

UPORABA TKIVNIH KULTUR ZA IZBOLJŠANJE DETEKCIJE FITOPLAZEM V VINSKI TRTI

Nataša PETROVIČ¹, Nataša JERAJ² in Maja RAVNIKAR³

^{1,2,3} Nacionalni inštitut za biologijo,

Oddelek za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo,

Večna pot 111, Ljubljana 1000, Slovenija, e-mail: natasa.petrovic@uni-lj.si

IZVLEČEK

Neenakomerna razporejenost, nizka vsebnost in sezonska nihanja vsebnosti fitoplazem v trsih predstavljajo glavne ovire pri uvajanju in standardizaciji protokolov za rutinsko uporabo molekularno-bioloških laboratorijskih detekcijskih metod za potrebe potrjevanja in karantenskega nadzora. Rezultati so pokazali višjo vsebnost in enakomernejšo porazdelitev fitoplazem v okuženih rastlinah *Vitis vinifera* in *Catharanthus roseus* gojenih v tkivni kulturi v primerjavi z rastlinami, ki so rasle v zemlji, kar nakazuje možnost uporabe tkivnih kultur kot alternativne metode za izboljšanje razmer za ugotavljanje fitoplazem v vinski trti, posebej, kadar gre za njihovo izredno nizko vsebnost v specifičnih vzorcih ter pri odkrivanju morebitnih latentnih okužb.

Ključne besede: *Catharanthus roseus*, detekcijske metode, fitoplazme, tkivna kultura, trsne rumenice, vinska trta, *Vitis vinifera*

ABSTRACT

THE USE OF TISSUE CULTURE FOR IMPROVED DETECTION OF PHYTOPLASMA IN GRAPEVINES

Heterogenous distribution, low concentration and seasonal variations of grapevine yellows phytoplasma in grapevines remain as main problems which prevent the introduction and standardization of molecular biology-based quick laboratory detection protocols for their routine use in certification and quarantine. The results showed increased phytoplasma concentration and homogenous distribution in infected *Vitis vinifera* and *Catharanthus roseus* grown in tissue culture in comparison to plants grown in soil. Present results indicate the potential use of tissue culture as an alternative tool in improving laboratory methods of phytoplasma detection in grapevines, especially in detecting extremely low concentrations of phytoplasma in specific samples of grapevine, and in discovering latent infections.

Key words: *Catharanthus roseus*, detection methods, grapevine yellows, grapevine, phytoplasma, tissue culture, *Vitis vinifera*

¹ dr. biol. znan., SI-1000 Večna pot 111

² študentka mikrobiol., prav tam

³ prof. dr. znan., prav tam

1. UVOD

Na vinski trti se pojavlja več gospodarsko pomembnih boleznih, ki jih povzročajo različni tipi fitoplazem. Te lahko nastopajo posamič ali v obliki mešanih okužb, v vsakem primeru pa povzročajo enaka bolezenska znamenja (Boudon-Padieu in Maixner, 1998).

Za ugotavljanje zastopanosti fitoplazem, ki povzročajo bolezni trsnih rumenic na vinski trti je opisanih že kar nekaj občutljivih, specifičnih in zanesljivih laboratorijskih metod (Lee 1993; Daire s sod., 1997). Posamezne tipe fitoplazem je mogoče določiti z analizami DNK in vzorčenjem primernega izhodnega tkiva. Zaradi nehomogene razporeditve in nizke koncentracije fitoplazem ter vpliva inhibitorjev je ekstrakcija fitoplazemske DNK močno odvisna od izhodnega materiala (specifičnega tkiva, njegove priprave, letnega časa...).

Še vedno pa so pri vseh metodah težave: neenakomerna razporejenost, nizka vsebnost in sezonska nihanja v vsebnosti fitoplazem v trsih. Le-ti so glavne ovire pri uvažanju in standardizaciji protokolov za rutinsko uporabo molekularno-bioloških in seroloških hitrih laboratorijskih detekcijskih metod za potrebe potrjevanja in karantenskega nadzora.

Prejšnje izkušnje kažejo na povečanje koncentracije in na homogeno razporeditev virusov v vseh organih v rastlinah krompirja (Petrovič s sod., 1995) in vinske trte (Tanne, 1997), ki jih gojimo v tkivni kulturi. Predvidevali smo, da se bo zaradi specifičnih razmer rasti v tkivni kulturi podobno pokazalo pri rastlinah vinske trte in *Catharanthus roseus*, ki so okužene s fitoplazmami. Sklepali smo, da bi lahko z uporabo metodike tkivnih kultur poskušali rešiti težave, ki nastopajo pri analizi fitoplazem na vinski trti.

2. MATERIAL IN METODE

Za izvoren rastlinski material smo uporabili trse *Vitis vinifera* iz Ampelografskega vrta Biotehniške fakultete v Kromberku in sicer pet trsov sorte Chardonnay, dva sorte Rebula in en sorte Modri pinot, ki kažejo bolezenska znamenja okužbe s fitoplazmami že več let. Analizirali smo jih kot rastline iz vinograda (nabrano septembra 1999) in kot rastline iz tkivne kulture.

Poleg tega smo analizirali tudi rastline *Catharanthus roseus* okužene z izolati rumenic skupin: Aster (AY), X-disease (X-D) in Stolbur (STOL), ki smo jih dobili na Univerzi v Udinah, Italija in *C. roseus* okužene z izolati rumenic Flavescence doree (FD70) in Bois noir (STOL C), ki smo jih dobili iz INRA v Dijonu, Francija. Te rastline so nam služile za izolacijo fitoplazemske kontrolne DNK. Testirali smo jih v obliki rastlin vzgojenih v lončkih v rastlinjaku in v obliki *in vitro* vzgojenih rastlin.

Negativne kontrole so predstavljale zdrave rastline *C. roseus* in *V. vinifera* sorte Zelen, ki je bil vzgojen iz kulture meristema. Tudi te smo analizirali kot rastline vzgojene v zemlji in kot rastline iz tkivne kulture.

Pri rastlinah, ki so rasle v zemlji, smo za testiranje uporabili listne žile iz več različnih poganjkov, pri *in vitro* rastlinah pa smo ločeno testirali celotne poganjke in korenine.

Sterilizacija rastlinskega materiala in vzpostavitev tkivne kulture stebelnih nodijev

Iz mladih, še zelenih, neolesenelih poganjkov (mladic) smo odstranili liste in nadaljnje delo opravljali v laminariju. Mladice smo razrezali na 3 - 4 nodije in jih sterilizirali v 1% natrijevem hipokloritu, čemur je sledilo spiranje v avtoklavirani bidestilirani vodi, ki ga ponovimo trikrat po 5 minut. Na vsake 3 - 4 tedne smo rastline prestavljali na sveže gojišče.

Razmere rasti v tkivni kulturi

Kot osnovno gojišče za nodijsko kulturo vinske trte in *C. roseus* smo uporabili 1/2 MS gojišče (Murashige in Skoog) po 10 ml v epruvetah 20x150 mm. Osvetljevali smo z žarnicami OSRAM L36 W/36, Fluora, Nemčija. Fotoperioda v rastnih komorah je bila 16 ur svetlobe (temperatura 21°C) in 8 ur teme (temperatura 19°C).

Ob prenosu rastlinic iz epruвет kot tudi ob prenosu v vodi ukoreninjenih poganjkov vinske trte iz vinograda v lončke smo uporabili sterilno zemljo pomešano s šoto (Huminsubstrat N3, Neuhaus).

Detekcijske metode za analizo fitoplazem

Za analizo fitoplazem v vinski trti in *C. roseus* smo uporabili metodi ekstrakcije DNA in PCR z uporabo univerzalnih oligonukleotidnih začetnikov P1/P7 in U3/U5 (nested PCR) opisani v Daire s sod., 1997. Pozitivne kontrole so predstavljali vzorci *C. roseus* okuženi z referenčnimi sevi fitoplazem tipov AY, X-D, and STOL, ki nam jih je prijazno podaril prof. Ruggero Osler (Univerza Udine, Italija) ter različkov fitoplazem trsnih rumenic STOL C in FD70, ki nam jih je prijazno podarila gospa Elisabeth Boudon-Padieu (INRA, Dijon, Francija). Za negativne kontrole smo uporabili zdrave rastline *C. roseus* in *V. vinifera* sorte Zelen gojene v tkivni kulturi stebelnih nodijev.

3. REZULTATI IN DISKUSIJA

Rezultati, prikazani v preglednici 1, jasno kažejo, da je vsebnost fitoplazem v vinski trti precej manjša kot v rastlinah *C. roseus*. Razvidno je tudi, da je zaradi izredno nizke vsebnosti fitoplazem v vinski trti uporaba žnested' PCR tehnike za povečanje občutljivosti analize še vedno neizogibna. Rezultati kažejo povečano vsebnost fitoplazem v rastlinah vinske trte in *C. roseus*, ki rasejo v tkivni kulturi, v primerjavi z rastlinami, ki rasejo v tleh. Pri tem je potrebno opozoriti, da je teža izhodnega tkiva za izolacijo DNK pri vinski trti v tkivni kulturi enkrat nižja kot pri rastlinah raslih v zemlji. Zanimivo je dejstvo, da so fitoplazme v rastlinah, raslih v tkivni kulturi, zastopane tako v poganjku kot tudi v koreninah in da je v slednjih koncentracija fitoplazem celo višja kot v poganjkih.

Preglednica 1: Rezultati PCR analize vinske trte (*Vitis vinifera*) (z izraženimi znamenji okuženosti s fitoplazmami trsnih rumenic, sort Chardonnay, Rebula in Modri pinot ter sorte Zelen kot negativna kontrola) ter *Catharanthus roseus* (okužen s fitoplazmami tipov AY, X-D in STOL), z uporabo parov univerzalnih oligonukleotidnih začetnikov P1 in P7 ter U3 in U5 za žnestež PCR.

Table 1: Results of PCR analysis of grapevine (*V. vinifera*) (with expressed symptoms of infection with grapevine yellows phytoplasma, cvs. Chardonnay, Rebula and Pinot Noir, and cv. Zelen as negative control) and *C. roseus* (infected by AY, X-D, and STOL), using universal primers P1/P7, and by nested PCR using primers U3/U5.

VZORCI	RASTLINE V TLEH				TKIVNA KULTURA			
	Vinograd		Rastlinjak		POGANJKI		KORENINE	
	PCR P1/P7	'nested' PCR U3/U5	PCR P1/P7	'nested' PCR U3/U5	PCR P1/P7	'nested' PCR U3/U5	PCR P1/P7	'nested' PCR U3/U5
Chardonnay	-	-	-	-	-	+	-	++
Rebula	-	-	-	-	-	+	-	++
Modri pinot	-	-	-	-	-	++	-	+
Zelen	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. roseus</i>								
AY okužen	NT	NT	-	+	+++	+++	NT	NT
X-D okužen	NT	NT	++	+++	++	+++	+	++
STOL okužen	NT	NT	++	+++	+++	+++	NT	NT

NT: ni bil testiran; - : ni bilo vidnega PCR produkta, +, ++ in +++ : tri stopnje intenzivnosti PCR pasu oziroma produkta.

Potrebno je poudariti, da je koncentracija fitoplazem v rastlinah ocenjena le glede na količino PCR produktov, ki jih dobimo pri postopku PCR v enakih razmerah. Razlike v tako ocenjeni vsebnosti fitoplazem v različnih rastlinah, tkivih ali v različnih razmerah rasti niso nujna posledica dejanskih razlik v vsebnosti fitoplazem, temveč so lahko tudi posledica različno močnih inhibitornih učinkov (na primer različne vsebnosti inhibitorjev PCR reakcije, kot so ogljikovi hidrati in fenoli). Pri nadaljnjem delu bomo priredili tudi alternativne metode za izolacijo fitoplazemske DNK po obogatitvenih postopkih.

4. SKLEPI

Uporaba tkivnih kultur predstavlja alternativo za izboljšanje razmer za ugotavljanje zastopanosti fitoplazem v vinski trti, posebej, kadar gre za izredno nizko vsebnost fitoplazem v specifičnih vzorcih ter pri odkrivanju morebitnih latentnih okužb. Tkivna kultura s fitoplazmami okuženih rastlin kaže tudi na nove možnosti pri študiju interakcij med rastlinami in fitoplazmami, gibanja fitoplazem po rastlini, čiščenja fitoplazem za pripravo protiteles in za ohranjanje določenih fitoplazemskih sevov in mutant.

5. VIRI

Boudon-Padieu E. in Maixner M. 1998. Jaunisses de la vigne: etat des connaissances et des methodes de lutte. Bulletin O.I.V., 71, 809-810: 573-607
Daire X., Clair D., Boudon-Padieu E. 1997. Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the Elm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of non-ribosomal DNA. European Journal of Phytopathology 103: 507-514