

Kaedah diagnostik molekul pantas dan mudah untuk pengesanan penyakit hawar daun bakteria (BLB) pada padi

(A rapid and simple molecular diagnostic method for the detection of bacterial leaf blight disease (BLB) on paddy)

Lau Han Yih, Kogeethavani Ramachandran dan Sohana Romeli

Pengenalan

Kaedah diagnostik di lapangan berasaskan DNA yang mudah dan pantas tanpa melibatkan peralatan canggih serta kos rendah mempunyai permintaan yang tinggi. Teknik dan kaedah klasik yang biasa digunakan untuk pengesanan penyakit adalah termasuk tindak balas rantaian polimerase (PCR) dan tindak balas rantaian ligase (LCR). Walau bagaimanapun, kaedah ini memerlukan alat kitaran haba/terma (*thermal cycler*) untuk mencapai pengesanan DNA yang cepat dan menyebabkannya tidak sesuai untuk aplikasi di lapangan. Di samping itu, kaedah amplifikasi DNA isoterma mungkin berpotensi untuk mengatasi cabaran ini. Sebagai contoh, kaedah amplifikasi isoterma yang digabungkan dengan jalur aliran lateral dan fluorometer mudah alih telah dibangunkan untuk membolehkan pengesanan DNA patogen di lapangan. Walaupun kaedah bacaan hasil amplifikasi isoterma kelihatan mudah, tetapi ia masih bergantung kepada penggunaan peralatan yang agak canggih semasa proses pembangunan dan memerlukan kos yang tinggi. Teknik pengesaian komprehensif sedia digunakan di lapangan yang menggabungkan proses lengkap daripada penyediaan sampel sehingga ke paparan keputusan bukan sahaja berkos rendah, bahkan berpotensi untuk diguna pakai dalam bidang pertanian.

Pertanian adalah penyumbang utama kepada ekonomi dunia, tetapi penyakit tanaman masih menjadi kebimbangan utama dalam negara yang ekonominya bergantung kepada pertanian. Di Malaysia, padi merupakan tanaman penting namun menghadapi masalah kerugian tanaman yang tinggi setiap tahun disebabkan oleh insiden penyakit bawaan disebabkan oleh kulat dan bakteria. Penyakit hawar daun bakteria (BLB) padi yang disebabkan oleh *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) merupakan penyakit utama padi yang dihadapi di seluruh dunia (*Gambar 1*). Penyakit ini boleh disebarkan melalui beberapa faktor seperti angin dan hujan. Jangkitan BLB bermula dengan kemasukan Xoo ke dalam tumbuhan melalui luka atau liang air pada permukaan tumbuhan. Simptom penyakit BLB pada daun padi adalah seperti luka kuning atau coklat sehingga meliputi seluruh permukaan daun padi dan akhirnya menyebabkan pengeringan dan kematian sel daun. Secara tradisinya, pengesanan BLB adalah berdasarkan ahli patologi tumbuhan yang berpengalaman bagi mengenal pasti penyakit ini melalui pemeriksaan secara visual berdasarkan



Gambar 1. Simptom penyakit pada daun padi selepas jangkitan BLB

simptom penyakit tersebut. Untuk menanganinya, lebih banyak kaedah diagnostik analitikal telah dibangunkan. Walau bagaimanapun, kaedah pengesanan ini memerlukan peralatan yang mahal dan canggih serta hanya boleh dilakukan di makmal khusus oleh juruteknik yang terlatih. Walaupun pengesanan awal adalah kaedah yang paling berkesan untuk mengawal penyebaran BLB, kekurangan teknik pengesanan di lapangan telah menyebabkan kerugian tanaman yang besar akibat kelewatan penggunaan strategi kawalan BLB.

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) adalah kaedah amplifikasi asid nukleik yang dibangunkan pada tahun 2000 yang telah digunakan secara meluas kerana kecekapan, kepantasan dan spesifisiti yang tinggi. LAMP mempunyai tiga kelebihan iaitu boleh dijalankan pada suhu yang tetap dengan masa tindak balas yang singkat iaitu dalam masa 20 – 30 minit. Proses isoterma pantas ini telah menjadikannya sesuai untuk pengesanan patogen tumbuhan di lapangan. Kaedah ini juga mempunyai kecekapan amplifikasi dan sensitiviti yang sangat tinggi kerana menjana sejumlah besar produk LAMP dengan kuantiti DNA yang rendah. Selain itu, kaedah ini juga memberikan kos yang efektif kerana memerlukan peralatan mudah untuk melakukan pengesanan. Walaupun LAMP telah digunakan untuk aplikasi lapangan dalam penyakit tumbuhan, tetapi pengesanan penyakit padi dengan menggunakan pengesanan LAMP yang digabungkan dengan penggumpalan partikel sebagai kaedah bacaan masih lagi baharu.

Penggumpalan adalah fenomena yang terkenal dalam kimia dan selalu digunakan untuk pelbagai proses pemisahan koloid (sebagai contoh, rawatan air sisa). Fenomena ini mula ditemui pada tahun 1952 oleh Ruehrwein, R.A. dan dijelaskan pada tahun 1960-an oleh La Mer dan Healy sebagai pencerapan permukaan polimer untuk mengikat pelbagai partikel bersama-sama dan menggumpal serta mengasing daripada larutan. Untuk menggunakan fenomena ini, MARDI telah membangunkan kaedah diagnostik lapangan dengan menggunakan LAMP yang digabungkan dengan penggumpalan partikel magnet untuk mencapai pengesanan Xoo secara kualitatif (Ya/Tidak). Amplifikasi DNA LAMP yang berjaya dalam sampel positif dengan DNA panjang akan membentuk fenomena penggumpalan

yang boleh dikesan secara mata kasar. Pengesanan ini boleh memberi sumbangan besar dalam industri padi sebagai kaedah untuk mengesan penyakit padi utama.

Strain bakteria dan keadaan kultur

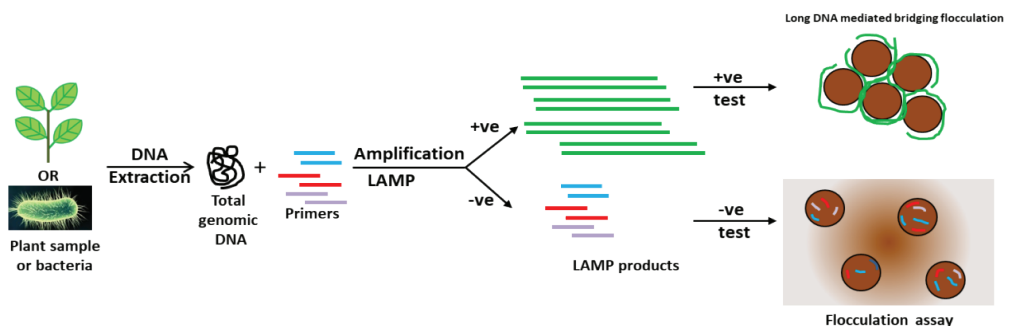
Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* (Xoo) dan *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Xoc) diperolehi daripada *National Collection of Plant Pathogenic Bacteria* (NCPBP, United Kingdom). Bakteria tersebut dikultur di atas medium PDA (1,000 mL medium yang mengandungi 300 g ubi kentang segar, 2 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g $\text{Ca}(\text{NH}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 5 g Bakto-pepton dan 20 g sukrosa). Piring Petri dieram pada suhu 30 °C selama tiga hari.

Kaedah diagnostik

Kaedah diagnostik ini dianggap sebagai penyelesaian bersepadu yang komprehensif untuk pengesanan Xoo secara sensitif dan pantas di lapangan dengan penggunaan peralatan yang minimum. *Gambar rajah 1* menerangkan konsep diagnostik yang terdiri daripada tiga fasa utama secara ringkas. Fasa pertama adalah pengekstrakan DNA, fasa kedua adalah amplifikasi asid nukleik Xoo yang sensitif dan pantas melalui kaedah LAMP dan fasa ketiga adalah pengikatan khusus DNA yang telah diamplifikasi dengan menggunakan partikel magnet diikuti dengan pemeriksaan penggumpalan partikel magnet melalui mata kasar.

Pengekstrakan DNA

Sebanyak 50 mg sampel daun ditambah dengan 100 μL larutan pengekstrakan DNA (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.5 M guanidium-HCl, 2% w/v PVP40 dan 1% v/v Triton-X). Sampel daun dikisar dengan menggunakan pestel plastik sebelum 10 μL larutan dipindah ke 15 μL manik magnet *Solid Phase Reversible Immobilization* (SPRI). Campuran dibasuh dengan 100% isopropanol dan diikuti dengan 80% etanol. DNA yang terikat pada permukaan manik magnet dielut keluar dengan menggunakan 10 μL dH_2O .



Gambar rajah 1. Pengesanan penggumpalan partikel magnetik. DNA daripada Xoo telah diekstrak, diamplifikasi dan hasil amplifikasi dikesan melalui mata kasar tanpa menggunakan peralatan

Tindak balas LAMP

Campuran primer LAMP disediakan dengan kesemua enam primer (*Jadual 1*) yang mengandungi 40 μM FIP, 40 μM BIP, 5 μM F3, 5 μM B3, 10 μM LoopF dan 10 μM LoopB. Secara ringkas, LAMP dijalankan dengan 25 μL campuran tindak balas (1X ThermoPol Buffer, 6 mM MgSO_4 , 1.4 mM setiap dNTP, 8U Bst DNA polimerase, 3 μL campuran primer) pada suhu 65 °C selama 20 minit menggunakan 1 μL asid nukleik yang diekstrak (kepekatan gDNA bergantung kepada reka bentuk eksperimen). Seterusnya 3 μL hasil amplifikasi LAMP ini digunakan untuk menjalankan elektroforesis gel untuk pengesahan amplifikasi.

Jadual 1. Jujukan oligonukleotida yang digunakan dalam kajian

Primer	Jujukan (5' ke 3')
FIP	AAGCCTTCCGCTGAGGTTGTAAGTAGTGCGGTCAGGAA
BIP	GAGGCTGCTTCTATGGGAACCAGTTCTGGCGAATCTATTAGC
F3	GCTGACGAAGAGCAACTT
B3	CAATAACTGCTGGCAATGATC
LoopF	ATACAACACGATGCTGGCA
LoopB	GAGCTTCGGCCCACTTAG

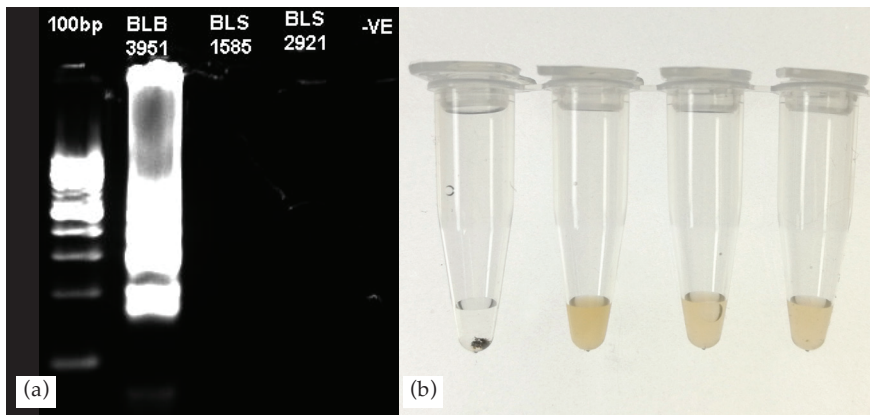
Asai penggumpalan

Sebanyak 5 μL hasil amplifikasi LAMP telah digunakan untuk asai penggumpalan dengan menambah 1.5 – 1.8 isi padu larutan manik magnet *Solid Phase Reversible Immobilization* (SPRI) dan dicampur dengan sekata. Selepas pembahagian manik dengan menggunakan rak magnet, 30 μL larutan penggumpalan (100 mM sodium asetat, pH 4.4, 1% (v/v) Tween 20) ditambahkan dan dikacau dengan perlahan.

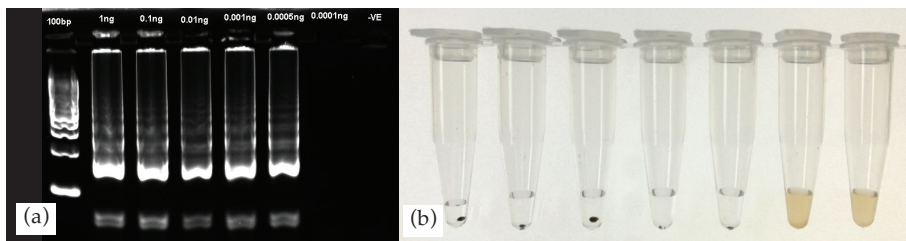
Kajian spesifisiti dinilai dengan mengesan patogen Xoo dan Xoc (*Gambar 2*). DNA genomik (gDNA) telah diekstrak daripada kultur bakteria (Xoo strain 3951; Xoc strain 1585 dan 2921). Uji ulangan telah dilakukan ke atas DNA genomik Xoo dan Xoc dengan LAMP dan diikuti dengan asai penggumpalan. Didapati hanya sampel gDNA daripada Xoo (BLB 3951) telah berjaya diamplifikasi dan asai penggumpalan manik SPRI menunjukkan larutan yang jernih. Ini membuktikan primer LAMP yang direka adalah spesifik terhadap Xoo sahaja.

Untuk mengenal pasti sensitiviti pengesanan ini, kepekatan gDNA daripada 0.0001 – 1 ng telah digunakan untuk menjalankan tindak balas LAMP dan diikuti dengan asai penggumpalan.

Gambar 3 menunjukkan gel elektroforesis dan asai penggumpalan, DNA yang berjaya diamplifikasi dapat dikesan pada sampel gDNA dengan kepekatan 0.0005 ng dan kepekatan gDNA yang lebih tinggi daripada 0.0005 ng. Manakala tiada amplifikasi dikesan apabila kepekatan gDNA kurang daripada 0.0005 ng serta pada sampel kawalan negatif yang tidak mengandungi gDNA.



Gambar 2. Kajian spesifisiti untuk kaedah diagnostik asai penggumpalan. (a) Gel elektroforesis yang menunjukkan hasil tindak balas LAMP ke atas sampel Xoo. Xoo = BLB 3951, Xoc = BLS 1585, BLS 2921. (b) Asai penggumpalan berdasarkan hasil tindak balas LAMP. Setiap gambar mewakili tiga eksperimen uji ulangan



Gambar 3. Kajian sensitiviti untuk kaedah diagnostik asai penggumpalan. (a) Gel elektroforesis yang menunjukkan hasil tindak balas LAMP ke atas sampel gDNA Xoo dengan kepekatan berlainan (5 ng, 0.1 ng, 0.01 ng, 0.001 ng, 0.0005 ng, 0.0001 ng). (b) Asai penggumpalan berdasarkan hasil tindak balas LAMP. Setiap gambar mewakili tiga eksperimen uji ulangan

Kesimpulan

Primer LAMP yang direka adalah spesifik untuk pengesanan Xoo yang mengakibatkan penyakit BLB pada padi. Kaedah LAMP diikuti dengan asai penggumpalan partikel adalah kaedah diagnostik yang berpotensi untuk aplikasi di lapangan pada masa akan datang. Manfaat utama kaedah diagnostik molekul ini adalah untuk memberikan keputusan yang cepat secara in situ supaya membolehkan petani membuat keputusan pengurusan segera dan meminimumkan kerugian. Kelebihan tambahan adalah pengurangan masalah logistik yang berkaitan dengan pengangkutan sampel ke makmal berpusat untuk analisis penyakit dan juga kos buruh. Secara ringkasnya, kaedah makmal tradisional adalah tepat, tetapi memerlukan ramai buruh dan proses adalah perlahan dan yang paling penting memerlukan kakitangan teknikal yang sangat khusus. Manakala kaedah diagnostik molekul yang dibangunkan ini adalah mudah alih dan mesra pengguna yang dapat dikendalikan oleh seorang pengguna tanpa kemahiran saintifik khusus semasa menjalankan ujian.

Penghargaan

Kajian ini dibiayai oleh projek PRB 401, Dana Pembangunan MARDI.

Bibliografi

- Agrios, G.N. (2005) *Plant Pathology*, Edisi Kelima. New York: Elsevier Academic Press
- Barany, F. (1991). The ligase chain reaction in a PCR world. *PCR Methods Appl* 1: 5 – 16
- Bhat, A.I., Siljo, A. dan Deeshma, K.P. (2013). Rapid detection of piper yellow mottle virus and Cucumber mosaic virus infecting black pepper (*Piper nigrum*) by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Journal of Virological Methods* 193: 190 – 196
- Craw, P. dan Balachandran W. (2012). Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: A critical review. *Lab Chip* 12: 2469 – 2486
- Dai, J., Peng, H., Chen, W., Cheng, J. dan Wu, Y. (2013). Development of multiplex real-time PCR for simultaneous detection of three Potyviruses in tobacco plants. *Journal of applied microbiology* 114: 502 – 508
- Fukuta, S., Takahashi, R., Kuroyanagi, S., Ishiguro, Y., Miyake, N., Nagai, H., Suzuki, H., Tsuji, T., Hashizume, F., Watanabe, H. dan Kageyama, K. (2014). Development of loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Pythium myriotylum*. *Letters in Applied Microbiology* 59: 49 – 57
- Gill, P. dan Ghaemi, A. (2008). Nucleic acid isothermal amplification technologies - A review. *Nucleosides Nucleotides and Nucleic Acids* 27: 224 – 243
- González, A.D., Franco, M.A., Contreras, N., Galindo-Castro, I., Jayaro, Y. dan Graterol, E. (2015). First Report of *Pantoea agglomerans* causing rice leaf blight in Venezuela. *Plant Dis.* 99: 552 – 552. Diperoleh dari doi: 10.1094/PDIS-07-14-0736-PDN
- Hadersdorfer, J., Neumuller, M., Treutter, D. dan Fischer, T.C. (2011). Fast and reliable detection of Plum pox virus in woody host plants using the Blue LAMP protocol. *Annals of Applied Biology* 159: 456 – 466
- Healy, T.W., La Mer, V.K. (1964). The energetics of flocculation and redispersion by polymers. *Journal of Colloid Science* 19: 323 – 332
- Horsfall, J.G., Cowling, E.B. (1977). Plant disease: an advanced treatise. New York: Academic Press
- Nino-liu, D.O., Ronald, P.C., Boqdanave, A.J. 2006. *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. *Molecular Plant Pathology* 7(5): 303 – 24
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T. dan Watanabe, K. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 28(12): E63
- Piepenburg, O., Williams, C.H., Stemple, D.L., Armes, N.A. (2006). DNA detection using recombination proteins. *Plos Biololgy* 4: 1,115 – 1,121

- Price, J.A., Smith, J., Simmons, A., Fellers, J., Rush, C.M. (2010). Multiplex real-time RT-PCR for detection of Wheat streak mosaic virus and Triticum mosaic virus. *Journal of Virological Methods* 165: 198 – 201
- Ruehrwein, R.A. dan Ward, D.W. (1952). Mechanism of clay aggregation by polyelectrolytes. *Soil Science* 73: 485 – 492
- Tomlinson, J.A., Dickinson, M.J. dan Boonham, N. (2010). Detection of *Botrytis cinerea* by loop-mediated isothermal amplification. *Letters in Applied Microbiology* 51, 650 – 657
- Vincent, M., Xu, Y. dan Kong, H.M. (2004). Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *Embo Reports* 5: 795 – 800
- Wee E.J.H., Lau, H.Y., Botella, J.R. dan Trau, M. (2015). Re-purposing bridging flocculation for on-site, rapid, qualitative DNA detection in resource-poor settings. *Chemical Communications* 51: 5828
- Yager, P., Edwards, T., Fu, E., Helton, K. dan Nelson, K. (2006). Microfluidic diagnostic technologies for global public health. *Nature* 442: 412 – 418

Ringkasan

Pengesanan patogen tumbuhan di lapangan dengan cepat adalah penting bagi pembangunan kaedah diagnostik penyakit tumbuhan. Dalam kajian ini, kami menerangkan kaedah diagnostik baharu untuk pengesanan asid nukleik patogen tumbuhan di lapangan melalui gabungan amplifikasi DNA secara isoterma dan diikuti dengan penilaian hasil amplifikasi DNA dengan mata kasar melalui asai penggumpalan partikel untuk tujuan pengesanan kualitatif (Ya/Tidak). Kaedah yang baharu dibangunkan ini telah berjaya mengesan *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) iaitu bakteria penyebab penyakit hawar daun bakteria pada padi. Kajian spesifisiti dijalankan dengan menggunakan *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Xoc) dan had sensitiviti kaedah diagnostik yang diperolehi ialah 0.5 pg gDNA Xoo (~90 salinan DNA). Kaedah ini dapat dijalankan tanpa memerlukan bekalan kuasa elektrik, dapat dilakukan di lapangan oleh kakitangan dengan latihan minimum dan memberikan hasil bacaan dalam masa kurang daripada 90 minit berbanding dengan kaedah PCR yang memerlukan lebih daripada 3 jam.

Summary

On-site and rapid pathogen detection is the holy grail of plant disease diagnostics. In this study, we describe a new diagnostic method for on-site pathogenic nucleic acid detection via a combination of a robust isothermal amplification and a novel naked-eye evaluation via bridging flocculation to provide binary Yes/No results. This newly developed method has successfully detected *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) causing bacterial leaf blight disease in paddy. The specificity test was carried out with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Xoc) and the limit of sensitivity of the diagnostic method was determined as 0.5 pg of gDNA Xoo (~90 DNA copy number). This method can be performed without electrical power supply, can be performed in the field by minimally trained personnel and yielding results in below 90 minutes compared with conventional PCR method (3 hours).

Pengarang

Lau Han Yih (Dr.)

Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi, Ibu Pejabat MARDI
Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

E-mel: hylau@mardi.gov.my

Kogeethavani Ramachandran

Pusat Penyelidikan Padi dan Beras, MARDI Seberang Perai
13200 Seberang Perai, Pulau Pinang

Sohana Romeli

Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi, Ibu Pejabat MARDI
Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor