

FRANCHESKA NEVOIGT, TOMASZ OSZAKO, JUSTYNA A. NOWAKOWSKA

Monitorowanie chorób wywołanych przez patogeniczne lęgniowce za pomocą analiz DNA*

Monitoring of diseases caused by pathogenic oomycetes using DNA analysis

ABSTRACT

Nevoigt F., Oszako T., Nowakowska J. A. 2010. Monitorowanie chorób wywołanych przez patogeniczne lęgniowce za pomocą analiz DNA. Sylwan 154 (7): 450-455.

Phytophthora species are best known as pathogens of agricultural crops (e.g. *P. infestans*), but there are also invasive pathogens destroying forest atands (e.g. *P. ramorum* in the USA) or even whole forest ecosystems (e.g. *P. cinnamomi* in Australia). Still, little is known about indiginous species, especially in wild ecosystems. Rhododendrons are well known as a reservuar for oomycetes' development. The main objectives of the present study were to develop the new tool for the identification of pathogenic *Phytophthora* and *Phytium* based on DNA sequence analysis of the ITS1, 5.8S gene and ITS2 region. Rhododendrons leaves served as specific plant baits. In order to reach the goal the real time PCR, the nested PCR and the DNA sequencing of the rDNA ITS region were carried out. The genomic DNA was extracted form the symptomatic rhododendron leaves. Three distinct *Oomycetes* species: *Phytophthora cactorum*, *Pythium mercuriale* and *Pythium recalcitrans* were detected in rhododendron leaves and registered in GenBank.

KEY WORDS

Phytophthora spp., real time PCR, ITS-DNA molecular diagnostics, baiting, rhododendrons

ADDRESSES

Francheska Nevoigt ⁽¹⁾

Tomasz Oszako ⁽¹⁾ – e-mail: t.oszako@ibles.waw.pl

Justyna A. Nowakowska ⁽²⁾ – e-mail: j.nowakowska@ibles.waw.pl

⁽¹⁾ Zakład Ochrony Lasu, Instytut Badawczy Leśnictwa; ul. Braci Leśnej 3; Sękocin Stary, 05-090 Raszyn

⁽²⁾ Zakład Hodowli Lasu i Genetyki Drzew Leśnych; Instytut Badawczy Leśnictwa, ul. Braci Leśnej 3; Sękocin Stary, 05-090 Raszyn

Wstęp

Lęgniowce (*Oomycetes*) rodzaju *Phytophthora* i *Phytium* są ważnymi patogenami zarówno roślin uprawianych w rolnictwie, jak i gatunków lasotwórczych [Belbahri i in. 1999, 2001; Roetschi i in. 2001; Racape i in. 2005; Riedel i in. 2009]. W warunkach naturalnych patogeny te atakują i rozwijają się na liściach różaneczników. Stanowią one swoisty rezerwuar różnych gatunków *Phytophthora*, niekiedy bardzo groźnych, jak *P. ramorum* czy *P. kernoviae*, które to po raz pierwszy odkryto właśnie na liściach różaneczników. Szybka i precyzyjna identyfikacja niektórych gatunków *Phytophthora* była już opisana przez wielu autorów [Belbahri i in. 2006a, b; Paul i in. 2006, 2008; Chavarriaga i in. 2007; Moralejo i in. 2008a, b, 2009].

Celem podjętych badań było opracowanie procedur (np. projektowanie specyficznych starterów do reakcji qPCR) i ich przetestowanie jako nowej metody do monitorowania patogenicznych

* Badania wykonano w ramach grantu MNiSW nr 452721

lęgniowców. W niniejszym opracowaniu przedstawiono wyniki identyfikacji patogenów rodzaju *Phytophthora* i *Pythium* znalezionych na symptomatycznych liściach różaneczników, pochodzących z kolekcji Instytutu Dendrologii Polskiej Akademii Nauk w Kórniku oraz Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie (ryc. 1). W porażonych tkankach liści analizowano cząsteczki genomowego DNA (zarówno rośliny, jak i patogenów), po czym poddano je amplifikacji PCR. W tym celu zastosowano nowoczesną metodę detekcji z wykorzystaniem reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. real time PCR). Umożliwia ona ciągłą obserwację reakcji amplifikacji (i korektę liczby cykli), a tempo reakcji świadczyć może o stopniu patogeniczności, jako że jest proporcjonalne do ilości DNA patogena stwierdzonego w roślinie. W przyjętej strategii badań, do analiz użyto specyficznych dla *Phytophthora* oligonukleotydowych starterów, komplementarnych do rybosomalnych sekwencji DNA patogenów [Belbahri i in. 2007].

Materiał i metody

Amplifikację charakterystycznych dla lęgniowców genów przeprowadzono za pomocą uniwersalnych starterów ITS4 i ITS5, komplementarnych do sekwencji 18S i 28S rybosomalnego DNA [White i in. 1990]. Mieszanina reakcyjna zawierała następujące komponenty: bufor PCR $\times 1$ (75 mM Tris-HCl pH 9,0; 50 mM KCl, 20 mM $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$); 0,1 mM dNTPs, 0,25 μM każdego startera, 1,5 mM MgCl_2 , 1 U Taq polimerazy oraz 1 μl DNA z izolatu, w końcowej objętości 50 μl . Reakcję PCR przeprowadzono w aparacie Gradient Thermocycler (Eppendorf, Niemcy), zaprogramowanym na wstępną denaturację próbek w 95°C (2 min), a następnie 30 cykli, z których każdy składał się z następujących etapów: denaturacja w 95°C (20 s), przyłączenie starterów w 55°C (25 s) i elongacja fragmentów w 72°C (50 s). Końcowe wydłużanie powielonych fragmentów trwało 10 minut i było przeprowadzane w temperaturze 72°C [Belbahri i in. 2008a, b]. Produkty PCR rozdzielano następnie w 1% żelu agarozy, podczas godzinnej elektroforezy w buforze TBE $\times 1$, pod napięciem 100V. Żel wybarwiano bromkiem etydyny (0,5 mg/l) i fragmenty DNA wizualizowano w świetle UV.



Ryc. 1.

Drobne brunatne plamy na liściach różaneczników jako konsekwencja porażenia przez patogeny

Small brownish spots on rhododendrons leaves as a consequence of pathogenic infections

Próbki tkanek pobrane z zainfekowanych roślin (wycięte fragmenty blaszek z plamami – ryc. 1) mogły zawierać DNA innych patogenów oraz rośliny-gospodarza, dlatego poddano je wstępnej amplifikacji stosując tzw. „zlokalizowany PCR” (nested PCR), dodając startery DC6 i ITS4, pomocne w identyfikacji patogenów rzędów *Pythiales* i *Peronosporales*. Zlokalizowana reakcja PCR przebiegała w takich samych warunkach jak opisana powyżej, jedynie objętość mieszaniny reakcyjnej zmniejszono do 25 μl i dodano startery DC6 i ITS4. Po amplifikacji, pobierano 1 μl końcowych fragmentów namnożonego DNA i powtarzano reakcję PCR według opisu ze starterami ITS4 i ITS5.

W przypadku techniki real time PCR, odczytywano krzywe namnażania produktów PCR po każdym

cyklu amplifikacji w aparacie PTC-200™ (MJ Research). Ilość kopii badanej cząsteczki kwasu nukleinowego była monitorowana w każdym cyklu reakcji amplifikacji, dzięki znakowaniu fluoroforem SYBR® Green (BioRad), który emituje światło w przypadku połączenia się z dwuniciowym DNA. Liczba cykli reakcji PCR, po których poziom fluorescencji przekroczy zdefiniowany próg (najczęściej jest to moment wejścia kinetyki reakcji w fazę logarytmicznego przyrostu ilości produktu), jest stosowana do obliczenia ilości badanych cząsteczek DNA obecnych w mieszaninie na początku reakcji, charakterystycznych dla danej grupy patogenów [Nowakowska 2007]. W naszych badaniach, reakcja real time PCR była wykorzystana w celu identyfikacji próbek, w których namnożone fragmenty DNA odpowiadały genetycznej charakterystyce lęgniowców.

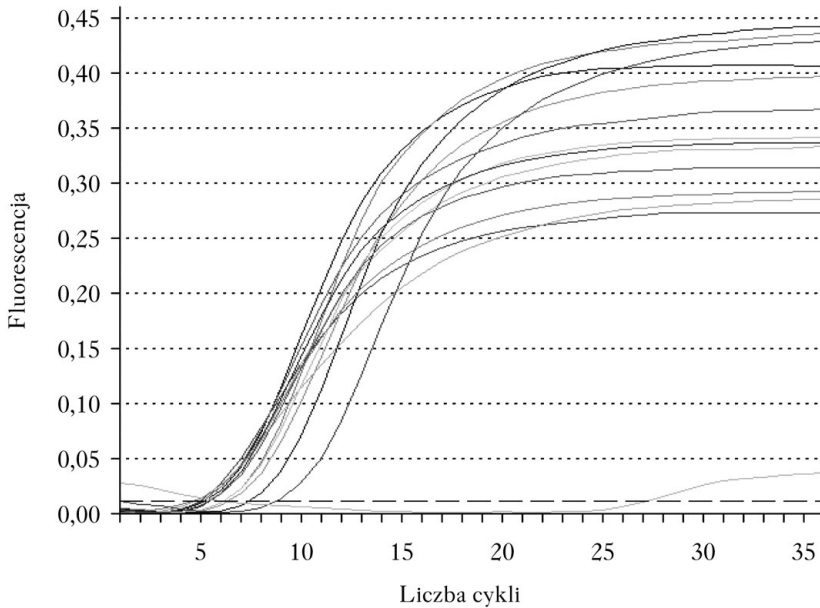
Otrzymane fragmenty DNA po amplifikacji w reakcji PCR w czasie rzeczywistym oczyszczano za pomocą zestawu Minelute PCR Purification Kit (Qiagen) według zaleceń producenta i poddawano analizie spektrofotometrycznej w aparacie NanoDrop® ND-1000 (Wilmington, USA), określając czystość i ilość otrzymanego DNA w ng/μl. Następnie, dla każdego z amplifikowanych fragmentów DNA patogenów przeprowadzono dwukrotną reakcję sekwencjonowania w automatycznym sekwenatorze CEQ 8000 (Beckman-Coulter®), stosując zestaw DTCS Quick Start Master Mix CEQ (Beckman Coulter®, Fullerton, USA) według zaleceń producenta. Otrzymaną sekwencję konsensus rejestrowano w internetowej bazie danych GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Wyniki i dyskusja

Dotychczasowa ocena zdrowotności materiału leśnego odbywała się w Polsce na podstawie obserwacji zmian chorobowych powstałych na skutek infekcji w roślinie. Zastosowanie nowoczesnej metody detekcji patogenów *Phytophthora*, opartej na pułapkowaniu patogenów na liściach różanecznika, ekstrakcji DNA oraz reakcji PCR umożliwiło wykrycie trzech gatunków lęgniowców. Zmiany fluorescencji zachodzące podczas reakcji real time PCR przeprowadzonej dla DNA pochodzącego z badanych liści różaneczników, umożliwiły wyróżnienie próbek, w których znajdowały się fragmenty DNA charakterystyczne dla patogenicznych gatunków *Phytophthora* (ryc. 2). Na podstawie rozdziału elektroforetycznego, potwierdzano dla tych prób obecność fragmentów DNA, charakterystycznych dla lęgniowców (niez zilustrowane). Dalej, próbki te poddano sekwencjonowaniu w celu precyzyjnej identyfikacji gatunku. Na podstawie sekwencjonowania stwierdzono, że badane liście różaneczników zawierały sześć wariantów sekwencji DNA, spośród których jedna sekwencja (zarejestrowana w internetowym Banku Genów pod numerem EF126357) była charakterystyczna dla *Phytophthora cactorum*, dwie (EF126355 i EF126354) – dla *Pythium mercuriale*, a trzy (EF126353, EF126352 i EF126350) – dla *Pythium recalcitrans*.

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że pobrane do analiz liście różanecznika mogą być z powodzeniem stosowane jako pułapki roślinne patogenów grupy *Oomycetes* oraz do ich szybkiej i precyzyjnej identyfikacji za pomocą technik molekularnych.

Identyfikacja patogenów prowadzona za pomocą tradycyjnej reakcji PCR jest pracochłonna (konieczne jest wykonanie elektroforezy) i wymaga pracy w warunkach sterylnych, aby zapobiec zanieczyszczeniu próbek pomiędzy sobą, co może doprowadzić do uzyskania fałszywych wyników podczas identyfikacji gatunkowej. Jak wykazały wyniki innych badań, zastosowanie fluorescencyjnych znaczników w reakcji PCR w czasie rzeczywistym pozwala uniknąć tego ryzyka i umożliwi precyzyjną detekcję patogenów w roślinie [Belbahri i in. 2007].



Ryc. 2.

Detekcja amplifikacji charakterystycznych fragmentów DNA, świadczących o obecności badanych patogenów rodzaju *Phytophthora* i *Pythium* w reakcji real time PCR

Changes of fluorescence during real time PCR that show presence of DNA characteristic for *Phytophthora* and *Pythium* pathogens

Wnioski

- ✦ Przedstawione wyniki badań wskazują na obecność patogenicznych gatunków *Phytophthora* i *Pythium* na badanych różanecznikach pochodzących z kolekcji Instytutu Dendrologii PAN w Kórniku i SGGW w Warszawie.
- ✦ Zastosowanie reakcji PCR w czasie rzeczywistym oraz sekwencjonowanie fragmentów DNA po zlokalizowanej reakcji PCR pozwoliło na identyfikację trzech gatunków patogenów: *Phytophthora cactorum*, *Pythium mercuriale* i *Pythium recalcitrans*. Jest to szybka i precyzyjna identyfikacja na podstawie wybranych regionów rybosomalnego DNA.
- ✦ Liście różanecznika mogą być z powodzeniem stosowane do pułapkowania organizmów z klasy *Oomycetes* w środowisku leśnym.
- ✦ Różaneczniki jako rośliny podatne na atak lęgniowców (wektory choroby) nie powinny być wysadzone w szkółkach leśnych (np. w pasach przeciwwietrznych) oraz na terenach leśnych (np. w ogrodach wokół budynków nadleśnictw lub leśnictw).

Podziękowania

Autorzy dziękują prof. dr. hab. Zbigniewowi Sierocie (IBL) za pomoc w realizacji badań oraz za owocne dyskusje nad aspektem praktycznym otrzymanych wyników.

Literatura

- Belbahri L., Boucher C., Candresse T., Nicole M., Ricci P., Keller H. 2001. A local accumulation of the *Ralstonia solanacearum* PopA protein in transgenic tobacco renders a compatible plant-pathogen interaction incompatible. *Plant Journal* 28: 419-430.

- Belbahri L., Calmin G., Mauch F., Andersson J. O. 2008a. Evolution of the cutinase gene family: Evidence for lateral gene transfer of a candidate *Phytophthora* virulence factor. *Gene* 408: 1-8. DOI: 10.1016/j.gene.2007.10.019.
- Belbahri L., Calmin G., Sanchez-Hernandez E., Oszako T., Lefort F. 2006a. *Pythium sterilum* sp nov isolated from Poland, Spain and France: its morphology and molecular phylogenetic position. *Fems Microbiology Letters* 255 (2): 209-214.
- Belbahri L., Calmin G., Wagner S., Moralejo E., Woodward S., Lefort F. 2007. Specific hybridization real-time PCR probes for *Phytophthora ramorum* detection and diagnosis. *Forest Pathology* 37: 403-408. DOI: 10.1111/j.1439-0329.2007.00517.x.
- Belbahri L., McLeod A., Paul B., Calmin G., Moralejo E., Spies C. F. J., Botha W. J., Clemente A., Descals E., Sanchez-Hernandez E., Lefort F. 2008b. Intraspecific and within-isolate sequence variation in the ITS rRNA gene region of *Pythium mercuriale* sp nov (*Pythiaceae*). *Fems Microbiology Letters* 284: 17-27. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2008.01168.x.
- Belbahri L., Moralejo E., Calmin G., Oszako T., Garcia J. A., Descals E., Lefort F. 2006b. *Phytophthora polonica*, a new species isolated from declining *Alnus glutinosa* stands in Poland. *Fems Microbiology Letters* 261 (2): 165-174.
- Belbahri L., Pamboukdjian N., Ricci P., Delon R., van Gijsegem F., Roby D., Keller H. 1999. Hypersensitive response and disease resistance upon pathogen-induced expression of elicitor genes in tobacco. W: DeWit J. G. M. i in. [red.] 9th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Amsterdam, Netherlands: 356-361.
- Chavarriaga D., Bodles W. J. A., Leifert C., Belbahri L., Woodward S. 2007. *Phytophthora cinnamomi* and other fine root pathogens in north temperate pine forests. *Fems Microbiology Letters* 276: 67-74. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00914.x.
- Moralejo E., Belbahri L., Calmin G., Garcia-Munoz J. A., Lefort F., Descals E. 2008a. Strawberry tree blight in Spain, a new disease caused by various *Phytophthora* species. *Journal of Phytopathology* 156: 577-587.
- Moralejo E., Clemente A., Descals E., Belbahri L., Calmin G., Lefort F., Spies C. F. J., McLeod A. 2008b. *Pythium recalcitans* sp nov revealed by multigene phylogenetic analysis. *Mycologia* 100: 310-319.
- Moralejo E., Perez-Sierra A. M., Alvarez L.A., Belbahri L., Lefort F., Descals E. 2009. Multiple alien *Phytophthora* taxa discovered on diseased ornamental plants in Spain. *Plant Pathology* 58: 100-110. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2008.01930.x.
- Nowakowska J. A. 2007. Markery DNA i detekcja ekspresji genów jako nowe narzędzia badawcze w genetyce leśnej. W: Sierota Z. [red.] Quo vadis, Forestry? Materiały Międzynarodowej Konferencji, 29-30.06.2007. IBL, Sękocin Stary 2007: 486-496.
- Paul B., Bala K., Lassaad B., Calmin G., Sanchez-Hernandez E., Lefort F. 2006. A new species of *Pythium* with ornamented oogonia: morphology, taxonomy, internal transcribed spacer region of its ribosomal RNA, and its comparison with related species. *Fems Microbiology Letters* 254: 317-323. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2005.00048.x.
- Paul B., Mathew R., Kanak B., Paul A., Henry M., Lefort F., Belbahri L. 2008. Morphology, taxonomy, and phylogenetic analysis of a new species of *Pythium* isolated from France. *Fungal Diversity* 28: 55-63.
- Racape J., Belbahri L., Engelhardt S., Lacombe B., Lee J., Lochman J., Marais A., Nicole M., Nurnberger T., Parlange F., Puvarel S., Keller H. 2005. Ca²⁺ – dependent lipid binding and membrane integration of PopA, a harpin-like elicitor of the hypersensitive response in tobacco. *Molecular Microbiology* 58: 1406-1420. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04910.x.
- Riedel M., Calmin G., Belbahri L., Lefort F., Gotz M., Wagner S., Werres S. 2009. Green Fluorescent Protein (GFP) as a Reporter Gene for the Plant Pathogenic Oomycete *Phytophthora ramorum*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 56: 130-135. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2008.00376.x.
- Roetschi A., Si-Ammour A., Belbahri L., Mauch F., Mauch-Mani B. 2001. Characterization of an *Arabidopsis*-*Phytophthora* pathosystem: resistance requires a functional PAD2 gene and is independent of salicylic acid, ethylene and jasmonic acid signalling. *Plant Journal* 28: 293-305.
- White T. J., Burns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. W: Innis M. A., Gelfand D. H., Sinsky J. J., White, T. J. [red.]. PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego: 315-322.

SUMMARY

Monitoring of diseases caused by pathogenic oomycetes using DNA analysis

The identification of pathogenic isolates often reveals difficulties because of the absence of adequate morphological characters, which can be overcome by the use of appropriate molecu-

lar markers, i.e. ITS 4 and ITS5. Numerous designated new *Phytophthora* taxa have been recently described from natural and semi-natural ecosystems thanks to the development of molecular techniques. The main objective of the present study was to develop detection and identification procedures of forest tree pathogens belonging to the *Oomycetes* group. In the model rhododendron leaves were used as plants vulnerable to the attack of *Phytophthora* and *Pythium*. Monitoring of these pathogens was proposed on the basis of DNA sequence analysis of the ITS1, 5.8S gene and ITS2 region. An additional objective to be reached was designing specific real time PCR primers as a new tool for the detection of *Phytophthora* pathogens present in Poland. It would be a crucial step in assessing of *Phytophthora* diversity in nurseries, forest plantations or riparian ecosystems.

Three genetic techniques for species identification were tested: internal transcribed spacer (ITS-DNA) real-time PCR, nested PCR and sequencing. According to the obtained results, three distinct *Oomycetes* species have been detected in rhododendron leaves and have been enregistered in GenBank: *Phytophthora cactorum* (EF126357), *Pythium mercuriale* (EF126355 and EF126354), and *Pythium recalcitrans* (EF126353, EF126352 i EF126350). Above-mentioned methods could be easily applied in detection of forest pathogens, using rhododendron leaves as a specific plant baits, and the subsequent ribosomal DNA analysis by real time PCR, nested PCR and sequencing.