwach. Dlatego ważne jest, by metody diagnostyczne stosowane do jej wykrywania były szybkie w wykonaniu, miały wysoką czułość i specyficznie identyfikowały wykrywany patogen. Jedną z takich metod jest klasyczny test PCR, którego wynik w dużym stopniu zależy od jakości i czystości wyizolowanego DNA.

W próbach pochodzenia roślinnego znajduje się dużo naturalnych związków, takich jak: polisacharydy, polifenole, inhibitory proteaz oraz inne metabolity wtórne, które mogą hamować aktywność polimerazy – enzymu niezbędnego do przeprowadzenia reakcji PCR. Jeżeli takie inhibitory będą obecne w badanym DNA, reakcja PCR nie zajdzie i próba z roślin chorych zostanie fałszywie oceniona jako wolna od bakterii (Przewodowski i in. 2015). Ponadto jakość wyekstrahowanego DNA może być obniżona przez utleniające się podczas homogenizacji bulw związki fenolowe, które tworzą trwałe kompleksy z białkami i kwasami nukleinowymi, obniżając ich wykrywalność (Porębski i in. 1997). W ten sposób może dochodzić do wyniku fałszywie negatywnego, gdyż mimo obecności bakterii w próbce pozostają one niewykryte.

W niniejszej pracy zastosowano jedną metodę izolacji DNA na dwóch różnych

szczepach bakterii *Ralstonia solanacearum* izolowanych w obecności soku z ziemniaka oraz w obecności wody, jako próby porównawczej. Pozwoliło to na sprawdzenie, czy zastosowana metoda izolacji nadaje się do identyfikacji bakterii kwarantannowych z bulw ziemniaka.

Oba szczepy bakterii *R. solanacearum* wykrywano z wysoką czułością za pomocą testu PCR. Dla DNA izolowanego ze szczepu NCPPB 4029 w obecności wody bakterię wykryto we wszystkich badanych rozcieńczeniach od 10^{-3} do 10^{-9} µg/µl zarówno za pomocą starterów Oli-1/Y-2, jak i Ps-1/Ps-2. W przypadku DNA izolowanego z zawiesin zawierających sok z bulw ziemniaka czułość była niższa o rząd wielkości i bakterię wykrywano do rozcieńczenia 10^{-8} µg/µl (rys. 1). W reakcji PCR DNA szczepu NCPPB 4156 wykryto we wszystkich badanych rozcieńczeniach za pomocą obu par starterów i w obu wariantach zawiesin (woda i sok) – rysunek 2.

Z uwagi na wymóg zerowej tolerancji wobec *R. solanacearum* w badanych bulwach wysoka czułość wykrywania DNA tej bakterii wskazuje na przydatność zastosowanej metody izolacji DNA do jej wykrywania. DNA izolowane za pomocą metody wysokosolnej nie zawierało inhibitorów reakcji PCR lub ich stężenie było za niskie, by hamować reakcję, ponieważ specyficzny produkt amplifikacji obserwowano na żelach agarozowych nawet dla prób o bardzo niskiej koncentracji DNA. Ponadto obie pary starterów zastosowane w badaniach wykryły oba szczepy patogenu na tym samym wysokim poziomie.

Obserwowano niewielki hamujący wpływ soku z bulw ziemniaka na wykrywanie szczepu NCPPB 4029 (rys. 1). W tym wypadku czułość wykrywania nadal była wysoka, gdyż specyficzny produkt reakcji PCR obserwowano do rozcieńczenia DNA o koncentracji 10^{-8} µg/µl (10 femtogramów DNA w 1 µl). Dla tego szczepu czułość wykrywania w próbach kontrolnych, rozcieńczanych wodą, wyniosła 10^{-9} µg/µl (1 femtogram DNA w 1 µl roztworu wodnego).

Uzyskane wyniki świadczą o tym, że stosując metodę wysokosolną, można wiarygodnie wykrywać *R. solanacearum* bezpośrednio w bulwach, ponieważ specyficzny produkt reakcji PCR powstawał w próbach z

sokiem dla obu badanych szczepów po dodaniu do reakcji femtogramowych ilości DNA. Biorąc pod uwagę, że komórka bakteryjna waży ok. 100-150 femtogramów (Burg i in. 2007), a genom *R. solanacearum* ok 3,54 femtograma, opracowana metodyka pozwala prawdopodobnie na wykrycie od pięciu do piętnastu komórek bakterii w próbach izolowanych z bulw.

Wnioski

1. Oceniana metoda izolacji sprawdziła się zarówno w przypadku zawiesin izolowanych w obecności wody, jak i ekstraktu roślinnego, wobec tego może być stosowana dla prób z bulw ziemniaka.
2. Zarówno startery Oli-1/Y-2, jak i Ps-1/Ps-2 pozwoliły wykryć obecność obu szczepów.
3. Dla szczepu *R. solanacearum* NCPPB 4156 udało się uzyskać maksymalną czułość testu PCR w obecności wody i soku z ziemniaka.
4. W przypadku *R. solanacearum* NCPPB 4029 uzyskano pełny zakres czułości dla prób izolowanych z wody, natomiast nieznaczny spadek czułości dla zawiesin izolowanych w obecności tkanki roślinnej.
5. Opracowana metodyka pozwala na wykrycie 5-15 komórek bakterii w jednej próbie.

Literatura

1. Burg T. P., Godin M., Knudsen S. M., Shen W., Carlson G., Foster J. S., Manalis S. R. 2007. Weighing of biomolecules, single cells and single nanoparticles in fluid. – *Nature* 446(7139): 1066-1069;
 2. Denny T. 2007. Plant Pathogenic *Ralstonia* species. [In:] Plant-associated bacteria. Springer. Dordrecht:

573-644; 3. Dyrektywa Komisji 2006/63/WE z dn. 14 lipca 2006 r. zmieniająca załączniki II-VII do dyrektywy Rady 98/57/WE z dn. 20 lipca 1998 r. w sprawie kontroli organizmu *Ralstonia solanacearum* (Smith). Yabuuchi i in.: 86-87; 4. Hayward A. C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. – *Ann. Rev. Phytopathol.* 29: 65-87; 5. Maćkowiak-Sochacka A., Borodynko-Filas N. 2018. The effectiveness of selected products used for disinfection of surfaces contaminated with *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Skuteczność wybranych preparatów w dezynfekcji powierzchni skażonych bakteriami *Ralstonia solanacearum* i *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. – *Prog. Plant Prot.* 58(4): 294-299; 6. OEPP 2011. *Ralstonia solanacearum*. – *Bull. OEPP* 41: 389-393; 7. OEPP 2018. *Ralstonia solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* and *R. syzygii* (*Ralstonia solanacearum* species complex). – *Bull. OEPP* 48(1): 32-63; 8. Pastrik K. H., Maiss E. 2000. Detection of *R. solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. – *J. Phytopathol.* 148(11-12): 619-626; 9. Połębski S., Bailey L. G., Baum B. R. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. – *Plant Mol. Biol. Rep.* 15 (1): 8-15; 10. Przewodowski W., Chołuj J., Przewodowska A. 2015. Influence of different methods of bacterial nucleic acid isolation on sensitivity of the PCR assay. Wpływ różnych sposobów izolacji kwasów nukleinowych z bakterii na czułość testu PCR. – *Prog. Plant Prot.* 55(3): 321-326; 11. Seal S. E., Jackson L. A., Young J. P. W., Daniels M. J. 1993. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas picketti* and Blood Disease Bacterium by partial 16s rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. – *J. Gen. Microbiol.* 139: 1587-1594

