

DELOVNE ZBIRKE ŠKODLJIVIH, REFEREN NIH IN KONTROLNIH BAKTERIJ, VIRUSOV IN VIROIDOV NA NACIONALNEM INŠTITUTU ZA BIOLOGIJO

Tanja DREO¹, Nataša MEHLE², Špela PRIJATELJ-NOVAK³, Lidija MATI I⁴, Manca
PIRC⁵, Maja RAVNIKAR⁶

^{1,2,3,4,5,6}Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo,
Ljubljana

IZVLE EK

Referen ni in drugi kontrolni materiali so nepogrešljivi v diagnostiki in pri raziskovalnem delu. Na podro ju varstva rastlina za škodljive bakterije, viruse in viroide (ŠO) ni na voljo certificiranih referen nih materialov z znano sestavo, koncentracijo tar nega organizma in drugimi znanimi karakteristikami. Ve ino kontrol, ki jih uporabljamo pri našem delu, npr. pozitivne kontrole izolacije DNA z znano koncentracijo škodljivih mikrobov v rastlinskem materialu, zato pripravljamo sami. Z njimi med drugim preverjamo in potrjujemo ustrezno delovanje testov ali izvedbo eksperimentov (njihovo specifi nost, selektivnost, ob utljivost in robustnost) ter jih uporabljamo pri razvoju in validaciji metod. V ta namen od leta 1990 z upoštevanjem navodil World Federation For Culture Collections vzdržujemo delovno zbirko bakterij, shranjenih na sistemu Microbank (Pro-Lab diagnostics). Zbirko fitoplazem, ki jih ni mogo e gojiti na umetnih gojiš ih, ter pomembnejše izolate virusov vzdržujemo v tkivnih kulturah ali na okuženih rastlinah v karantenskem rastlinjaku, medtem ko ostale viruse in viroide shranjujemo zamrznjene. V zbirki virusov, viroidov in fitoplazem je 359 izolatov, bakterij pa je ve kot 2000 izolatov. Med temi so (i) tipski izolati vrst in patovarjev za rastline škodljivih mikrobov (referen ni izolati), (ii) izolati, ki lahko navzkrižno reagirajo v testih detekcije škodljivih mikrobov, (iii) izolati, ki predstavljajo mikrofloro gostiteljskih rastlin in (iv) izolati škodljivih mikrobov, ki smo jih iz vzorcev osamili in dolo ili na Nacionalnem inštitutu za biologijo. Zadnji so nepogrešljivi pri uvajanju in razvoju novih metod, saj se izolati pri nas lahko razlikujejo od izolatov, ki so uporabljeni pri razvoju reagentov v drugi državi, zaradi esar le-ti niso vedno ustrezni za analize doma ih vzorcev. Izolate smo že uporabili za izboljšave obstoje ih metod in za razvoj novih metod sledenja ter za filogeografske analize škodljivih mikrobov.

Klju ne besede: diagnostika, škodljivi mikrobi, zbirke referen nih materialov

ABSTRACT

WORKING CULTURE COLLECTIONS OF HARMFUL, REFERENCE AND CONTROL BACTERIA, VIRUSES AND VIROIDS AT THE NATIONAL INSTITUTE OF BIOLOGY

Reference and other control materials are essential in diagnosis and in research work. In the field of plant pathology certified reference materials of known composition, the concentration of the target plant pathogen and other known characteristics are not available. Most of the

¹ dr. bioteh. znan., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana, e-mail: tanja.dreo@nib.si

² dr., prav tam

³ prav tam

⁴ prav tam

⁵ dr., prav tam

⁶ prof., dr. biol. znan., prav tam

controls that we use in our work we therefore prepare ourselves e.g. positive controls of DNA extraction that contain defined low concentration of the target plant pathogen in the background plant material. Controls are used to check and confirm the proper performance of the tests or the experiments (their specificity, sensitivity and robustness) and in the development and validation of methods. For this purpose we maintain a working collection of bacteria on the Microbank system (Pro-Lab Diagnostics) since 1990, following the World Federation for Culture Collections guidelines. The collection of phytoplasma that cannot be grown in culture media, and virus isolates most relevant to our work are maintained in tissue culture or in infected plants in the quarantine greenhouse, while other viruses and viroids are stored frozen. The collection of viruses, viroids and phytoplasmas contains 359 isolates and more than 2000 isolates of bacteria including (i) the type isolates of plant pathogens (reference isolates), (ii) isolates, which can cross-react in the detection test, (iii) isolates, representing microflora of the host plants, and (iv) isolates harmful organisms, which were isolated from the samples and identified at National institute of biology. The last group is indispensable in the introduction and development of new methods. Isolates present in Slovenia may in fact differ from the isolates from other countries, used in the development of reagents and consequently such tests are not always suitable for the analysis of the local samples. The Slovenian isolates were already used to improve existing methods and to develop the methods of source-tracking and for phylogenetic analysis of plant pathogens.

Key words: diagnostics, plant pathogens, collection of reference materials

1 UVOD

340

Referen ni in drugi kontrolni materiali so nepogrešljivi v diagnostiki in pri raziskovalnem delu. Na področju varstva rastlin za škodljive bakterije, viruse in viroide, ki jih bomo v nadaljevanju zaradi jedrnatosti opisovali s skupnim izrazom škodljivi organizmi (ŠO), ni na voljo certificiranih referenčnih materialov z znano sestavo, koncentracijo tarnega mikroba in drugimi znanimi karakteristikami. Večino kontrol, ki jih uporabljamo pri našem delu, zato pripravljamo sami. V prispevku predstavljamo zbirko ŠO in izbrane primere njene uporabe v diagnostiki in raziskavah.

2 MATERIALI IN METODE

2.1 Zbirka bakterij

Bakterije od leta 1990 vzdržujemo na sistemu Microbank (Pro-Lab diagnostics) in pri tem sledimo navodilom World Federation For Culture Collections (<http://www.wfcc.info/>) Sistem Microbank shranjujemo pri nizkih temperaturah (< -75 °C), kar bakterijam omogoča preživetje in ohranjanje virulence vsaj deset let. Izjema so npr. bakterije rodu *Xanthomonas*, ki so posebno občutljive in shranjevanje preživijo krajši čas, ter tudi *Xylella fastidiosa*, ki jo vzdržujemo z rednim gojenjem in precepljanjem na selektivnih gojiščih.

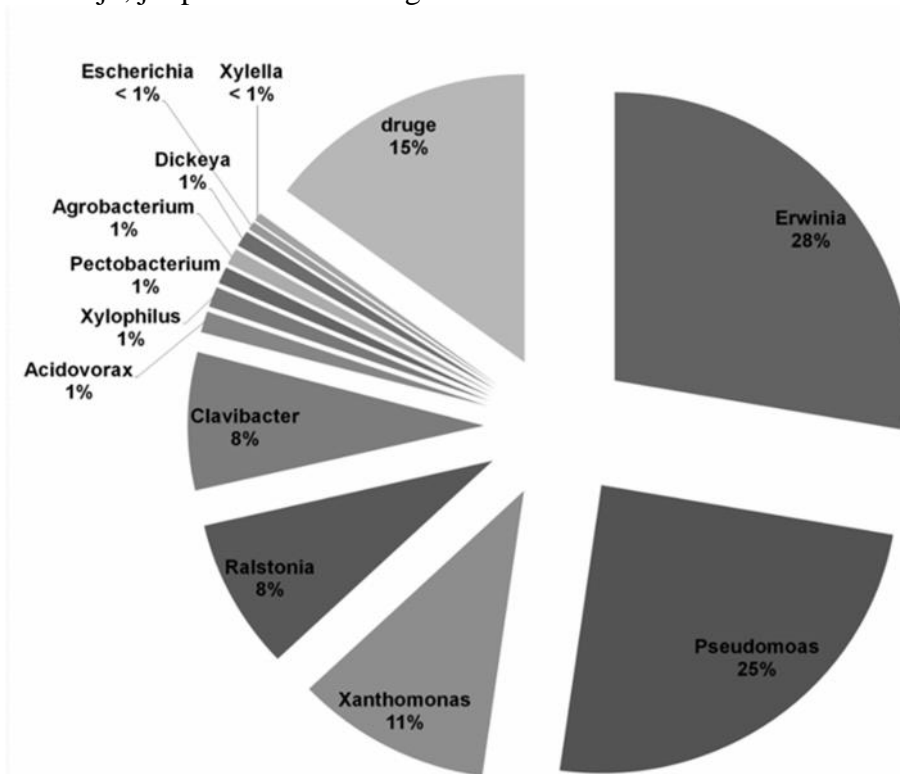
2.2 Zbirka fitoplazem, virusov in viroidov

Zbirko fitoplazem, ki jih ni mogoče gojiti na umetnih gojiščih, ter pomembnejše izolate virusov vzdržujemo v tkivnih kulturah ali na okuženih rastlinah v karantenskem rastlinjaku. Ostale viruse in viroide shranjujemo na -80 °C ali v liofilizirani obliki na -20 °C. Na dolgoročno obdobje preverimo njihovo kužnost in jih ponovno namnožimo na rastlinah. V zbirki je 359 izolatov, vključno z izolati, za katere hranimo le izolirano RNA oziroma DNA.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

3.1 Izvor mikrobov in drugih povzročiteljev bolezni v zbirkah NIB

Škodljive mikrobove uvažamo in premešamo v skladu s Pravilnikom o pogojih za uvoz ali premešanje določenih škodljivih organizmov, rastlin, rastlinskih proizvodov in nadzorovanih predmetov za poskusne, raziskovalne ali razvojne namene in za delo pri žlahtnjenju rastlin (Uradni list RS, št. 69/01, 40/04). Najpogosteje jih najdemo v mednarodnih zbirkah mikroorganizmov, kot so NCPPB (National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, FERA, York, UK), CFBP (Collection Française des Bactéries Phytopathogènes, Institut National de la Recherche Agronomique, Beaucauzé Cedex, France), BCCM/LMG (Belgian Co-Ordinated Collections Of Micro-Organisms) in v drugih zbirkah, ki upoštevajo mednarodne smernice verifikacije izolatov in njihovega vzdrževanja. V primeru, da izolati, ki jih potrebujemo, v teh zbirkah niso na voljo, jih pridobimo od drugih raziskovalcev.



Slika 1: Zastopanost različnih rodov bakterij v delovni zbirki Nacionalnega inštituta za biologijo.

3.2 Vrste škodljivih mikrobov v zbirkah

V zbirkah hranimo in vzdržujemo material, ki ga uporabljamo pri pripravi kontrol. V zbirki bakterij imamo tako (i) tipske izolate različnih vrst za rastline patogenih mikrobov (referenčni izolati), (ii) izolate, ki lahko navzkrižno reagirajo v testih detekcije škodljivih mikrobov, (iii) izolate, ki predstavljajo mikrofloro gostiteljskih rastlin, (iv) druge izolate škodljivih mikrobov, ki smo jih iz vzorcev osamili in določili na Nacionalnem inštitutu za biologijo ter (v) druge zanimive izolate, npr. bakterije s potencialom zaščitne rastlin pred škodljivimi organizmi.

V zbirki bakterij imamo več kot 2000 izolatov. Med njimi so najbolj zastopane bakterije iz rodu *Erwinia*, predvsem vrsta *Erwinia amylovora* zaradi intenzivnega posebnega nadzora bakterijskega hruševega ožiga, in iz rodu *Pseudomonas*, ki smo jih izolirali v okviru

obsežnejše študije raznolikosti teh bakterij v Sloveniji (Dreo in sod., 2007; Pirc, 2010). Tem po števil nosti sledijo bakterije iz rodov *Xanthomonas*, *Ralstonia* in *Clavibacter* ter druge za rastline patogene bakterije (slika 1).

Poleg povzročiteljev bolezni v zbirki vzdržujemo tudi bakterije, ki predstavljajo naravno floro zdravih rastlin, npr. rodove *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Ochrobactrum*, *Pantoea* in druge, bakterije, ki navzkrižno reagirajo z reagenti v diagnostiki njih testih ter izolate s potencialom za biotično zatiranje škodljivih organizmov.

V zbirki fitoplazem, virusov in viroidov je skupno 359 izolatov, ki so bili odkriti v različnih državah. V zbirki fitoplazem prevladujejo tiste, ki povzročajo bolezni na sadnem drevju in vinski trti, v zbirki viroidov so predvsem različni predstavniki iz rodu pospiviroidov, v zbirki virusov pa prevladujejo virus mozaika pepina, tospovirusi, številni različni virusi Y krompirja in drugi virusi, ki okužujejo vrtnine in okrasne rastline ter virusi vinske trte.

3.3 Zagotavljanje kakovosti rezultatov analiz

Na področju varstva rastlin za ŠO ni na voljo certificiranih referenčnih materialov z znano sestavo, koncentracijo tarnega mikroba in drugimi znanimi karakteristikami. Večino kontrol, ki jih uporabljamo pri našem delu, npr. pozitivne kontrole izolacije DNA z znano absolutno ali relativno koncentracijo ŠO v rastlinskem materialu, zato pripravljamo sami in s tem nadomeščamo odsotnost referenčnih materialov. Z njimi npr. dokazujemo, da je vsaka serija izolacije nukleinskih kislin in PCR v realnem času dovolj občutljiva in ustrezna, da so kemikalije ustrezne kakovosti in da aparature brezhibno delujejo (Mehle in sod., 2014a).

Število škodljivih mikrobov v materialih določimo s štejeanjem celic, kolonij ali z določenim številom kopij nukleinskih kislin z molekularnimi metodami, npr. z digitalno PCR reakcijo (Dreo in sod., 2014; Mehle in sod., 2014b).

342

3.4 Razvoj in validacija metod

Pri razvoju in validaciji metod v testiranju vključimo veliko število tar in ne-tar in izolatov (glej npr. Pirc in sod., 2009; Lenar in sod., 2013; Kogovšek in sod., 2014). Posebno pomembno je, da vključimo tudi izolate iz Slovenije. Pri določenju bakterij iz rodu *Xanthomonas* se je že večkrat izkazalo, da reagenti, ki so bili razviti za določanje bakterij, izoliranih na drugih geografskih območjih, z našimi izolati ne reagirajo ali reagirajo z manjšo občutljivostjo. Druga skrajnost je povečana stopnja lažno pozitivnih rezultatov, kakor smo jih npr. opazili pri uporabi vgnezdene reakcije PCR (Llop in sod., 2000) pri testiranju bakterije *Erwinia amylovora* (Ea) (> 60 % lažno pozitivnih vzorcev). To je vodilo v razvoj bolj specifične in ustreznejše metode PCR v realnem času (Pirc in sod., 2009), ki je zdaj del EPPO protokola za določanje te bakterije (PM 7/20 (2)).

3.5 Raziskave biologije škodljivih mikrobov

Številne izolate *Erwinia amylovora* iz zbirke smo s pridom uporabili za filogeografsko analizo te bakterije, kar predstavlja prvo takšno analizo te bakterije na svetu (Bühlmann in sod., 2014). Izolati nam služijo tudi pri primerjalnih študijah molekularne raznolikosti fitoplazem (Pavšič in sod., 2014).

3.6 Izzivi vzdrževanja zbirk

ŠO vzdržujemo v karantenskih razmerah, ki zagotavljajo, da ne pride do izpusta ŠO v okolje ter hkrati, da se lastnosti ŠO čim bolj spreminjajo. Nadzor množice izolatov zahteva

sistemati no delo, pri čemer je še posebno pomembno zbiranje metapodatkov, torej podatkov vezanih na sam vzorec kot so npr. lokacija, datum odvzema, bolezenska znamenja, s katerimi metodami smo potrdili identiteto izolata in podobni podatki. Ob pripravi Nagoya protokola so na srečanju Konvencije o biološki raznovrstnosti v letu 2014 ugotovili, da se zbirke mikroorganizmov srečujejo ne le z znanstvenimi in tehnološkimi izzivi, temveč tudi s socio-ekonomskimi omejitvami, legalnimi in političnimi dogajanjem ter nenazadnje s pritiski ob razvoju tako imenovane »knowledge based bio-economy«. Za manjše zbirke so te težave enake, zato večina manjših zbirk ne izpolnjuje nekaterih zahtev WFCC, kot je npr. objava kataloga zbirke na internetu ali v tiskani obliki. Iz tega razloga ostajajo mnogi izolati širšemu znanstvenemu krogu neznan.

Na nivoju EU je potreba po vzdrževanju zbirk že prepoznana, saj je v teku projekt, ki izvaja inventarizacijo zbirk škodljivih in drugih mikrobov, ogoric in žuželk (Q-collect, <http://www.q-collect.eu/>). V okviru projekta so bile predstavljene tudi slovenske zbirke mikrobnih povzročiteljev bolezni in škodljivcev.

4 SKLEPI

Zbirke škodljivih mikrobov so izredno dragocen rezultat našega dela, ki je hkrati osnova za nov razvoj in raziskave. Z uporabo izolatov iz zbirke smo že izboljšali mnoge metode in omejili škodo zaradi ukrepanja ob lažno pozitivnih rezultatih (Ea) ter hkrati izboljšali obutljivost mnogih metod.

Vzdrževanje zbirk na in, ki zagotavlja nespremenljivost izolatov in ohranjanje njihovih bioloških lastnosti, je osnovno zahtevno in potrebuje stalno podporo. Pomanjkanje podpore je že vodilo v propad mnogih zbirk po svetu, saj se je izgubila tudi možnost edinstvenega vpogleda v razvoj in geografsko raznolikost škodljivih mikrobov.

5 ZAHVALA

Zbirke vzdržujemo v okviru diagnostičnih in raziskovalnih aktivnosti in jih sofinancira Uprava za varno hrano, veterino in varstvo rastlin v okviru strokovne naloge s področja zdravstvenega varstva rastlin in v okviru različnih raziskovalnih projektov. Rastlinski material, iz katerega smo izolirali mnoge izolate, je bil nabran v okviru posebnih nadzorov in drugih pregledov, v katerih so poleg Uprave in Inšpekcije sodelovali pregledniki s Kmetijsko gozdarskih zavodov, Kmetijskega inštituta Slovenije, Inštituta za hmeljarstvo in drugi. Vsem se iskreno zahvaljujemo za dolgoletno uspešno sodelovanje.

6 LITERATURA

- Bühlmann, A., Dreo, T., Rezzonico, F., Pothier, J.F., Smits, T.H.M., Ravnikar, M., Frey, J.E., Duffy, B., 2014. Phylogeography and population structure of the biologically invasive phytopathogen *Erwinia amylovora* inferred using minisatellites. *Environ. Microbiol.* 16: 2112–2125. doi:10.1111/1462-2920.12289
- Dreo, T., Pirc, M., Ramšak, Z., Pavšič, J., Milavec, M., Zel, J., Gruden, K., 2014a. Optimising droplet digital PCR analysis approaches for detection and quantification of bacteria: a case study of fire blight and potato brown rot. *Anal Bioanal Chem.* doi:10.1007/s00216-014-8084-1
- Kogovšek P., Hodgetts J., Hall J., Prezelj N., Nikolić P., Mehle N., Lenarčič R., Rotter A., Dickinson M., Boonham N., Dermastia M., Ravnikar M., 2014. LAMP assay and rapid sample preparation method for on-site detection of flavescence dorée phytoplasma in grapevine. *Plant Pathology*: 11 p. [in press]. doi: 10.1111/ppa.12266.
- Lenarčič, R., Morisset, D., Pirc, M., Llop, P., Ravnikar, M., Dreo, T., 2014. Loop-mediated isothermal amplification of specific endoglucanase gene sequence for detection of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *PLoS ONE* 9, e96027. doi:10.1371/journal.pone.0096027
- Llop, P., Bonaterra, A., Peñalver, J., López, M.M., 2000. Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 2071–2078.

- Mehle N., Dreo T., Jeffries C., Ravnikar M., 2014a. Descriptive assessment of uncertainties of qualitative real-time PCR for detection of plant pathogens and quality performance monitoring. *Bulletin OEPP*, 44, 3: 502-509
- Mehle N., Dreo T., Ravnikar M., 2014b. Quantitative analysis of "flavescence doreé" phytoplasma with droplet digital PCR. *Phytopathogenic Mollicutes*, 4, 1: 9-15
- Pavši J., Mehle N., Nikoli P., Dermastia M., 2014. Molecular diversity of 'Candidatus Phytoplasma pyri' isolates in Slovenia. *European Journal of Plant Pathology*, 139, 4: 801-809
- Pirc M. 2010. Raziskave bakterij, povzročiteljev ožiga, na rastlinah iz družine Rosaceae: doktorska disertacija. Ljubljana.
- Pirc M., Ravnikar M., Tomlinson J., Dreo T. 2009. Improved fireblight diagnostics using quantitative real-time PCR detection of *Erwinia amylovora* chromosomal DNA. *Plant Pathology*, 58, 5: 872-881
- PM 7/20 (2) *Erwinia amylovora*, 2013. . *EPPO Bull* 43, 21–45. doi:10.1111/epp.12019