

IZBIRA METODE EKSTRAKCIJE DNK ZA SPREMLJANJE ORGANIZMA ZA BIOTI NO ZATIRANJE, *Gliocladium catenulatum* J1446Manca PIRC¹, Tanja DREO²^{1,2}Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Ljubljana**IZVLE EK**

Siva plesen, ki jo povzroča gliva *Botrytis cinerea*, je ena izmed najpogostejših in najresnejših boleznih v pridelavi jagod. Za zatiranje se uporabljajo različni fungicidi, na katere glive razvijajo odpornost. Tako se v zadnjih letih posveča veliko pozornosti tudi biotičnemu zatiranju. V nekaterih evropskih državah je na voljo pripravka Prestop[®] MIX (Verdera Oy, Finska), kjer je organizem za biotično zatiranje (BCA) izolat glive *Gliocladium catenulatum*, J1446, ki je aktiven proti sivi plesni. V okviru evropskega ERA net projekta Bicopoll, ki je eden od projektov CORE Organic II, spremljamo učinkovitost raznosca BCA na cvetove jagod s čebelami in preverjamo morebitne ostanke BCA v medu in cvetnem prahu. V ta namen smo razvili novo, za BCA izolat specifično metodo PCR v realnem času, ki nam omogoča zaznavo izolata in njegovo kvantifikacijo v različnih vzorcih. V začetni fazi razvoja smo se osredotočili na razvoj metod ekstrakcije DNA iz pripravka Prestop[®] MIX.

Ključne besede: biotično zatiranje, siva plesen, *Gliocladium catenulatum*, PCR v realnem času

ABSTRACT**SELECTION OF DNA EXTRACTION METHOD FOR MONITORING OF BIOCONTROL AGENT, *Gliocladium catenulatum* J1446**

Gray mold, caused by the fungus *Botrytis cinerea*, is one of the most common and serious diseases affecting strawberries. Different fungicides are used to manage this disease but fungi can develop resistance on it. Therefore, much attention is devoted to biological methods of control in recent years. Preparation Prestop[®] MIX (Verdera Oy, Finland) is available in some European countries. It contains a biocontrol agent (BCA), isolate J1446 of the fungus *Gliocladium catenulatum*, active against grey mold. In the project Bicopoll, a project of European transnational research cooperation project CORE Organic II, we are monitoring the effectiveness of BCA spreading on strawberry flowers by bees and checking for residues of BSA in bee products (honey, pollen). For this purpose, we developed a new, BCA specific real time PCR, which allows us to detect BCA in different samples and quantify it. In the early stages of development, we focused on the development of DNA extraction methods from product Prestop[®] MIX.

Key words: biological control, grey mold, *Gliocladium catenulatum*, real time PCR

¹ dr., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana² dr., prav tam

1 UVOD

Siva plesen na jagodah je razširjena bolezen, ki jo povzroča gliva *Botrytis cinerea*. Največkrat so vir okužbe odmrli listi gostiteljskih rastlin. Preventivni ukrepi za preprečevanje bolezni so sprotno odstranjevanje obolelih delov, znižanje vlage ter povečanje pretoka zraka. Jagode so za sivo plesen najbolj občutljive v fazi cvetnih popkov. Pri konvencionalni pridelavi se za zatiranje uporabljajo različni fungicidi, ki jih je potrebno uporabiti večkrat v sezoni. Kljub uporabi fungicidov so lahko izgube pridelka visoke (10-20%, Strømeng 2008; 25-35%, IPMCenters 2011). Pri ekološki pridelavi jagod, kjer je uporaba kemičnih sredstev omejena, pa je izguba pridelka navadno še višja in doseže tudi 100%. Zato je za ekološko pridelavo zelo pomemben razvoj sredstev za biotično zatiranje. Biotično sredstvo za zatiranje sive plesni, ki je že na voljo v nekaterih državah Evrope, je Prestop[®] MIX finskega proizvajalca Verdera Oy (<http://www.verdera.fi/en/front-page/>), kjer je aktivna snov organizem *Gliocladium catenulatum*, sev J1446.

Sev J1446 glive *Gliocladium catenulatum* je bil izoliran iz zemlje na Finskem. Deluje kot mikoparazit in tudi tekmuje z ostalimi glivami za življenjski prostor in hranila. Na podlagi znanih podatkov gliva ne tvori toksinov in antibiotikov. Sredstvo se uporablja tudi za varstvo nekaterih drugih rastlin pred različnimi vrstami gliv npr. pred *Didymella* sp., *Botrytis* sp., *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia* in *Fusarium* spp.

V začetnih poskusih uporabe tega produkta pri zatiranju sive plesni na jagodah sredstvo ni bilo zelo učinkovito zaradi neučinkovitega raznosa. Pri škropljenju niso vsi cvetovi v isti fazi cvetenja in za učinkovito varstvo bi bilo potrebno škropljenje prepogosto ponavljati. Možnost za izboljšanje raznosa je uporaba čebel (Hokkanen s sod., 2011). Te ob izhodu iz panja prekajajo dispenzor s sredstvom, ki se jih oprime. Čebele sredstvo prenesejo na cvetove, ki jih obiščejo in so najbolj občutljivi za okužbo. Na tak način bi bil raznos sredstva učinkovitejši. V okviru evropskega ERA net projekta Bicopoll, ki je eden od projektov CORE Organic II želimo ugotoviti kakšna je učinkovitost takega raznosa, kakšen je vpliv sredstva na čebele ter ugotoviti ostanke sredstva v čebeljih produktih. Za namen spremljanja in kvantifikacije *G. catenulatum* J1446 smo razvili metodo PCR v realnem času s specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki in sondo ter preizkusili nekaj metod ekstrakcije DNA s katerimi bi učinkovito izolirali DNA glive *Gliocladium catenulatum* J1446 iz različnih matriksov. Prikazujemo rezultate preizkušanja različnih postopkov izolacije DNA iz pripravka Prestop[®] MIX, ki poleg BCA vsebuje tudi nosilne snovi.

2 MATERIALI IN METODE

2.1 Priprava suspenzije pripravka Prestop[®] MIX

Pripravili smo 0,1% mešanico pripravka Prestop[®] MIX v pufru PBS – Tween. Suspenzijo smo na magnetnem mešalu 1 uro mešali s hitrostjo 300 rpm pri sobni temperaturi. Nato smo suspenzijo alikvotirali po 1 mL v 2 mL mikrocentrifugirke in do uporabe zamrzili pri -20°C.

2.2 Metode ekstrakcije DNA

Na podlagi izkušenj in pregleda literature smo izbrali 5 načinov ekstrakcije DNA z uporabo magnetnih delcev prekritih s silikonom v kombinaciji z različnimi postopki lize ter z uporabo silikonskih kolon v kombinaciji z mehansko in kemično lizo. Postopki so bili sledeči:

1. QuickPick[™] SML Plant DNA (Bio-Nobile) z uporabo KingFisher[®] mL sistema (Thermo LabSystem) po protokolu iz Pirc s sod., 2009.

2. QuickPick™ SML Plant DNA, modifikacija: inkubacijo lize na 65°C smo podaljšali iz 30 min na 45 min. Z podaljšanjem delovanja pufru za lizo in proteinase K smo želeli povečati učinkovitost lize glivnih spor.
3. QuickPick™ SML Plant DNA, modifikacija: dodaten korak sonikacije po dodatku pufru za lizo. Sonikacija je potekala v Iskra Sonis4 pri 30 Hz 4 minute. S korakom sonikacije smo želeli povečati učinkovitost lize glivnih spor.
4. QuickPick™ SML Plant DNA, modifikacija: dodaten korak tretja s matriksom za lizo B (MP) po dodatku pufru za lizo. Tretje smo izvajali z aparaturo FastPrep (MP) pri hitrosti 6 m/s 1 minuto z namenom mehanske poškodbe glivnih spor.
5. Fast DNA kit for soil (MP) po navodilih proizvajalca.

Za vsak postopek ekstrakcije DNA smo testirali tri 0,1% mešanice pripravka Prestop® MIX.

2.3 Izvedba PCR v realnem času

PCR v realnem času smo izvedli s specifičnimi oligonukleotidnimi pramniki in sondo, ki smo jih razvili na regiji, kjer so bili razviti specifični oligonukleotidni pramniki za PCR (Paavanen – Huhtala in sod., 2000). Testirali smo neredno, 10x in 100x redno DNA v treh ponovitvah. Ploščico smo pokrili z optično folijo, jo centrifugirali in vstavili v ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). PCR v realnem času smo analizirali z analitičnim programom SDS 2.2.2. (Applied Biosystems).

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

76

Na podlagi literature in izkušenj smo za ekstrakcijo DNA iz organizma za biotično zatiranje iz pripravka Prestop® MIX izbrali dva komercialna kita: QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile) in Fast DNA kit for soil (MP).

Preglednica 1: Rezultati primerjave C_q vrednosti pri različnih postopkih ekstrakcije DNA pri neredni, 10x in 100x redni DNA izolirani iz suspenzije pripravka Prestop® MIX

	neredna DNA			10 x redna DNA			100 x redna DNA		
Postopek 1	neg (45)	neg (45)	43,5	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)
	35,8	37,6	neg (45)	41,7	neg (45)	37,3	neg (45)	neg (45)	neg (45)
	36,9	neg (45)	40,5	neg (45)	36,0	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)
Postopek 2	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)
	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)
	neg (45)	neg (45)	40,5	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)
Postopek 3	39,2	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)
	neg (45)	37,2	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)
	36,5	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)
Postopek 4	neg (45)	36,4	36,3	34,7	36,2	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)
	41,2	36,6	neg (45)	neg (45)	35,9	36,3	neg (45)	neg (45)	neg (45)
	37,8	36,2	35,2	neg (45)	38,2	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)
Postopek 5	27,3	27,3	27,4	30,9	30,5	31,0	33,9	34,6	33,5
	27,2	26,9	27,0	30,7	30,8	30,6	33,8	34,9	33,7
	27,2	27,0	27,2	30,7	31,8	31,0	34,3	34,9	33,5
NKI	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)	neg (45)
	neg (45)	neg (45)	neg (45)	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND – ni testirano

Prvega smo preverjali v kombinaciji z modificiranimi postopki lize spor, ki so prevladujo a oblika glive v pripravku. Rezultat primerjave Cq vrednosti s PCR v realnem času (preglednica 1) so pokazali, da je metoda ekstrakcije s kitom Fast DNA kit for soil (MP) neprimerno u inkovitejša in ponovljiva v primerjavi z osnovno izvedbo ekstrakcije DNA s kitom QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile) ali njenih modifikacij.

4 SKLEPI

Ugotovili smo, da je izbor metode ekstrakcije DNA iz suspenzije pripravka Prestop® MIX zelo pomembna, saj je u inkovitost med metodami razli na.

Kot najprimernejša metoda za ekstrakcijo DNA iz suspenzije pripravka Prestop® MIX se je izkazal kit Fast DNA Spin for soil (MP), ki združuje kemi no in mehansko lizo spor.

5 ZAHVALA

Zahvaljujemo se Ministrstvu za kmetijstvo in okolje za financiranje projekta Bicopoll ter Oddelku za entomologijo Nacionalnega inštituta za biologijo za sodelovanje pri tem projektu.

6 VIRI

Hokkanen HMT, Menzler-Hokkanen I, Mustalahti A-M (2011) Honey bees (*Apis mellifera*) for precision biocontrol of grey mould (*Botrytis cinerea*) with *Gliocladium catenulatum* on strawberries and raspberries in Finland. Arthropod-Plant Interactions.

IPMCenters (2011): Crop Profile for Strawberries in Louisiana. Available at <http://www.ipmcenters.org/cropprofiles/docs/LAstrawberries.pdf>, accessed on 22.4.2013

Paavanen–Huntala S, Avikainen H, Yli-Mattila T. 2000. Development of strain – specific primers for a strain of *Gliocladium catenulatum* used in biological control. European Journal of Plant Pathology 106: 187-198

Pirc M, Ravnkar M, Tomlinson J & Dreo T. 2009. Improved fire blight diagnostics using quantitative real-time PCR detection of *Erwinia amylovora* chromosomal DNA. Plant Pathology, 58, 872-881.

Strømeng, G. M. 2008. Aspects of the biology of *Botrytis cinerea* in strawberry (*Fragaria x ananassa*) and alternative methods for disease control. Philosophiae Doctor (PhD) Thesis 2008: 56.