

Levensvatbaarheid van *Ralstonia* en *Clavibacter* meetbaar met behulp van RNA-detectiemethoden

J.R.C.M. van Beckhoven en J.M. van der Wolf

Plant Research International, Postbus 16, 6700 AA Wageningen Jose.vanbeckhoven@wur.nl

***Ralstonia solanacearum* en *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, de veroorzakers van respectievelijk de bacterieziekten bruinrot en ringrot in de aardappel, zijn belangrijke ziekteverwekkers met een quarantaine status. Voor studie naar de epidemiologie van deze pathogenen zijn detectiemethoden die de vitaliteit van de bacteriecellen kunnen aantonen, zonder deze te hoeven kweken, van groot belang. Dit geldt in het bijzonder voor Rsol, waarvan bekend is, dat deze onder bepaalde condities cellen kan vormen in een toestand waarin deze 'viable but non culturable' zijn.**

In ons onderzoek hebben we detectiemethodes ontwikkeld gebaseerd op amplificatie van 16S rRNA sequenties met behulp van NASBA (nucleic acid sequence based amplification). De aanwezigheid van intact 16S RNA is namelijk een indicator voor de levensvatbaarheid van cellen. NASBA is een methode waarmee nucleïnezuren, maar in het bijzonder RNA-sequenties, efficiënt geamplificeerd kunnen worden. In NASBA worden enkelstrengs RNA-moleculen exponentieel geamplificeerd. Amplicons kunnen vervolgens gedetecteerd worden met behulp van agarose gelelektroforese en northern blotting. Wanneer NASBA gecombineerd wordt met een real-time detectie door middel van een fluorescente 'Molecular Beacon', spreekt men van AmpliDet RNA. Detectie van amplicons vindt plaats gedurende de amplificatie in een gesloten systeem, waardoor risico's van kruisbesmettingen vermeden worden.

Inleiding

Ringrot en bruinrot zijn bacterieziekten met een quarantaine status die veel schade kunnen aanrichten in de aardappelteelt. Ringrot komt vooral voor in koudere gebieden en wordt veroorzaakt door de Gram-positieve bacterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms). Bruinrot wordt veroorzaakt door de Gram-negatieve bacterie *Ralstonia solanacearum* (Rsol) en heeft in

het recente verleden grote economische schade aangericht in Nederland. Beide pathogenen kunnen latent aanwezig zijn in planten en knollen. Cms is bovendien in staat lange tijd te overleven op diverse materialen waardoor dit pathogeen onopgemerkt verspreid kan worden (Bonde, 1942; Nelson, 1978; Nelson, 1980).

Er zijn in het verleden verschillende detectiemethodes ontwikkeld voor zowel Rsol als Cms. Voor bei-

de pathogenen bestaan semi-selectieve media en zijn serologische methodes als ELISA, immunofluorescentie cell kleuring (IF) en immunofluorescentie colonie kleuring (IFC) beschikbaar. Het nadeel van deze methodes is dat ze of tijdrovend zijn of, in het geval van serologische detectie, dat vals-positieve resultaten kunnen ontstaan doordat er kruisreacties optreden met verwante organismen. Met name Cms kan moeilijk geïsoleerd worden, doordat de bacterie langzaam groeit en daardoor op agar media gemakkelijk door saprophyten overgroeid raakt. Door gebruik te maken van methodes die gebaseerd zijn op amplificatie van specifieke DNA sequenties zoals Polymerase Chain Reaction (PCR) kan een betere specificiteit en gevoeligheid behaald worden. Voor beide pathogenen zijn specifieke PCR primers geselecteerd (Seal *et al*, 1993; Mills *et al*, 1997). Echter, methoden gebaseerd op amplificatie van DNA kunnen geen dode van levende cellen onderscheiden. DNA kan namelijk lange tijd intact blijven nadat een cel sterft, evenals de antigenen die met behulp van IF en ELISA, gedetecteerd worden. Met behulp van deze methoden kan de vitaliteit van cellen dus niet vastgesteld worden. In uitplaatmethoden en IFC worden weliswaar levende kolonievormende cellen aangetoond, maar geen levende niet-cultiveerbare cellen (VBNC's).

ARTIKEL

(Bloomsfield *et al.*, 1998). Voor Rsol is reeds aangetoond dat deze bij lage temperaturen in water VBNC's vormt (Van Elsas *et al.*, 2001). Deze cellen kunnen niet op agarmedia uitgroeien, maar zijn nog wel in staat in de plant te groeien en bijvoorbeeld tomatenplanten ziek te maken. Er bestaat dus het gevaar dat VBNC's in uitplaatmethoden niet aangetoond worden maar wel infecties veroorzaken. Voor epidemiologische en ecologische studies is het dus belangrijk dat alle levende cellen, inclusief niet-cultiveerbare cellen, gedetecteerd worden. Een methode gebaseerd op de detectie van RNA sequenties kan hier uitkomst bieden.

AmpliDet RNA met gebruik van Molecular Beacons

AmpliDet RNA is een detectiemethode gebaseerd op de amplificatie van RNA door middel van NASBA, waarbij amplicons real time gedetecteerd worden met een fluorescerende probe, een zgn. Molecular Beacon (Leone *et al.*, 1998).

NASBA is een isothermische amplificatie-methode waarbij een enkelstrengs stukje 16S rRNA geamplificeerd wordt door de gezamenlijke werking van drie verschillende enzymen, AMV reverse transcriptase, RNase H en T7 RNA polymerase en 2 specifieke primers. De volledige reactie vindt plaats bij 41°C zodat geen thermocycler nodig is.

Een Molecular Beacon is een enkelstrengs oligonucleotide die in een steel/lus structuur gevouwen is. De lus is complementair aan de target RNA sequentie en de steel bestaat uit de twee complementaire 3' en 5' einden die samen een dubbelstrengs structuur vormen, waarbij één uiteinde van de steel gemerkt is met een fluorescerende

groep en het andere uiteinde met een uitdover (figuur 1). Wanneer de lus aan het target RNA bindt zal de steel openvrouwen en de uitdover van de fluorescerende groep verwijderd worden waardoor er een fluorescent signaal ontstaat (Tyagi en Kramer, 1996).

AmpliDet RNA wordt tegenwoordig met succes toegepast bij de detectie van zowel humane infectieziekten zoals HIV (Yates *et al.*, 2001; Van Beuningen *et al.*, 2001), als plantpathogenen zoals het aardappelbladrolvirus (PLRV) (Klerks *et al.*, 2001).

Detectie van Rsol en Cms met behulp van AmpliDet RNA

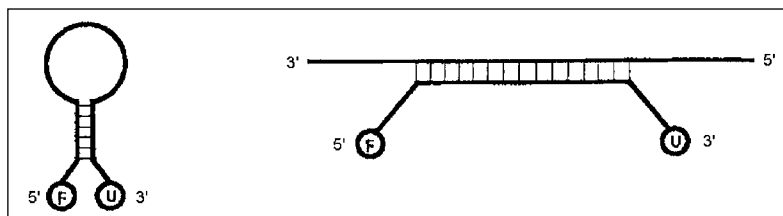
Er is reeds onderzoek gedaan naar de mogelijkheden van NASBA en AmpliDet RNA voor de detectie van Cms en Rsol (Bentsink *et al.*, 2002; Van Beckhoven *et al.*, 2002, Van der Wolf *et al.* in press). Specifieke primers en probes werden ontwikkeld aan de hand van alignments van 16S rRNA sequenties van deze pathogenen en verwante species. De gevoeligheid voor reïncultures van zowel Cms als Rsol bleek 10 cfu per reactie te zijn. Dit komt overeen met een detectie-grens van 500 cfu/ml extract. RNA detectie is dus ongeveer even gevoelig als de gangbare IF detectie waarbij ca. 1000 cfu/ml gedetecteerd worden.

RNA detectie als maat voor levensvatbaarheid van bacteriële cellen

Door Van Elsas *et al.* (2001) is aangetoond dat onder invloed van lage temperaturen cellen van Rsol in oppervlaktewater overgaan van een cultiveerbare naar een niet-cultiveerbare VBNC staat. Deze cellen zullen derhalve niet gedetecteerd kunnen worden met behulp van conventionele uitplaatmethoden. Besmettingen van het oppervlaktewater kunnen daardoor onopgemerkt blijven en een bedreiging vormen voor de aardappelteelt. Deze VBNC cellen zouden echter wel met behulp van RNA detectie aangetoond kunnen worden, omdat in vitale cellen RNA aanwezig is.

Voor verschillende micro-organismen is reeds aangetoond dat zowel mRNA of 16S rRNA als indicator gebruikt kan worden voor de levensvatbaarheid van cellen (Van der Vliet *et al.*, 1994; Simpkins *et al.*, 2000). RNases breken na de celdood het vrijgekomen RNA snel af terwijl het DNA langere tijd aantoonbaar blijft. Er is voor zowel prokaryote als eukaryote cellen eveneens een verband aangetoond tussen de hoeveelheid rRNA en de metabolische activiteit of integriteit van cellen (Hahn *et al.*, 1992; Lamattina *et al.*, 1998). rRNA kan dus als maat dienen voor de metabolische activiteit van cellen.

Het is bekend dat NASBA onder



Figuur 1. Structuur van een 'Molecular Beacon'. Wanneer er geen target aanwezig is (links), is de beacon gesloten en zal de uitdover (U) het fluorescente label (F) uitdoven. Wanneer de beacon echter aan de target gebonden is (rechts), opent de beacon en zal er een fluorescent signaal ontstaan (Tyagi and Kramer, 1996).

bepaalde omstandigheden naast 16S rRNA sequenties, ook de homologe rDNA sequenties kan amplificeren. Daarom is onderzocht of onder de door ons gekozen condities NASBA exclusief RNA en niet ook het relatief stabiele DNA amplificeerde. Hiervoor zijn drie verschillende methodes gebruikt:

1. De totale nucleïnezuur fracties (DNA en RNA) werden gezuiverd uit reïncultures van Rsol en Cms en vervolgens behandeld met RNase of DNase. Deze enzymen breken het respectievelijk het aanwezige RNA en DNA af. Als controle werd ook een gezuiverde onbehandelde nucleïnezuur fractie getest (zie tabel 1).
2. Reïncultures van Cms en Rsol werden gedood met behulp van een hitte-behandeling (30 minuten, 80°C) en de dode cellen werden vervolgens overnacht geïncubeerd bij kamertemperatuur. Het RNA dat na deze behandeling vrijkomt zou door eveneens vrijgekomen enzymen afgebroken moeten worden terwijl het stabiele rDNA intact blijft.
3. Reïncultures van Cms en Rsol werden gedood met behulp van natriumhypochloriet (0.5%) en vervolgens toegevoegd aan gezonde aardappel-extracten. Uit deze extracten werd de totale nucleïnezuur fractie (DNA en RNA) gezuiverd en getest. Als controle werd na de zuivering aan een deel van de fractie gezuiverd RNA toegevoegd. Dit laatste om te bepalen of het natriumhypochloriet geen schadelijke effecten op de zuivering of NASBA hadden uitgeoefend.

Het aanwezige DNA en/of RNA

Tabel 1. Detectie van totale nucleïne-zuurextracten (DNA en RNA) afkomstig van 10⁷ cellen/ml *Clavibacter michiganensis* subsp *sepedonicus* en *Ralstonia solanacearum* na diverse behandelingen.

Behandeling	Aanwezige nucleïne-zuur na behandeling	Resultaat Cms	Resultaat Rsol
Geen	DNA en RNA	+	+
Dnase	RNA	+	+
Rnase	DNA	-	-
Hitte en overnacht incubatie bij kamertemperatuur	DNA	-	-
Behandeling met natrium hypochloriet Extra RNA toegevoegd na natrium hypochloriet behandeling	DNA	-	-
	DNA en RNA	+	+

werd geanalyseerd met behulp van agarose-gelelektroforese en daarna getest met AmpliDet RNA of, in het geval van Rsol, met NASBA en blotting (tabel 1). Het bleek dat alleen de monsters waarin RNA aanwezig was een positief signaal gaven in AmpliDet RNA. Dit geeft aan dat de NASBA onder de door ons gekozen condities geschikt lijkt te zijn voor het bepalen van de vitaliteit van Cms en Rsol cellen.

De levensvatbaarheid van Rsol werd eveneens getest door druppels water die 10⁸ cellen/ml Rsol bevatten op steriele ijzeren strips te laten drogen en de cellen op verschillende tijdstippen opnieuw te resuspendieren in 0.8 % NaCl. De monsters werden vervolgens getest in PCR en NASBA en uitgeplaat op TSA. Tot en met 4 uur na de start van het experiment waren levensvatbare cellen van Rsol aantoonbaar aanwezig. Echter na 24 uur waren de NASBA resultaten negatief en konden geen cultiveerbare cellen meer worden aangetoond. Het aanwezige DNA was

echter nog steeds detecteerbaar met behulp van PCR (tabel 2).

Toepassing van RNA detectie

Het is aangetoond dat detectiemethoden, gebaseerd op amplificatie van rRNA sequenties met NASBA, een hoge gevoeligheid bezitten en exclusief levende cellen van Cms en Rsol kunnen aantonen. Daardoor zijn deze methoden zeer geschikt voor de bepaling van de vitaliteit binnen een populatie en zodoende een uitstekend instrument bij ecologische studies naar de overleving en verspreiding van plantpathogene bacteriën en bij studies naar cellen in een levende, maar niet cultiveerbare staat.

Literatuur

- Bentsink, L., Leone, G.O.M., van Beckhoven, J.R.C.M., van Schijndel, H.B., van Gemmen, B. and van der Wolf, J.M., 2002, Amplification of RNA by NASBA allows direct detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in potato, *Journal of Applied Microbiology* **93**, 647-655
- Bloomsfeld, S.F., Gordon, S.A.B., Stewart, C., Dodd, E.R., Booth, I.R., and Power, E.G.M., 1998, The viable but non-culturable phenomenon explained, *Microbiology* **144**, 1-2
- Bonde, R., 1942, Ring rot in volunteer plants, *American Potato Journal* **19**, 131-133
- Elphinstone, J.G., Survival and possibilities

Tabel 2. Overleving van *Ralstonia solanacearum* op ijzeren strips gedetecteerd met behulp van NASBA, PCR en uitplaten op TSA.

Tijd (uren)	0	0.5	1	4	24	48	144
NASBA	+	+	+	+	-	-	-
PCR	+	+	+	+	+	+	+
Uitplaten	+	+	+	+	-	-	-

- for extinction of *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith in cool climates, *Potato Research* **39**, 403-410
- Hahn, D., Amann, R.L., Ludwig, W., Akkermans, A.D.L. and Schleifer, K.H., 1992, Detection of micro-organisms in soil after in-situ hybridization with rRNA-targeted fluorescently labelled oligonucleotides, *Journal of General Microbiology* **138**, 879-887
- Klerks, M.M., Leone, G.O., Verbeek, M., van den Heuvel, J.F. and Schoen, C.D., 2001, Development of a multiplex AmpliDet RNA for the simultaneous detection of Potato leafroll virus and Potato virus Y in potato tubers. *Journal of Virological Methods* **93**, 115-125.
- Lamattina, L., Pinedo, M., Yudi, V.P., Pont-Lezica, R.F. and Conce, R.D., 1988, Estimation of rRNA synthesis and degradation rate in sequencing wheat leaves, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **260**, 285-292
- Leone, G.O.M., van Schijndel, H., van Gemen, B., Russel Kramer, F. and Schoen, C.D., 1998, Molecular beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogeneous, real-time detection of RNA, *Nucleic Acids Research* **26**, 2150-2155
- Mills, D., Russell, B.W. en Hanus, J.W., 1997, Specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by amplification of three unique DNA sequences isolated by subtraction hybridisation, *Phytopathology* **87**, 853-861
- Nelson, G.A., 1978, Survival of *Corynebacterium sepedonicum* on contaminated surfaces, *American Potato Journal* **55**, 449-453
- Nelson, G.A., 1980, Long-term survival of *Corynebacterium sepedonicum* on contaminated surfaces and in infected potato stems, *American Potato Journal* **57**, 595-599
- Seal, S.E., Jackson, L.A., Young, J.P.W. and Daniels, M.J., 1993, Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and the Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction, *Journal of General Microbiology* **139**, 1587-1594
- Simpkins, S.A., Chan, A.B., Hays, J., Pöpping, B. and Cook, N., 2000, An RNA transcription based amplification technique (NASBA) for the detection of viable *Salmonella enterica*, *Letters in Applied Microbiology* **30**, 75-79
- Tyagi, S. and Kramer, F.R., 1996, Molecular Beacons; probes that fluoresce upon hybridization, *Nature Biotechnology* **14**, 303-308
- Van Beckhoven, J.R.C.M., Stead, D.E. and Van Der Wolf, J.M., 2002, Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by AmpliDet RNA, a new technology based on real time monitoring of NASBA amplicons with a molecular beacon, *Journal of Applied Microbiology* **93**, 840-849.
- Van Beuningen, R., Marras, S.A.E., Kramer, F.R., Oosterlaken, T., Weusten, J., Borst, G. and van de Wiel, P., 2001, Development of a high-throughput detection system for HIV-1 using real-time NASBA based on molecular beacons, *Proceedings - SPIE the International Society for Optical Engineering*. 4264, 66-71.
- Van der Vliet, G.M.E., Schepers, P., Schukink, R.A.F., van Gemen, B. en Klatser, P.R., 1994, Assessment of mycobacterial viability by RNA amplification, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38**, 1959-1965
- Van Elsas, J.D., Kastelein, P., De Vries, P.M. en Van Overbeek, L.S., 2001, effects of ecological factors on the survival and physiology of *Ralstonia solanacearum* by 2 in irrigation water, *Canadian Journal of Microbiology* **47**, 842-854
- Van der Wolf, J.M., van Beckhoven, J.R.C.M., De Haan, E.G., van den Bovenkamp, G.W. and Leone, G.O.M., Detection of specific *Ralstonia solanacearum* 16S rRNA sequences by AmpliDet RNA in which NASBA amplicons are monitored with the molecular beacon, *Journal of Applied Microbiology*, in press
- Yates, S., Penning, M., Goudsmit, J., Frantzen, I., van De Weijer, B., van Strijp, D. and van Gemen, B., 2001, Quantitative detection of Hepatitis B Virus DNA by real-time nucleic acid sequence-based amplification with molecular beacon detection, *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 3656-3665.