

## **UPORABA NOVIH HITRIH METOD ZA DOLOČANJE BAKTERIJSKE POVZROČITELJICE HRUŠEVEGA OŽIGA, BAKTERIJE *Erwinia amylovora*, V LABORATORIJU IN NA TERENU**

Tanja DREO<sup>1</sup>, Andrea BRAUN-KIEWNICK<sup>2</sup>, Andreas LEHMANN<sup>3</sup>, Brion DUFFY<sup>4</sup>,  
Manca PIRC<sup>5</sup>, Maja RAVNIKAR<sup>6</sup>

<sup>1,5,6</sup>Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo,  
Ljubljana

<sup>2,3,4</sup>Research Station Agroscope Changins - Wädenswil, Wädenswil

### **IZVLEČEK**

Bakterijski hrušev ožig predstavlja grožnjo pridelavi jablan, hrušk in drugih gostiteljskih rastlin. Laboratorijska diagnostika povzročitelja, bakterije *Erwinia amylovora*, ima pomembno vlogo pri zgodnjem odkrivanju in obvladovanju bolezni, saj je hitro izločanje okuženih rastlin bistveno. V zadnjih letih je prišlo do razvoja novih metod in pristopov, tako za laboratorijsko okolje kot tudi za uporabo na terenu, uporabo različnih diagnostičnih metod v povezavi s prognostičnimi modeli ter razvoj novih orodij za epidemiološke raziskave. Z inovativno uporabo metod PCR v realnem času in hitrega serološkega testa v vzorcih cvetov jablan smo preverjali pojav *E. amylovora* v nasadih z različno zgodovino hruševega ožiga. Okužba cvetov je epidemiološko ena najpomembnejših faz razvoja bolezni, saj se bakterije na cvetovih zelo hitro namnožijo, med cvetovi pa jih učinkovito širijo žuželke. Zaznavanja bakterije v fazi cvetenja in določanje njene koncentracije je uporabna informacija pri odločanju o ukrepih, posebej o uporabi, času in številčnosti aplikacije fitofarmaceutskih sredstev. V prispevku bomo predstavili izsledke naših raziskav in nekatere druge novosti v diagnostiki hruševega ožiga.

**Ključne besede:** hrušev ožig, cvetovi, *Erwinia amylovora*, *Malus domestica*, PCR v realnem času

### **ABSTRACT**

#### **NOVEL APPROACHES IN DETECTION OF THE CAUSATIVE AGENT OF FIRE BLIGHT, *Erwinia amylovora*, IN LABORATORIES AND IN ORCHARDS**

Fire blight poses a threat to the production of apple, pear and other host plants of the causative agent, bacteria *Erwinia amylovora*. Its laboratory diagnosis plays an important role in early detection and management of the disease, as fast elimination of infected plants is crucial. In recent years there has been development of new methods and approaches, both for the laboratory environment as well as for the field use, employing different diagnostic methods, their integration with prognostic models and development of new tools for epidemiological research. We examined the presence of *E. amylovora* in orchards with different histories of fire blight, analyzing flowers before any visible symptoms, using real-time PCR and handy quick serological tests. Infection of flowers is one of the most important

---

<sup>1</sup> dr., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

<sup>2</sup> dr., Postfach Schloss, CH-8820 Wädenswil

<sup>3</sup> prav tam

<sup>4</sup> dr., prav tam

<sup>5</sup> asist. dr., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

<sup>6</sup> prof. dr. prav tam

stages of the epidemiological development of the disease because the bacteria can rapidly propagate on flowers, and are successfully spread by bees and other insects. Detection of bacteria in the flowering phase and determination of their concentration is useful information when deciding on measures, specifically on the application, time and number of applications for plant protection. We present the results of our research and some other innovations in the diagnosis of fire blight.

**Keywords:** fire blight, flowers, *Erwinia amylovora*, *Malus domestica*, real-time PCR

## 1 UVOD

Bakterijski hrušev ožig predstavlja grožnjo pridelavi jablan, hrušk in drugih gostiteljskih rastlin, tudi v Sloveniji (FURS, 2011). Laboratorijska diagnostika povzročitelja, bakterije *Erwinia amylovora*, ima pomembno vlogo pri zgodnjem odkrivanju in obvladovanju bolezni, saj je hitro izločanje okuženih rastlin bistveno (Steiner, 2000). V Evropi za določanje bakterije v vzorcih sadnega drevja in drugih gostiteljskih rastlin uporabljamo diagnostične protokole razvite v okviru organizacije EPPO (EPPO, 1992; EPPO, 2004). V zadnjih letih se je področje hitro razvijalo tudi po zaslugi mednarodnih projektov kot so ERWINDECT v okviru ERA-NET Euphresco projektov (EUHRESKO Final Report, 2010), COST 864 in drugih mednarodnih sodelav, predvsem s švicarskim laboratorijem Agroscope. Razvite so bile nove metode in pristopi, tako za laboratorijsko okolje kot tudi za uporabo na terenu, uporaba različnih diagnostičnih metod v povezavi s napovedovalnimi modeli ter razvoj novih orodij za epidemiološke raziskave. V prispevku bomo opisali pomen: (i) inovativne uporabe metod PCR v realnem času in hitrega serološkega testa v vzorcih cvetov jablan in (ii) metode ustrezne za uporabo na terenu.

## 2 MATERIALI IN METODE

*Uporaba PCR v realnem času in hitrega serološkega testa za določanje bakterije Erwinia amylovora v cvetovih jablan.* PCR v realnem času za določanje bakterije *E. amylovora*, ki je bil razvit za njeno določanje v drugih delih rastlin (Pirc in sod., 2009), smo prilagodili za analizo kumulativnih vzorcev cvetov jablan (50-100 cvetov/vzorec). Kadar so bili podatki na voljo, smo cvetove nabirali v fiziološkem stadiju, ki je najbolj ustrezen za namnoževanje bakterije in okužbo cvetov. Prilagojeno metodo smo uporabili v preliminarnem poskusu na vzorcih cvetov v Sloveniji (4 vzorci odvzeti na 4 lokacijah) in v Švici (skupno preko 690 vzorcev odvzetih na 5 lokacijah). Vsi nasadi so imeli zgodovino okužb s hruševim ožigom. V Švici smo pri izbiri datuma vzorčenja upoštevali napovedi programa Maryblyte™ (Lightner in Steiner, 1992). V nekaterih primerih smo v kasnejšem času testirali tudi poganjke jablan na istih lokacijah z uveljavljenimi metodami (EPPO, 2004; EPPO, 1992) in PCR v realnem času (Pirc in sod., 2009).

*Hitri serološki test za določanje E. amylovora* Serološki test (Ea AgriStrip, Bioreba) smo uporabili za testiranje vzorcev cvetov na enak način kot PCR v realnem času.

*Metoda izotermalnega pomnoževanja DNA bakterije E. amylovora – LAMP (angl. »Loop-mediated isothermal amplification of DNA«).* Metodo, ki so jo razvili raziskovalci Univerze v Oregonu, ZDA (Temple in sod., 2008; Temple in Johnson, 2010), smo preverjali v okviru medlaboratorijskega preverjanja novih metod (López M. M. In sod., 2010). Test smo izvajali na rastlinskem materialu zdravih gostiteljskih rastlin bakterijskega hruševega ožiga, ki smo mu dodajali znano količino bakterij *E. amylovora*, od 10 do 10<sup>6</sup> CFU/ml, in slepih vzorcih. DNA smo iz pripravljenih vzorcev ter pozitivne in negativne kontrole izolirali po modificiranem postopku Taylor in sod., 2001. Metodo LAMP smo izvajali v skladu z navodili prejetimi v medlaboratorijski primerjavi.

### 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Pri testiranju cvetov jablan smo z molekularno metodo PCR v realnem času (Pirc in sod., 2009), ki smo jo razvili pri nas in je posebej občutljiva, zaznali bakterijo *Erwinia amylovora*, ne glede na to ali so se v nasadih kasneje pojavila bolezenska znamenja ali ne. V preliminarnem eksperimentu v katerem smo testirali kumulativne vzorce cvetov odvzete na 4 lokacijah v nasadih v Sloveniji, ki so bili v prejšnjih letih okuženi, smo pojav bakterije *E. amylovora* potrdili v dveh. To je posebej pomembno z vidika časa vzorčenja, ki ni bil posebej prilagojen klimatskim razmeram ali napovedim okužb programa Maryblyte™, niti ni bilo vzorčenje posebej usmerjeno na bolj občutljive sorte jablan, zaradi česar bi pričakovali manjšo uspešnost določanja. Koncentracije bakterij v vzorcih, so segale od log 3 do log 5 CFU *E. amylovora*/mL vzorca. V švicarskih nasadih, kjer so bila vzorčenja izvedena zelo zgodaj in glede na napovedi programa Maryblyte™, smo z uporabo PCR v realnem času ravno tako lahko potrdili pojav bakterije *E. amylovora* v vseh nasadih, na vseh lokacijah in ob vseh izbranih datumih vzorčenja. Delež pozitivnih vzorcev in koncentracija bakterij v cvetovih se je razlikovala predvsem med obema testiranima sezonama, 2008 in 2009. Delež pozitivnih rezultatov je bil večji v letu 2008, ko je bilo več kot polovica vzorcev pozitivnih, kot v letu 2009 (5 % pozitivnih rezultatov). Ravno tako so bile koncentracije bakterije v cvetovih v letu 2008 precej višje, v povprečju log 4,5 CFU/mL, kot v letu kasneje, ko so bile na meji detekcije metode PCR v realnem času (v povprečju log 2,3 CFU/mL).

Domnevamo, da se je po letu 2007, ki je bilo zelo ugodno za razvoj bolezenskih znamenj in namnoževanje bakterije *E. amylovora*, njena koncentracija v naravi in v samih gostiteljskih rastlinah zmanjševala. Kljub pozitivnim rezultatom v letu 2009, ki so potrdili pojav bakterije *E. amylovora* v času cvetenja v vseh švicarskih nasadih, kasneje ni prišlo do razvoja bolezenskih znamenj, ne glede na tehnološke in fitofarmaceutske ukrepe (vključeni so bili tako organski nasadi kot tudi proizvodni nasadi v katerih je bila dovoljena uporaba streptomocina). Rezultati potrjujejo opažanja, da je bakterija v naravi sposobna preživeti daljša obdobja v razmerah, ki niso ugodne za razvoj bolezenskih znamenj. Zaradi pojava v zelo nizkih koncentracijah jo lahko v takšnih obdobjih zaznamo le z uporabo zelo občutljivih metod, kot je PCR v realnem času. Z upoštevanjem rezultatov analiz pojava in koncentracije bakterij *E. amylovora* lahko izboljšamo natančnost napovedovalnih modelov in racionalno odločamo o ukrepih, posebej o uporabi, času in številčnosti aplikacije fitofarmaceutskih sredstev.

V primerjavi s PCR v realnem času smo z uporabo hitrega serološkega testa zaznali le manjše število pozitivnih vzorcev v letu 2008, medtem ko so bili vsi testirani vzorci v letu 2009, negativni. Glede na nizke koncentracije bakterij je to pričakovan rezultat, saj je občutljivost hitrega serološkega testa precej nizka. Kljub njegovi praktičnosti, enostavnosti uporabe na terenu in nižji ceni, ta test ni ustrezen za ugotavljanje prikritih okužb z *E. amylovora*, je pa njegova občutljivost v območju koncentracij *E. amylovora* v tkivu z izraženimi bolezenskimi znamenji.

Po enostavnosti izvedbe je hitrim serološkim testom blizu nova metoda specifičnega pomnoževanja DNA bakterije *E. amylovora*, LAMP PCR (Temple in sod., 2008; Temple in Johnson, 2011). Za razliko od klasičnih reakcij PCR in PCR v realnem času LAMP PCR poteka pri stalni temperaturi, njen produkt pa je lahko viden s prostim očesom (Notomi in sod., 2000). Reakcije LAMP PCR so bile do sedaj razvite in se izkazale za uporabne predvsem za viruse, škodljive za človeka in živali (Parida in sod., 2008). Zaradi obetavnosti metode je bil LAMP PCR za določanje bakterije *E. amylovora* izbran za eno od metod v medlaboratorijskem testu v katerem smo sodelovali (López in sod., 2010). Prednost LAMP reakcije je, da je lahko njen produkt viden tudi s prostim očesom. Kljub natančni izvedbi metode v laboratoriju pri nobenem od testiranih vzorcju tega produkta v obliki belega

precipitata po končani reakciji nismo opazili, kar zmanjšuje njeno uporabnost na terenu. Nastajanje produkta smo lahko zaznali z dodatnimi postopki razločevanja produktov na agaroznem gelu ali z barvanjem produktov reakcije z barvilom (Picogreen) in sicer v območju koncentracij  $10^4$  in več cfu/mL. Na ta način bi zaznali veliko večino vzorcev z izraženimi bolezenskimi znamenji.

#### 4 SKLEPI

Pokazali smo, da je testiranje cvetov jablan z metodo PCR v realnem času ustrezna metoda za zgodnje odkrivanje pojava bakterije *E. amylovora*, še pred pojavom bolezenskih znamenj. Predvidevamo, da bi bil pristop testiranja kumulativnih vzorcev cvetov jablan ali tudi drugih okrasnih rastlin koristen v ugotavljanju širjenja bolezni na nova, dosedaj neokužena območja in v epidemioloških študijah.

Enostavne metode, ustrezne za uporabo na terenu, ki smo jih testirali (hitri serološki test in LAMP PCR), zahtevajo tehnične izboljšave, da bi zaznale bakterijo *E. amylovora* v nizkih koncentracijah prikritih okužb, zanesljivo pa lahko zaznajo bakterijo v vzorcih z izraženimi bolezenskimi znamenji.

#### 5 ZAHVALA

Zahvaljujemo se Fitosanitarni upravi RS in Fitosanitarni inšpekciji RS, še posebej inšpektorica ge. Emi Pavlič-Nikolić in ge. Klaudiji Matjaž Petek s FSI enote Celje ter g. Andreju Potočniku s FSI enote Brnik, za sodelovanje pri vzorčenju in testiranju cvetov. Del analiz je bil opravljen v okviru mednarodnega projekta »COST-Action 864: PomeFruitHealth, Combining traditional and advanced strategies for plant protection in pome fruit growing«. Projekt ERWINDECT mreže Euphresco Phytosanitary ERA-NET je bil osnova nadaljnemu sodelovanju in izvedbi medlaboratorijske primerjave testa LAMP PCR.

#### 6 LITERATURA

- EPPO (1992). Phytosanitary procedures PM 3/40 (1). *Erwinia amylovora*. Sampling and test methods. EPPO. (2004) *Erwinia amylovora*. EPPO Bulletin 34 (2), 159-171.
- EUPHRESCO Final Report. Development and validation of innovative diagnostic tools for the detection of fire blight (*Erwinia amylovora*) – ERWINDECT. EUPHRESCO Phytosanitary ERA-NET, 2010.
- FURS. 2011. Hrušev ožig – obvestila. [http://www.furs.si/svn/zvr/hr\\_ozig.asp](http://www.furs.si/svn/zvr/hr_ozig.asp) (20.4.2011).
- Lightner, Gary W, and Paul W Steiner. 1992. MaryblytTM: A computer model for predicting of fire blight disease in apples and pears. *Computers and Electronics in Agriculture* 7 (September): 249–260.
- López M. M., Peñalver J., Arilla A., Morente C., Dreó T., Pirc M., Poliakoff F., Dousset C., Visage M., Achbani E. 2010. Ring test evaluation of techniques for *Erwinia amylovora* diagnosis and detection. V: Program and Abstracts, August 16-20, 2010, Warsaw, Poland.
- Notomi, T, H Okayama, H Masubuchi, T Yonekawa, K Watanabe, N Amino, and T Hase. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 28, no. 12 (June 15): E63.
- Parida, Manmohan, Santhosh Sannarangaiah, Paban Kumar Dash, P V L Rao, and Kouichi Morita. 2008. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in Medical Virology* 18, no. 6 (December): 407-421.
- Pirc M., Ravnkar M., Tomlinson J. in Dreó T.. 2009. Improved fireblight diagnostics using quantitative real-time PCR detection of *Erwinia amylovora* chromosomal DNA. *Plant Pathology* 58, no. 5 (10): 872-881.
- Steiner, 2000. P.W. Steiner, Integrated orchard and nursery management for the control of fire blight. V: J.L. Vanneste, Editor, Fire Blight: The Disease and its Causative Agent, *Erwinia amylovora*, CABI Publishing, New York (2000), Str. 339–358.
- Taylor, R. K., P. J. Guilford, R. G. Clark, C. N. Hale, and R. L. S. Forster. 2001. "Detection of *Erwinia amylovora* in plant material using novel polymerase chain reaction (PCR) primers." *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 29 (1): 35.

- Temple T.N., Stockwell V.O. in Johnson K.B. 2008. Development of a Rapid Detection Method for *Erwinia amylovora* by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *Acta Horticulturae*, (ISHS): 793:497-503.
- Temple, Todd N., and Kenneth B. Johnson. 2011. "Evaluation of Loop-Mediated Isothermal Amplification for Rapid Detection of *Erwinia amylovora* on Pear and Apple Fruit Flowers." *Plant Disease* 95 (4) (April): 423-430.