

UDK 632.38:633.491:632.911(497.12)=863

VIROID VREtenATOSTI NA KROMPIRJU

Marija Pepelnjak
M-KŽK Kmetijstvo Kranj
Laboratorij za fiziologijo in virusne bolezni krompirja
Begunjska 5, 64000 Kranj

IZVLEČEK

Na krompirju je v Ameriki, Aziji in nekaterih delih Evrope razširjena nevarna bolezen vretenatosti gomoljev krompirja (PSTV - potato spindle tuber viroid). Tudi pri nas v Sloveniji se zavedamo nevarnosti te bolezni, zato smo v Laboratoriju za fiziologijo in virusne bolezni krompirja v Kranju začeli proučevati to bolezen, da bi v primeru njenega pojava lahko ustrezno ukrepali. Uvedli smo dve metodi za detekcijo viroida PSTV in sicer biotično metodo s testnimi rastlinami in metodo return poliakrilamid gel elektroforeze.

ABSTRACT

PSTV (Potato spindle tuber viroid)

Very dangerous potato disease known as the Potato Spindle tuber Viroid (PSTV) has been spreading in America, Asia and some parts of Europe. Realised the dangerous of that disease Laboratory for Physiology and Virus Diseases of Potato in Kranj started to study the Potato Spindle Tuber Viroid and its detection.

Two methods for detection of PSTV have been studied:

1. bioassay method with tomato test plant (*Lycopersicum esculentum* cv. Rutgers and cv. Cheyenne)
2. r-page method. Return polyacrylamide gel electrophoresis was practiced using infected potato and tomato material.

The symptoms of PSTV were observed on infected potato plants of cv. Russet Burbank and cv. Red Pontiac brought from Canada and compared with symptoms of PSTV on tomato test plants.

UVOD

Na krompirju je v Ameriki, Aziji in nekaterih delih Evrope razširjena nevarna bolezen vretenatosti gomoljev krompirja, ki jo povzroča viroid (PSTV - Potato Spindle Tuber Viroid). Je karantenska bolezen, ki pri nas še ni znana in je neraziskana. Pri uvozu krompirja iz Severne Amerike pa obstaja nevarnost, da jo zanesemo tudi v Slovenijo. Viroidi lahko povzročajo veliko ekonomsko škodo na različnih gojenih rastlinah: na kumarah, vinski trti, paradižniku, krompirju, hmelju, jablanah, okrasnih rastlinah, nageljnih, krizantemah, kokosovem orehu, avokadu ...

Na krompirju je bila bolezen vretenatost gomoljev prvič omenjena že leta 1917, opisana je bila kot virusna bolezen, leta 1971 pa so odkrili pravega povzročitelja tj. viroid.

Leta 1920 se je zaradi viroida PSTV zmanjšal pridelek za 25 % do 65 % na nekaterih poljih Nebraske, okuženih je bilo 3 - 99 % rastlin. 1950 leta se je v SZ zaradi okužb s PSTV na okuženih območjih zmanjšal pridelek za 54 %. PSTV je prav tako pomemben vzrok za degeneracijo krompirja na Kitajskem. V 50. in 60. letih so imeli velike težave s PSTV v Kanadi, toda učinkovita semenarska služba in vzgoja semenskega krompirja z metodo hitrega razmnoževanja preko meristema, so v semenskih nasadih popolnoma izkoreninili PSTV.

Izdelali so metode za detekcijo viroidov, ki so se razširile po vsem svetu.

Te metode so: dot-blot metoda, biotična metoda s testnimi rastlinami in metoda return poliakrilamid gel elektroforeze (R-PAGE).

Lastnosti viroida

Viroidi so najmanjši do zdaj odkriti patogeni delci pri višjih rastlinah. Njihova molekularna teža je od 85.000 do 130.000 (molek. teža PSTV je 123.325).

Ribonukleotidna veriga je sestavljena iz 243-359 nukleotidov (PSTV ima 359 nukleotidov, ki so razporejeni v krogu. Zaporedje nukleotidov so določili že leta 1971). Slika primarne strukture z elektronsko mikroskopijo kaže, da so viroidi kovalentno zaprte enojne verige RNA, slika sekundarne strukture pa kaže, da so okrogli do podolgovati, ali imajo obliko dvojnega heliksa.

Od virusov se viroidi ločijo po tem, da nimajo proteinskega plašča. Viroidi se prenašajo prek cvetnega prahu, rastlinske jajčne celice in s sokom okuženih rastlin. Širjenje viroida z žuželkami ni običajno. Prenosa se mehansko s priborom.

rom, z orodjem, in s stroji pri obdelavi na njivi. PSTV se širi s rezanjem gomoljev, na polju pa preko listov ob kontaktu in stroji pri obdelavi.

Ugodne razmere za razvoj viroidov so visoke temperature nad 25°C, zato so nevarnejši v vročem podnebjju. Pri visoki temperaturi PSTV ne razvije vedno izrazitih simptomov, poveča pa se koncentracija viroida.

V letu 1990 sem na študijskem izpopolnjevanju v Kanadi spoznala problem viroidov in se seznanila z metodami detekcije viroida PSTV. V letu 1991 in 1992 smo v našem Laboratoriju vzgojili testne rastline in delno testirali naš začetni material. V sodelovanju z Mikrobiološkim inštitutom Medicinske fakultete v Ljubljani smo preizkusili R-PAGE metodo, saj le tam razpolagajo s posebno, za testiranje potrebno opremo.

MATERIAL IN METODE

Simptome na krompirju smo proučevali na cv. red pontiac in russet burbank, okuženih s 4 različki viroida iz Kanade: PSTV-severe (PSTV-s), PSTV-severe-lethal (PSTV-s-l), PSTV -intermediate (PSTV-i), PSTV-mild (PSTV-m).

Kot test rastline smo uporabili paradižnik cv. rutgers in cheyenne.

Za laboratorijsko testiranje smo uporabili metodo R-PAGE, ki obsega 3 postopke.

1. pripravo nukleinskih kislin viroida
2. potek return - poliakrilamid gel elektroforeze
3. barvanje nukleinskih kislin v gelu s srebrom

1. Priprava nukleinskih kislin viroida - Priprava vzorca

1 gram tkiva (list ali gomolj) homogeniziramo z 3 ml ekstrakcijskega pufru (13.6 ml 4 M NH₄OH, 13,6 ml 0,1 M EDTA, 40,8 ml 10 M LiCl, 1 % čistega bentonita in 4 ml TRIS - zasičenim fenolom).

Vzorci in ekstrakcijski pufer morajo biti ves čas na 4-5 °C. Za homogenizacijo se uporablja mikromikser POLYTRON PT 35 ali PT 10-ST. Mikser moramo med vsakim vzorcem 2 x sprati z vodo, da preprečimo kontaminacijo.

Suspencijo centrifugiramo 15 min pri 8000 vrt./min in 4 °C. Zgornjo tekočino odstranimo, nukleinske kisline precipitiramo z etanolom in 4 M Na-acetatom pri - 20 °C 30 min.

Ponovno centrifugiramo 15 min pri 8000 vrt./min. Zgornjo tekočino odstranimo, ostanek speremo z etanolom in osušimo. Ostanek (čiste nukleinske kisline) raztopimo v 100 ml loading pufru (40 % glicerol, TBE 1x: 89 mM TRIS, 89 mM borova kislina, 2,5 mM EDTA, pH=8,3).

Za obarvanje vzorca uporabimo barvilo, ki se veže na nukleotide (0,1 Xylene-cyanal, 0,1 g bromfenolmodrilo).

2. Postopek return polyacrylamide gel elektroforeze.

Vzorci (6 ml) nanese ločeno na 5 % nedenaturirani gel (5 % akrilamid, 0,125 % akrilamid); velikost gela je 14x16x0,15 cm.

1. Elektroforeza poteka pri toku 46 mA pri 20 °C 2,5 ure, da steče vzorec od vrha do konca gela. Gel damo v visoko koncentriran TBE 1x (running pufer).
2. Elektroforeza poteka v nizkokoncentriranem pufru TBE 1x/8x. 2 l pufru segrejemo na 95 °C in prelijemo gel z vzorci, da denaturiramo nukleotidne verige viroida. Posodo napolnimo z ostalim TBE 1x/8x, segrevamo na 70-71 °C, zamenjamo pola enosmernega toka, konstantni tok 46 mA naj teče 1,5 ure.

3. Barvanje nukleinskih kislin v gelu s srebrom.

Gel previdno stresamo 2x5 min v 10 % etanolu in 0,5 % očetni kislini; gel nato prelijemo z 0,2 % AgNO_3 in stresamo 15 min; dobro speremo z destilirano vodo 4x15 sek. Po pranju damo gel v reducent, da se obarva rumeno (375 mM NaOH, 2,3 mM NaBH_3 , in 37- 40 % raztopino formaldehida). Gel nato konzerviramo z 70 mM Na_2CO_3 . Če imamo polaroidni fotoaparati, je najbolje, da gel fotografiramo.

REZULTATI

V Laboratoriju za fiziologijo in virusne bolezni krompirja smo se že leta 1990 začeli zavedati nevarnosti viroidov. Opazovali smo simptome viroida:

1. na krompirjevih rastlinah, prinesenih iz Kanade,
2. na testnih rastlinah paradižnika.

Viroidi povzročajo na rastlini krompirja in paradižnika podobne simptome kot virusi, le da je pri viroidni infekciji zakrnelost zelo izrazita po vsej rastlini.

1. Simptomi viroida PSTV na krompirju: rastline so manjše; internodiji so skrajšani, izraziteje na vrhu; rastline so svetlejšje barve; na listih se pojavijo nekroze, sprva pikčaste, kasneje večje površine; del lista začne odmirati, rastlina se predčasno posuši.

Simptomi PSTV-m na rastlinah krompirja so blažje oblike in so manj izraziti. Simptomi PSTV-s pa so težje oblike, nekroze so močnejše izražene in rastlina začne hitreje odmirati. Posebno izrazito je hitro odmiranje rastline pri PSTV-s-l.

2. Simptomi viroida PSTV na testnih rastlinah paradižnika:

Po 15 dneh se že vidijo simptomi viroida, zgornji listi se rahlo kodrajo.

Po 30 dneh so vidne močnejše nekroze na spodnjih listih in stebelu, kodravost postane zelo izrazita, listi se začnejo ob robovih sušiti.

Po 40 dneh se začnejo rastline v celoti sušiti.

Simptomi PSTV-m in PSTV-s na paradižniku se po intenzivnosti med seboj ločijo. Simptomi PSTV-m so blažje oblike in se pojavijo kasneje. Razlike simptomov med PSTV-s-l in PSTV-s na testnih rastlinah niso izražene, prav tako niso izražene razlike med PSTV-m in PSTV-i.

Pri laboratorijski metodi R-PAGE so razlike med PSTV-m in PSTV-s lepo vidne. Nukleinske kisline PSTV-m hitreje potujejo skozi gel.

TABELA 1. Prikaz ločitve PSTV-severe in PSTV-mild po poteku z return poliakrilamid gel elektroforeze (slika gela A, B)

m - mild

s - severe

Tabela 1 A:

1. vrsta nukleinske kisline zdravega paradižnika
2. vrsta nukleinske kisline zdravega krompirja
3. vrsta PSTV - s paradižnik
4. vrsta PSTV - s krompir
5. vrsta PSTV - m paradižnik
6. vrsta PSTV - m + s paradižnik
7. vrsta PSTV - m + s krompir
8. vrsta PSTV - m paradižnik
- 9., 10. vrsta PSTV - m + s paradižnik + krompir
11. vrsta PSTV - m krompir
- 12., 13. vrsta PSTV - m + s paradižnik + krompir
- 14., 15. vrsta ponovitev 3,4
- 16., 17. vrsta ponovitev 1,2

SLIKA A:

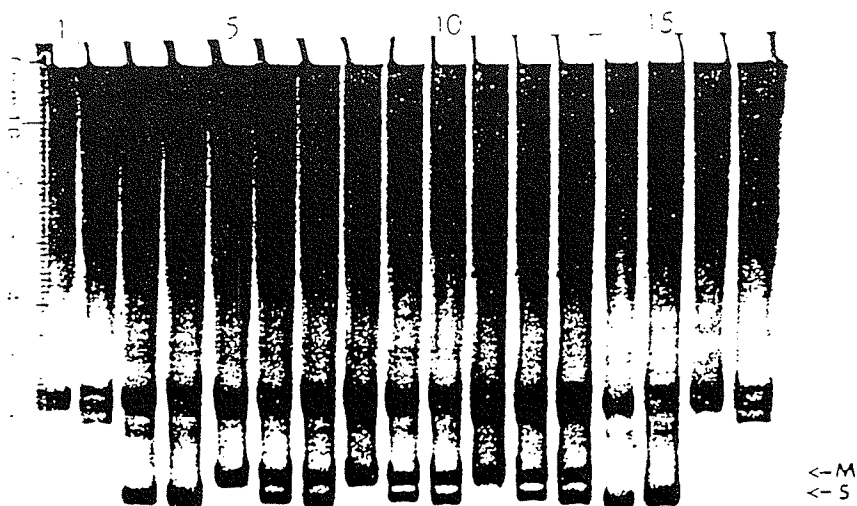
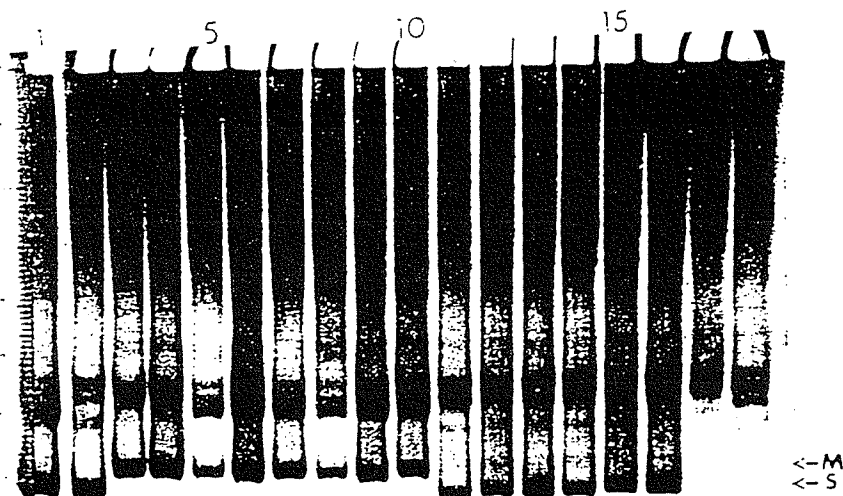


Tabela 1 B:

1.	vrsta	PSTV - s iz listov <i>Scopolia Sinensis</i>
2.	vrsta	PSTV - s krompir
3.	vrsta	PSTV - m paradižnik
4.	vrsta	PSTV - m paradižnik
5., 6., 7.	vrsta	PSTV - m gomolj, kalič, list krompirja
8.-10.	vrsta	ponovitev 5-7
11.-13.	vrsta	PSTV - s gomolj, kalič, list krompirja
14.-16.	vrsta	ponovitev 11-13
17.-18.	vrsta	nukleinske kisline zdravega paradižnika in krompirja

SLIKA B:



Metoda return poliakrilamid gel elektroforeze je draga, zahtevna in dolgotrajna metoda. Pri postopku so potrebni specialni in dragi aparati. Metoda je zanesljiva in loči med seboj različne viroide in z njo določamo tudi različne viroide.

Raziskavo viroidov sofinancira Ministrstvo za znanost in tehnologijo v okviru raziskovalnega projekta z naslovom: "Mikropropagacija rastlin in določanje virusnih bolezni", ki jo koordinira Inštitut za biologijo Univerze v Ljubljani.

LITERATURA

- Sing, R. P., and, A. Baucher, 1987, Electrophoretic separation of a severe from mild strains of Potato Spindle Tuber viroid *Phytopathology*, Vol. 77:11, 1588-1591.
- Sing, R. P., 1983, Viroids and their potential danger to potato in hot climates.- *Canadian Plant Disease Survey* 63, 1, 13-18.
- Sing, R. P., S. A. Slach, 1984, Reaction of Tuber-Bearing *Solanum* Species to infection with PSTV.- *Plant Diseases*, 68, 9, 784-787.
- Sing, R. P., C. F. Crowley, 1985, Evaluation of polyacrylamid gel Electrophoresis, bioassay and dot-blot methods for the survey of PSTV.- *Canadian Plant Survey*, 65, 2, 61-63.
- Sing, R. P., C. F. Crowley, 1985, Successful management of PSTV in seed potato crop.- *Canadian Plant Disease Survey*, 65, 1, 9-10.
- Sing, R. P., 1986, Viroids - their nature and biology.- *Vistas in Plant Pathology* (1986) Eds. Varma A. and Verma S.P. Malhotra Publishing House, New Delhi - 110068, India, 549-566.
- Sing, R. P., 1986, Occurrence, diagnosis and eradication of the PSTV from Canada.- *Viroids of plants and their detection*, International Seminar, August 12-20, 1986, Warshaw Agricultural University, 37-50.
- Sing, R. P., J. Khaury, A. Baucher and T.H. Somerville, 1989, *Canadian Journal of Plant Pathology* 11, 263-267.
- Pepeljnak, M., 1992, Viroidi, *Sodobno kmetijstvo*, 6, 214-216.