PRIMERJAVA RAZLIČNIH DIAGNOSTIČNIH METOD ZA DETEKCIJO VIRUSA NEKROTIČNEGA RUMENENJA LISTNIH ŽIL PESE (BNYVV)

Irena MAVRIČ[1], Mojca VIRŠČEK MARN[2]

Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Ljubljana

IZVLEČEK

Virus nekrotičnega rumenenja listnih žil pese (*Beet necrotic yellow vein furovirus* - BNYVV) je povzročitelj rizomanije, bolezni ki povzroča veliko ekonomsko škodo pri pridelavi sladkorne pese. Okužba zniža pridelek sladkorja, saj je nižja količina pridelka in/ali vsebnost sladkorja. Pridelek se lahko zmanjša na četrtino normalnega pridelka. Zaradi velikega gospodarskega pomena virusne okužbe in ker je vnos virusa in njegovo širjenje v zavarovanih območjih prepovedano, je pomembna njegova zgodnja in zanesljiva detekcija. Za detekcijo virusa v korenih pese in pri ugotavljanju virusa v tleh se navadno še vedno uporablja serološki test ELISA. Ker pa je predvsem testiranje tal zelo dolgotrajno, se v zadnjem času uporabljajo za detekcijo tudi metode na osnovi verižne reakcije s polimerazo (PCR). Te lahko skrajšajo čas analize skoraj na polovico. Že v predhodnih raziskavah smo ugotovili, da so molekulsko biološke metode precej občutljivejše od seroloških, opazili pa smo tudi razlike v občutljivosti različnih oblik reverzne transkripcije in PCR po predhodni imunski vezavi virusa (IC RT-PCR). V prispevku so opisani rezultati primerjave občutljivosti metod.

Ključne besede: BNYVV, ELISA, IC RT-PCR, nested PCR

ABSTRACT

COMPARISON OF DIFFERENT METHODS FOR THE DETECTION OF BEET NECROTIC YELLOW VEIN VIRUS (BNYVV)

BNYVV is a causal agent of rhizomania, serious disease of sugar beet. It can cause large scale reductions in yield through reduction of root weight and/or sugar content. Sugar beet varieties tolerant to rhizomania are available, but their use is limited because of lower yield. Early and reliable detection of infection is necessary because of big economic impact of the disease and because the introduction of the virus into and spread within protected zones is banned by the law. Serological test ELISA is usually used for detection of the virus in sugar beet and in soil but because the testing of the later lasts about 6 weeks molecular methods based on polymerase chain reaction (PCR) are being used in last years. They can significantly reduce testing time. In the preliminary research differences in the sensitivity between ELISA and molecular methods and also between different immuno-capture reverse transcription PCR (IC RT-PCR) protocols were observed. The results of the further study are presented.

Key words: BNYVV, ELISA, IC RT-PCR, nested PCR

1 UVOD

BNYVV je povzročitelj rizomanije, bolezni ki povzroča veliko ekonomsko škodo pri pridelavi sladkorne pese (*Beta vulgaris* L. var. *saccharifera*). Okužba zniža pridelek sladkorja, saj je nižja količina pridelka in/ali vsebnost sladkorja. Pridelek se lahko zmanjša iz 8-10 t/ha na samo 2-3 t/ha (Putz *et al.*, 1990). Virus prenaša gliva *Polymyxa betae*, obligatni parazit sladkorne pese, ki živi v tleh. Cistosori glive preživijo v tleh več let (vsaj 15), zato se ob setvi sladkorne pese na okuženem zemljišču bolezen lahko pojavi tudi, če ta poljščina ni bila gojena na lokaciji več let. Na BNYVV popolnoma odpornih sort sladkorne

[1] dr. mikrobiol. znanosti, Hacquetova 17, SI-1000 Ljubljana
[2] dr. kmet. znanosti, Hacquetova 17, SI-1000 Ljubljana

pese zazdaj še ni, delno odporne sorte pa dajejo na okuženih tleh nižji pridelek kot občutljive sorte na neokuženih tleh. Virus okužuje poleg sladkorne pese še krmno peso, rdečo peso, blitvo, špinačo in druge vrste iz družine *Chenopodiaceae*.
Za detekcijo virusa v korenih pese in pri ugotavljanju virusa v tleh se navadno še vedno uporablja serološki test ELISA. Ker pa je predvsem testiranje tal zelo dolgotrajno (Rush in Heidel, 1995), se v zadnjem času uporabljajo za detekcijo tudi metode na osnovi verižne reakcije s polimerazo (PCR) (Koenig in Lennefors, 2000; Morris *et al.*, 2001). Te lahko skrajšajo čas analize skoraj na polovico. Že v predhodnih raziskavah smo ugotovili, da so molekulsko biološke metode precej občutljivejše od seroloških, opazili pa smo tudi razlike v občutljivosti različnih oblik reverzne transkripcije in PCR po predhodni imunski vezavi virusa (IC RT-PCR). V prispevku so opisani rezultati primerjave občutljivosti različnih metod za detekcijo BNYVV v korenih sladkorne pese.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Rastlinski material

V raziskavi smo uporabili korene sladkorne pese, shranjene na -20°C. Vsi pozitivni vzorci so bili testirani z ELISA testom, negativni pa s PCR z notranjimi začetnimi oligonukleotidi (nested PCR). Pozitivne vzorce smo redčili s sokom negativnih vzorcev ali z ekstrakcijskim pufrom. Okužene vzorce smo strli v ekstrakcijskih vrečkah (Bioreba) z ekstrakcijskim pufrom v razmerju 1/4. To razredčitev smo označili kot 1/1. Nato smo pripravili 10-kratne serijske razredčitve z ekstrakcijskim pufrom ali sokom neokuženih rastlin do končne razredčitve 10^{-9}.

2.2 ELISA

Za serološko detekcijo BNYVV smo uporabljali DAS-ELISA test s protitelesi proizvajalca Bioreba. Test smo izvedli v skladu z navodili proizvajalca. Ista protitelesa smo uporabili tudi za vezavo virusa v prvem koraku molekulsko bioloških metod.

2.3 Nested PCR

Po predhodni vezavi virusa v mikrotitrskih ploščicah smo izvedli reverzno transkripcijo in verižno reakcijo s polimerazo (RT-PCR) in nested PCR po objavljenem protokolu (Morris *et al.*, 2001) z manjšimi spremembami. Uporabljali smo kemikalije proizvajalca Promega. Test smo izvedli v treh korakih. Najprej smo izvedli reverzno transkripcijo pri 42°C, 60 min, nato smo 10µl produkta uporabili v prvi PCR reakciji, 0.5µl tega produkta pa smo uporabili v drugi PCR reakciji. Uspešnost pomnoževanja smo opazovali na 1% agaroznem gelu z etidijevim bromidom.

2.4 RT-PCR

Po predhodni vezavi virusa v mikrotitrskih ploščicah smo izvedli RT-PCR z začetnima oligonukleotidoma Rhzn15 in Rhzn17 (Morris *et al.*, 2001). V PCR reakciji smo uporabili 2 µl produkta reverzne transkripcije. Uspešnost pomnoževanja smo opazovali na 1% agaroznem gelu z etidijevim bromidom.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Pri redčenju pozitivnih vzorcev z ekstrakcijskim pufrom ali s sokom negativnih vzorcev, pri ELISA testu nismo opazili bistvenih razlik v občutljivosti detekcije. Navadna RT-PCR reakcija se je izkazala le za 10-krat (za eno stopnjo pri serijskem redčenju) bolj občutljivo kot serološki test, medtem ko je bila občutljivost nested PCR bistveno višja (Preglednica 1). V večini primerov je bila slednja občutljivejša za faktor 10^5 do 10^6, pri čemer smo kot zadnjo upoštevali najvišjo razredčitev, pri kateri smo na gelu lahko opazili produkt. Pri običajnem PCR smo opazili, da se pomnožujeta dva produkta. Manjši, velikosti okrog 350bp ustreza pričakovanemu produktu 326bp, medtem ko bi bil večji produkt, velikosti

okrog 450bp, lahko nespecifični produkt reakcije. Vendar pa smo po sekvenciranju tega produkta in primerjavi njegove sekvence s sekvencami v EMBL banki ugotovili, da je tudi ta produkt pomnoženi del genoma BNYVV.

Preglednica 1: Primerjava občutljivosti metod pri treh analiziranih vzorcih sladkorne pese
Table 1: Sensitivity of detection methods for three sugar beet samples

	vzorec 1			vzorec 2			vzorec 3		
razredčitev	ELISA	PCR	nPCR	ELISA	PCR	nPCR	ELISA	PCR	nPCR
1	+	/	+	+	+	+	+	+	+
10^{-1}	-	/	+	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	-	/	+	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	-	/	+	-	+	+	-	+	+
10^{-4}	-	/	-	-	-	+	-	-	+
10^{-5}	-	/	+	-	-	+	-	-	+
10^{-6}	-	/	-	-	-	+	-	-	+
10^{-7}	-	/	-	-	-	+	-	-	+
10^{-8}				-	-	+	-	-	+
10^{-9}				-	-	+	-	-	-

- negativno; + pozitivno; / vzorec ni bil testiran s to metodo; nPCR nested PCR
- negative; + positive; / not tested; nPCR nested PCR

Pri analizi rezultatov nested PCR smo zaznali nenavaden pojav. Opazili smo, da pri večjih razredčitvah izgubimo pomnoženi specifični produkt, ki pa se pri naslednji razredčitvi zopet pojavi. V enem primeru pa smo opazili, da je prišlo do večjega pomnoževanja pri zadnji še pozitivni razredčitvi, kot pri predzadnji. Možna razlaga tega pojava bi bila zastopanost inhibitorjev v soku z virusom okužene sladkorne pese. Domnevamo, da pri visokih koncentracijah virusa ti inhibitorji ne vplivajo bistveno na pomnoževanje, medtem ko pri določenem razmerju virus - inhibitor slednji prepreči oziroma zavre pomnoževanje do take mere, da produkta na gelu ne opazimo. Pri naslednji razredčitvi je to razmerje zopet drugačno, in pomnoževanje lahko normalno poteka. Do tega pojava je prišlo tako pri redčenju soka okuženih rastlin z ekstrakcijskim pufrom, kot tudi pri redčenju s sokom neokuženih vzorcev.

Rezultati raziskave kažejo velike razlike v občutljivosti uporabljenih metod za detekcijo BNYVV. Predvsem se te razlike kažejo pri primerjavi nested PCR z ostalima uporabljenima metodama. Navadno je koncentracija virusa v korenih okužene sladkorne pese visoka, zato je pri pravilnem vzorčenju in nadaljnji pripravi vzorca ELISA test še vedno dovolj občutljiv. Pri testiranju pomembnejših vzorcev in pri testiranju vzorcev tal pa priporočamo uporabo nested PCR, ki je za faktor 10^7 do 10^8 občutljivejša od ELISA testa. Testiranje tal z biotičnim testom je namreč zelo dolgotrajno, saj se morajo v okužena tla posajene rastlinice najprej okužiti, nato pa mora koncentracija virusa narasti na tako količino, da ga lahko zaznamo z ELISA testom (Rush in Heidel, 1995). Z uporabo nested PCR pa lahko v izbranih vzorcih zaznamo izredno nizke koncentracije virusa, kar nam omogoča tudi skrajšanje prej omenjenega dolgotrajnega testiranja zemlje.

4 SKLEPI

V raziskavi smo primerjali občutljivost treh metod za detekcijo BNYVV, serološki test ELISA, RT-PCR in nested PCR. Ugotovili smo, da je najobčutljivejši test nested PCR, ki je kar za faktor 10^7 do 10^8 občutljivejša od ELISA testa, ki se navadno uporablja za detekcijo BNYVV, medtem ko je RT-PCR le 10-krat občutljivejši od le-tega. Ker pa je

običajno koncentracija virusa v korenih okužene sladkorne pese visoka, je pri pravilnem vzorčenju in nadaljnji pripravi vzorca ELISA test še vedno dovolj občutljiv, medtem ko priporočamo uporabo nested PCR za pomembnejše vzorce in za testiranje vzorcev zemlje na okužbo z BNYVV.

5 LITERATURA

Koenig, R., Lennefors, B.-L. 2000. Molecular analyses of European A, B ans P type sources of Beet necrotic yellow vein virus and detection of the rare P type in Kazakhstan. Archives of Virology 145: 1561-1570.

Morris, J., Clover, G.R.G., Harju, V.A., Hugo, S.A., Henry C.M. 2001. Development of a highly sensitive nested RT-PCR method for Beet necrotic yellow vein virus detection. Journal of Virological Methods, 95: 163-169.

Putz, C., Merdinoglu, D., Lemaire, O., Stocky, G., Valentin, P., Wiedemann, S. 1990. Beet necrotic yellow vein virus, causal agent of sugar beet rhizomania. Review of Plant Pathology 69, 5: 247-254.

Rush, C.M., Heidel, G.B. 1995. Furovirus diseases of sugar beets in the United states. Plant Disease 79, 9: 868-875.