

PRVA DETEKCIJA VIRUSNIH DELCEV *Rupestris stem pitting associated virus 1* (RSPaV-1) POVEZANIH Z BOLEZNIJO RAZBRAZDANJA LESA VINSKE TRTE

Nataša PETROVIČ¹, B. MENG², Maja RAVNIKAR³, Irena MAVRIČ^{1,4}, Zora KOROŠEC-KORUZA⁵, Irma TOMAŽIČ⁶, D. GONSALVES²

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

²Dept. of Plant Pathology, Cornell University, Geneva, ZDA

^{5,6}Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Ljubljana

⁴Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana

IZVLEČEK

Rupestris stem pitting associated virus (RSPaV) spada v rod *Foveavirus*. Virus RSPaV-1 je povezan s tisto komponento bolezni razbrazdanja lesa vinske trte (Rugose wood disease complex, RW), ki povzroča razbrazdanje lesa na lesnem indikatorju *Rupestris du Lot* (*Rupestris stem pitting*). Do sedaj še nikomur ni uspelo dejansko tudi videti virusnih delcev RSPaV-1, kar bi predstavljalo prvi neposreden dokaz, da je dejavnik komponente razbrazdanja lesa resnično virusnega izvora. V soku z RSPaV-1 okuženih rastlin vinske trte smo s transmisijsko elektronsko mikroskopijo z metodo lovljenja (ISEM) in dekoracije s protitelesi proti rekombinantnemu virusnemu plaščnemu proteinu opazovali filamentozne virusne delce povprečne dolžine 750 nm. Virusne delce RSPaV smo zasledili v okuženih rastlinah vinske trte gojenih v tkivni kulturi, v rastlinjaku ter v vinogradu, nismo pa jih zasledili v kontrolnih zdravih rastlinah gojenih v istih razmerah. Rezultati ISEM se ujemajo z rezultati zastopanosti virusne dsRNA, metode imunskega pivnika (Western blot) in ELISA testa. Virusnih delcev RSPaV-1 z metodo ISEM nismo uspeli dekorirati s protitelesi proti virusoma Grapevine virus A (GVA) in Grapevine virus B (GVB), ki sta oba prav tako povezana z boleznijo razbrazdanja lesa vinske trte. Plod tega raziskovalnega dela predstavlja prvi neposreden dokaz o obstoju virusnih delcev RSPaV-1 in obeta pomembno orodje pri razumevanju etiologije te bolezni.

ABSTRACT

FIRST DETECTION OF *Rupestris stem pitting associated virus* PARTICLES (RSPaV-1) ASSOCIATED WITH THE RUGOSE WOOD DISEASE OF GRAPEVINE

Rupestris stem pitting associated virus (RSPaV), a member of the *Foveavirus* genus, is associated with the *Rupestris stem pitting* component of the rugose wood (RW) disease complex of grapevines. Heretofore, particles of RSPaV have not been visualized. In this work, flexuous rod particles about 750 nm in length were detected in sap of infected grapevines, by immunosorbent electron microscopy (ISEM). Since particles were unstable in plant sap, selection of young shoot tissue and use of short incubation times were essential for observing intact particles. RSPaV particles were detected in tissue culture, greenhouse and field grown infected plants but not in healthy control plants. ISEM detection of particles corresponded to the presence of dsRNA, and detection of RSPaV by Western blot and ELISA. In contrast, the particles were not decorated by antibodies to GVA and GVB, two other viruses associated with RW. This first definitive detection of RSPaV particles will help towards understanding the etiology of the RW disease complex.

¹ dr., Večna pot 111, SI-1111 Ljubljana

² dr., NY 14456, ZDA

³ prof. dr., Večna pot 111, SI-1111 Ljubljana

⁴ dr., Hacquetova 17, SI-1000 Ljubljana

⁵ doc. dr., Jamnikarjeva 101, SI-1111 Ljubljana

⁶ dr., prav tam

1 UVOD

Razbrazdanje na rupestrisu (Rupestris stem pitting, RSP) je zelo razširjena virusna komponenta boleznih razbrazdanja lesa vinske trte (Rugose wood, RW) (3, 6). Poleg RSP, nastopajo kot komponente RW še LN 33 stem grooving (LNSG), Kober 5BB stem grooving, in grapevine corky bark (6). RSP se razlikuje od drugih komponent po tem, da ne povzroča bolezenskih znamenj na lesnih indikatorjih Cabernet Franc, LN 33 in Kober 5BB, povzroča pa jih na indikatorju Rupestris du Lot (*Vitis rupestris* St George), dve do tri leta po inokulaciji s cepljenjem. Etiologija boleznih razbrazdanja lesa na vinski trti se zdaleč ni pojasnjena, čeprav obstajajo poročila o vpletenosti virusa vinske trte A (Grapevine virus A, GVA) in virusa vinske trte B (Grapevine virus B, GVB).

V postopku karakterizacije domnevnega virusnega povzročitelja RSP smo najprej klonirali in določili zaporedje v genomu iz ds RNA, izolirane iz RSP obolelega indikatorja Rupestris du Lot (1) ter pokazali, da je le-ta virusnega izvora in da ima urejenost genoma podobno virusu razbrazdanja lesa jablan (*Apple stem pitting virus* (ASPV)(12). To je hkrati predstavljalo prvo jasno povezavo med virusom (virusnim genomom) in boleznijo RSP, zato smo ga poimenovali virus povezan z boleznijo razbrazdanja na rupestrisu 1 (Rupestris stem pitting associated virus-1, RSPaV-1) (12). Virusni izvor boleznih in zaporedje v genomu sta bila hkrati potrjena tudi od drugih avtorjev (20), ki pa so virus poimenovali Grapevine rupestris stem pitting associated virus (GRSPaV). V tem poročilu bomo virus imenovali Rupestris stem pitting associated virus (RSPaV). Virus RSPaV uvrščamo v rod *Foveavirus* (7, 8). Primerjalna testiranja z metodo RT-PCR z uporabo RSPaV specifičnih oligonukleotidnih začetnikov so pokazala tesno povezanost med RSPaV in boleznijo RSP (11, 20). V RSP obolelih trtah smo hkrati našli tudi celo družino različnih zaporedij genomov RSPaV (angl. sequence variants) (13).

Poznavanje zaporedja v genomu RSPaV nam je rabilo za pridobivanje poliklonskega antiseruma proti rekombinantnemu plaščnemu proteinu (CP) RSPaV, izraženem v bakterijah *Echerichia coli* (9, 10). Antiserum smo priredili za uporabo v seroloških testih, indirektni ELISA in imunskem pivniku (Western blot, WB). Rezultate seroloških testiranj smo nato primerjali z rezultati indeksiranj obolelih trt na Rupestris du Lot in z rezultati testiranj z uporabo metode RT-PCR ter pokazali, da laboratorijske metode, RT-PCR in ELISA, lahko nadomestijo dolgotrajno indeksiranje pri določanju povzročitelja boleznih RSP v obolelih trtah (9, 10, 16, 17). V zadnjem času so tudi drugi avtorji (14) poročali o pridobivanju antiseruma proti rekombinantnemu CP RSPaV, ki so ga lahko uporabili za določanje RSPaV z metodo WB, ne pa tudi z metodo ELISA.

Kljub poznavanju genoma RSPaV, virusnih delcev v okuženi vinski trti še niso uspeli identificirati. Že pred časom so poročali o opazovanju dolgih, nitastih virusnih delcev z elektronskim mikroskopom v RSP okuženi vinski trti (19). Monette and Godkin (15) sta opazila nitaste virusne delce v tkivni kulturi vršičkov vinske trte, okužene z RSP in LNSG. V obeh primerih pa avtorji niso mogli najti neposredne povezave med opazovanimi virusnimi delci in RSPaV, ker niso imeli na voljo ne sekvence njegovega genoma, ne RSPaV - specifičnih molekularnih tehnik (RT-PCR) in niso imeli na voljo RSPaV - specifičnega antiseruma za dekoracijo RSPaV virusnih delcev.

Razpolaganje z dobro okarakteriziranim materialom z RSPaV okužene vinske trte in z antiserumom, specifičnim za detekcijo RSPaV (10), nam je dalo nove možnosti za analizo RSPaV delcev z uporabo tehnike imunske elektronske mikroskopije (ISEM) in

dekoracije. Rezultat te analize je prvo opazovanje virusnih delcev RSPaV, v obliki upogljivih paličic z značilno dolžino 723 nm, ki specifično reagirajo z antiserumom, proizvedenim proti rekombinantnemu plaščnemu proteinu RSPaV in so vedno prisotni v trsah, okuženih z RSP.

2 MATERIAL IN METODE

Rastlinski material. Oznaka, izvor in status okuženosti trsov, ki smo jih uporabili v študiji, so prikazani v Tabeli 1. Kot negativno kontrolo smo uporabili trs Rupestris du Lot, St George 239, ki je bil vzgojen iz kulture embrijev in je bil po rezultatih analiz imunskega pivnika (Western blot, WB), indirektnega ELISA postopka in RT-PCR prost virusa RSPaV (16).

Protitelesa. Uporabili smo poliklonska protitelesa As7-276, proizvedena proti rekombinantnemu plaščnemu proteinu (CP) RSPaV (10). Antiserum reagira z RSPaV v okuženih trsah z uporabo tehnik WB in indirektni ELISA (9, 10, 16, 17). Protitelesa proti trtinemu virusu B (Grapevine virus B, GVB) smo dobili v dar od doktorjev: Adib Rowhani, Kalifornija, ZDA, Dariusz Goszczynski, Južna Afrika in Angelantonio Minafra, Bari, Italija. Protitelesa vseh treh izvorov so učinkovito zasledila GVB z uporabo ISEM (neobjavljena poročila in osebna komunikacija z A. Rowhani, D. Goszczynski in A. Minafra). Protitelo proti trtinemu virusu A (Grapevine virus A, GVA) je na voljo v prosti prodaji za uporabo v ELISA testu, proizvajalca Bioreba AG, Švica.

RT-PCR. Dvojnovažno RNK (dsRNA) smo izolirali iz zgornjih delov stebel mladice vinske trte, iz celih ali iz delov rastlinic vinske trte v tkivni kulturi ali pa iz floemskega dela dormantnih rozg vinske trte. Uporabili smo Qiagen RNeasy kit za ekstrakcijo rastlinske RNK in postopek, predpisan od proizvajalca. RT-PCR postopek smo izvajali kot v poročilu Meng in sod. (11). Para začetnikov 9 in 10 ter 13 in 14 smo povzeli po poročilu Meng s sod. (10, 11), medtem, ko je par začetnikov RSP48 and 49 povzet po Dr. Rowhani-ju. Začetnika 9 and 10 pomnožujeta del zaporedja v genomu RSPaV-1 med nukleotidoma (nt) 6244-6741 v bralnih okvirjih (ORF) 1 in ORF 2 (začetnik 9: 5'-GGCCAAGGTTTCAGTTTG -3'; začetnik 10: 5'-ACACCTGCTGTGAAAGC-3'). Par začetnikov 13 in 14 pomnožuje del zaporedja v genomu RSPaV med nukleotidoma 4373-4711 v bralnem okvirju ORF 1 (začetnik 13: 5'-GATGAGGTCCAGTTGTTTCC -3'; začetnik 14: 5'-ATCCAAAGGACCTTTTGACC-3'). Par začetnikov RSP48 in 49 je usmerjen v del zaporedja v genomu RSPaV, ki kodira za plaščni protein, med nukleotidoma 8178-8507 (RSP48: 5'-AGGCTGGGATTATAAGGGAGGT-3'; RSP49: 5'-CCAGCCGTTCCACCACTAAT-3').

Imunski pivnik in indirektni ELISA postopek. Serološke analize so potekale po postopkih, opisanih v Meng s sod. (10). Uporabili smo poliklonski antiserum proti RSPaV, As 7-276, kot je opisano zgoraj.

Elektronska mikroskopija in meritve virusnih delcev. Listi, stebela in korenine svežih rastlin vinske trte in sitasti del prevodnega sistema iz dormantnih rozg vinske trte smo zmleli v majhnem volumnu ekstrakcijskega pufra (0.1M fosfatni pufer pH 7.2, z 2% polivinil pirolidona, PVP-40. Pri pripravi vzorcev za pregled pod EM s tehniko negativnega kontrastiranja, brez uporabe antiseruma As7-276, smo mrežice (krite z ogljikom, Formvar) prekrili z 10 µl rastlinskega ekstrakta in jih inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo mrežice sprali pod drsečimi kapljicami dvojno destilirane vode in jih nato obarvali z nekaj drsečimi kapljicami 1% uranilnega acetata (UA). Pri pripravi vzorcev za ISEM analizo smo na mrežice dodali 10 µl neprečiščenega antiseruma As7-276, razredčenega v razmerju 1/1000, jih nato inkubirali pri sobni temperaturi 5 minut ter jih sprali pod drsečimi kapljicami fosfatnega pufra (pH 7.2). Nato smo mrežice inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi, z 10 µl rastlinskega ekstrakta, za lovljenje virusnih delcev. Sledilo je spiranje pod drsečimi kapljicami dvojno destilirane vode in barvanje z 1% UA, kot je opisano zgoraj. Za dekoracijo smo mrežice z ulovljenimi virusnimi delci inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi z antiserumom As7-276, razredčenim 1/50 ter jih nato sprali in obarvali po zgoraj opisanih postopkih. Na vse načine pripravljene mrežice smo

opazovali z transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM) znamke Philips CM-100. Za meritve virusnih delcev RSPaV smo uporabili vzorec iz ekstraktov stebel vinske trte Modri pinot, številka 115, gojenem v tkivni kulturi in pripravljenem po postopku lovljenja delcev z antiserumom AS 7-276 (ISEM) in brez dekoracije. Izmerili smo dolžino 104 virusnih delcev.

3 REZULTATI

Virusne delce RSPaV smo določili z ISEM in z uporabo antiseruma, specifičnega za RSPaV. Trsi, ki smo jih uporabili za opazovanje virusnih delcev RSPaV so bili iz rastlinskih vrst *Vitis vinifera* in *Vitis rupestris* iz Slovenije, Italije, Francije in ZDA. Ves analiziran material je bil poleg EM testiran na zastopanost RSPaV z metodami WB, ELISA, ind/ali RT-PCR (preglednica 1). Bolezenska znamenja RW so bila vidna na izvornih trsih Refošk 38 VIII/44 in Refošk 20 V/4, niso pa bila vidna na trsu Refošk 18 II/6 in ne na trsih *Rupestris* du Lot (St George). Izvorni trsi klonov Taminga 3c in Pinot Noir 3d, cepljeni na indikator *Rupestris* du Lot (St. George), so dali tipična bolezenska znamenja razbrazdanja lesa (RSP) na cepljenem *Rupestrisu*.

Preglednica 1: Status okuženosti vinske trte, uporabljene za detekcijo virusnih delcev *Rupestris stem pitting associated virus* (RSPaV) particles.

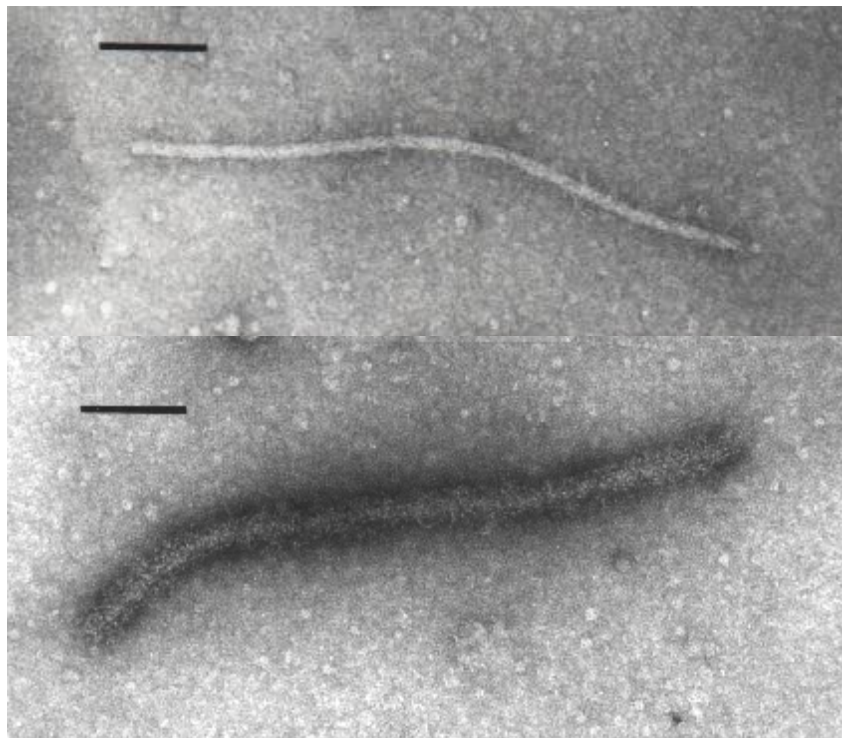
Vzorci vinske trte ^a	Država izvora	Okuženost z virusi
Refošk 38 VIII/44 (<i>Vitis vinifera</i>)	Slovenija	RSPaV
Refošk 20 V/4 (<i>V. vinifera</i>)	Slovenija	RSPaV, GFkV
Refošk 18 II/6 (<i>V. vinifera</i>)	Slovenija	RSPaV
Taminga 3c (<i>V. vinifera</i>)	Avstralija	RSPaV, GLRaV-3, GVB
Pinot Noir 3d (<i>V. vinifera</i>)	Italija	GVB, RSPaV
Pinot Noir 115 (<i>V. vinifera</i>)	Francija	RSPaV
St George Cl-2-3 (<i>V. rupestris</i>)	ZDA	RSPaV
St George Cl-2-12 (<i>V. rupestris</i>) ^b	ZDA	RSPaV ni prisoten
St George 239 (<i>V. rupestris</i>) ^b	ZDA	RSPaV ni prisoten

^a Trsi so bili preliminarno testirani na zastopanost virusov: *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Grapevine leafroll associated viruses* (GLRaV-1, 2, in 3), GVA, GVB ter *Grapevine fleck virus* (GFkV), z eno ali več metodami ELISA, WB, RT-PCR in biotičnega indeksiranja z uporabo indikatorja *Vitis rupestris* St. George.

^b St George Cl-2-12 in St George 239 smo uporabili kot negativni kontroli, ker v nobenem izmed njiju po analizi z vsemi razpoložljivimi laboratorijskimi metodami nismo zasledili RSPaV virusa.

Začetni poskusi opazovanja virusnih delcev RSPaV so bili opravljeni izključno na materialu trte Modri Pinot st.115, gojenem v tkivni kulturi, ki je po predhodnih analizah z WB, ELISA in RT-PCR pokazal izredno visoko vsebnost RSPaV (preglednica 2). Kljub očitni visoki vsebnosti RSPaV, v tem materialu nismo uspeli opaziti virusnih delcev brez tehnike lovljenja. Delce RSPaV smo lahko opazovali le, kadar smo mrežice predhodno prekrili z antiserumom AS 7-276 in jih šele nato inkubirali z okuženim rastlinskim ekstraktom, za lovljenje delcev (ISEM). Koncentracija RSPaV delcev je bila zelo nizka, saj smo lahko s tehniko ISEM opazili le okrog 10 delcev na kvadrat mrežice

pod 34,000-kratno povečavo. Z zelo lepo uspelo dekoracijo delcev z antiserumom AS 7-276, ki deluje specifično proti CP RSPaV, smo pokazali, da so dekorirani delci resnično specifični za RSPaV virus (slika 1).



Slika 1: Detekcija delcev virusa *Rupestris stem pitting associated virus* (RSPaV) z metodo ISEM (immunosorbent electron microscopy). Nedeكورirani delci (zgoraj) in dekorirani delci (spodaj) so bili ulovljeni z As7-276, ki je poliklonsko protitelo, proizvedeno proti rekombinantnemu plaščnemu proteinu virusa RSPaV (10). Črtica predstavlja 100 nm.

Nasprotno pa virusnih delcev z nobeno od uporabljenih EM tehnik nismo opazili v kontrolnem vzorcu St George 239, ki je bil negativen tudi po analizah z WB, ELISA, in RT-PCR (Tabela 2).

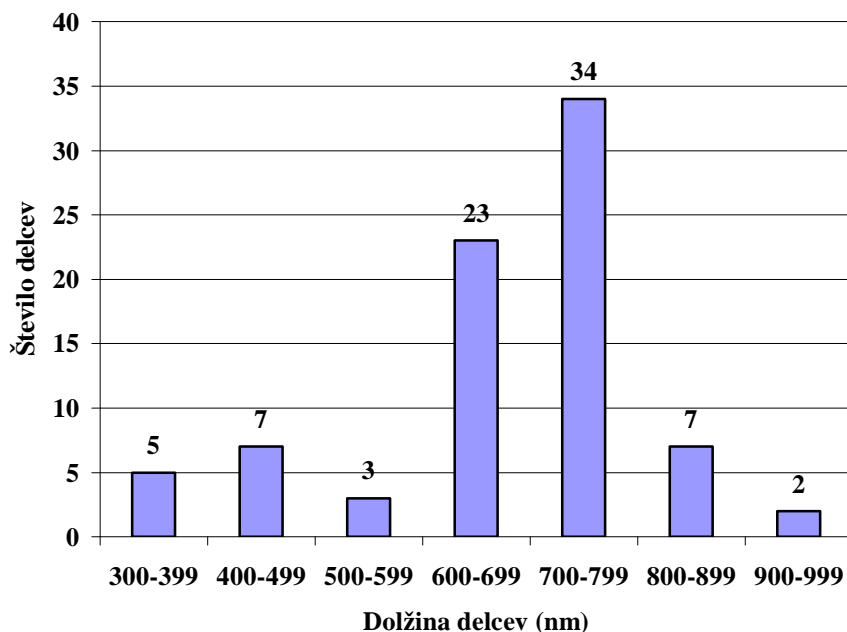
Virusni delci RSPaV imajo normalno dolžino 723 nm, ki je v obsegu, značilnem za skupino Foveavirus (7). Analiza z normalna razporeditvijo dolžin delcev je pokazala, da je večina (57 od izmerjenih 104-ih) dolga 600-799 nm (slika 2). Normalna dolžina delcev je bila izračunana iz povprečja 57 delcev. Nekateri izmerjeni delci (13) so bili daljši od 1000 nm, kar pripisujemo zlepljanju delcev po dolžini. Delci vseh dolžin so v ISEM reagirali z antiserumom, specifičnim za RSPaV.

Preglednica 2: Detekcija virusa *Rupestris stem pitting associated virus* (RSPaV) z metodo ISEM^a je v korelaciji z detekcijo RSPaV z metodami ELISA^a, WB^a in RT-PCR^a.

Vzorca PCR	ISEM		WB		ELISA		RT-PCR		
	TK ^b	RAS ^c	TK	RAS	TK	RAS	TK		
Pinot Noir 115 (<i>Vitis vinifera</i>)	+	+	+	+	1.33	+	0.99	+	+
Refošk 38 VIII/44 (<i>V. vinifera</i>)	+	+	+	+	0.83	+	0.81	+	+
Refošk 20 V/4 (<i>V. vinifera</i>)	NT	+	NT	+	0.78	+	0.79	+	+
Taminga 3c (<i>V. vinifera</i>)	NT	+	+	+	1.01	+	0.95	+	+
Pinot Noir 3d (<i>V. vinifera</i>)	NT	+	+	+	1.02	+	0.89	+	+
St George C1-2-3 (<i>V. rupestris</i>)	NT	+	+	+	0.85	+	0.69	+	+
Refošk 18 II/6 (<i>V. vinifera</i>)	NT	+	+	+	0.84	+	0.57	-	+
St George 239 (<i>V. rupestris</i>)	-	-	-	-	0.26	-	0.34	-	-
St George C1-2-12 (<i>V. rupestris</i>)	-	-	-	-	0.35	-	0.31	-	-

^a ISEM=immunosorbent electron microscopy; ELISA=enzyme linked immunosorbent assay; WB=Western blot; RT-PCR=reverse transcription polymerase chain reaction. Prag pozitivnosti v ELISA reakcijah je bil postavljen kot dvakratna vrednost absorbance negativnih kontrol St. George 239 and C1-2-12, izmerjenih pri valovni dolžini 405 nm. V vseh seroloških analizah smo uporabili protitelesa proti rekombinantnemu plaščnemu proteinu RSPaV virusa (As 7-276).

^b Izvirne rastline za analizo so gojene v tkivni kulturi. ^c Izvirne rastline za analizo so gojene v rastlinjaku.



Slika 2: Razporeditev dolžin virusnih delcev RSPaV (*Rupestris stem pitting associated virus*).

Virusni delci RSPaV ne reagirajo navzkrižno z antiserumi, specifičnimi za virusa GVA in GVB. Izvirni trs Refošk 38 VIII/44 je kazal tipična bolezenska znamenja RW

in je bil pozitiven na zastopanost RSPaV. Isti trs Refoška je bil po rezultatih večletnega zaporednega testiranja z DAS-ELISA metodo ter uporabo protiteles proizvajalcev Bioreba, Švica in Agritest, Italija, negativen na zastopanost GVB, GVA in drugih virusov vinske trte: *Grapevine fleck virus* (GFkV), *Grapevine leafroll associated viruses 1, 2, 3, and 6* (GLRaV 1, 2, 3, and 6), *Arabis mosaic virus* (ArMV), and *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) ter negativen pri RT-PCR analizi na zastopanost virusov GVA in GVB (rezultati niso prikazani).

Za oceno morebitne navzkrižne reaktivnosti delcev RSPaV z antiserumi, proizvedenimi proti virusoma GVA in GVB, smo delce iz ekstraktov *V. vinifera* Refošk 38 VIII/44, gojenega v tkivni kulturi, ulovili s tehniko ISEM in z uporabo antiseruma As7-276 ter jih opazovali na dva načina: 1) brez dekoracije in 2) z dekoracijo, pri čemer smo za dekoriranje uporabili vsakič drugačna protitelesa, specifična za GVB, GVA in RSPaV (As7-276). Upogljive paličice povprečne dolžine 723 nm smo opazili v vseh vzorcih, ki so bili pripravljene s tehniko lovljenja z uporabo RSPaV specifičnih protiteles As7-276; nasprotno pa so bili virusni delci dekorirani le v primeru, ko smo za dekoracijo uporabili protitelesa As7-276 (slika 1) in ne v primerih, ko smo za dekoracijo uporabili protitelesa specifična za GVA ali GVB (preglednica 3). Prikazani rezultati jasno nakazujejo, da so virusni delci, ki smo jih opazovali v opisanem rastlinskem materialu, resnično specifični za RSPaV in da ne reagirajo navzkrižno s protitelesi proti virusoma GVA ali GVB.

Tabela 3: Analize ISEM (Immunosorbent electron microscopy) o serološki povezavi med virusnimi delci RSPaV in protitelesi, specifičnimi proti virusoma *Grapevine virus A* (GVA) in *Grapevine virus B* (GVB).

<u>Protitelesa, uporabljena za:</u>		<u>Detekcija delcev RSPaV z dekoracijo:</u>	
<u>Lovljenje</u>	<u>Dekoracijo</u>	<u>Nedekorirani</u>	<u>Dekorirani</u>
1) Pregledan material: Refošk 38 VII/44 (okuzen z RSPaV)			
As7-276 ^a	As7-276	+	+
As7-276	GVB (Goszczynski)	+	-
As7-276	GVB (Minafra)	+	-
As7-276	GVB (Rowhani)	+	-
As7-276	GVA (Bioreba)	+	-
2) Pregledan material: St. George (Negativna kontrola, RSPaV ni prisoten)			
Protitelesa in postopki so enaki kot zgoraj		-	-

^a As7-276 je poliklonsko protitelo, proizvedeno proti rekombinantnemu plaščnemu proteinu virusa RSPaV (10).

Opazovanje delcev RSPaV z EM je v korelaciji z rezultati detekcije RSPaV z metodami RT-PCR, WB, in indirektno ELISA. Obstajajo poročila o uspešni detekciji RSPaV z metodami RT-PCR and WB (10, 11, 14, 18). V vzporednem poročilu (10), smo tudi pokazali, da je možno protitelesa As 7-276, specifična za RSPaV uporabiti za analizo RSPaV tudi v indirektnem ELISA postopku. V pričujočem poročilu smo primerjali detekcijo RSPaV z tehniko ISEM tudi z drugimi detekcijskimi metodami. Za primerjavo smo uporabili iste rastlinske ekstrakte številnih izvorov rastlin vinske trte, gojenih bodisi v tkivni kulturi ali v rastlinjaku ter jih analizirali hkrati z vsemi

razpoložljivimi metodami. Rezultati so pokazali popolno korelacijo med dekoracijo delcev v ISEM in RT-PCR, WB, and ELISA (preglednica 2). RSPaV smo zasledili z vsemi štirimi metodami v ekstraktih stebel, listov in korenin rastlin v tkivni kulturi in skozi vse leto. Podobne rezultate smo dobili tudi pri analizi stebel mladice vinske trte, gojene v rastlinjaku, razen v enem vzorcu, testiranem z ELISA. Refošk 18 II/6 je pri odčitavanju rezultatov ELISA pri valovni dolžini 405 nm pokazal absorbanco 0.57, ki je primerljiva z negativno kontrolo z absorbanco 0.34 (preglednica 2).

Omejene preliminarne analize so pokazale, da lahko delce RSPaV zasledimo z ISEM tudi v izvornem trsu Refošk 38 VII/44, ki raste v vinogradu na prostem. Delce RSPaV smo opazili spomladi in v zgodnjem poletju, v steblih mladice in v mladih listih, ne pa tudi v starejših listih istega poganjka. Delce RSPaV nam je uspelo opaziti z ISEM tudi v sitastem prevodnem sistemu dormantnega trsa *Vitis vinifera* Pinot Noir 3d, okuženega z RSPaV. Delcev pa nasprotno nismo opazili v sitastem delu olesenelega prevodnega sistema dormantnih trsov *Vitis rupestris* St George Cl-2-3, okuženih z RSPaV, čeprav smo RSPaV virusne delce kasneje, ko je trs odgnal, lahko opazovali v stebelu mladice iste izvorne rastline. Oba vzorca, kjer smo opravili analizo sitastega dela prevodnega sistema olesenelih rozg dormantnih trsov, sta bila pripravljena iz materiala, odvzetega v mesecu marcu, čisto na koncu dormantnega obdobja.

Ne glede na izvorni rastlinski material, je bilo število delcev, ki smo jih opazili z ISEM, zelo nizko. Najboljši vzorci so bili tisti, ki so bili pripravljene iz mladih okuženih tkiv: stebel mladice trsov, gojenih v rastlinjaku prek vsega leta ali pa trsov na prostem, toda le v obdobju od pomladi do zgodnjega poletja in iz vseh delov rastlinic v tkivni kulturi. Pri 34000 kratni povečavi, smo povprečju opazili med 2 in 10 virusnih delcev RSPaV na kvadrat mrežice EM.

4 RAZPRAVA

Prvič smo prikazali, da so virusni delci RSPaV upogljive paličice dolžine 723 nm. Ta sklep temelji na dejstvih, da so bili virusni delci dekorirani s protitelesi, ki so bila pripravljena specifično proti rekombinantnemu CP virusa RSPaV in da so trsi, v katerih smo opazovali dekorirane delce RSPaV, bili RSPaV pozitivni tudi z drugimi metodami (WB in ELISA), pri katerih smo uporabili RSPaV specifično protitelo (10, 16, 17) ter z RT-PCR z uporabo začetnikov, specifičnih za RSPaV. Nitaste delce podobne dolžine in oblike so opazovali z EM že poprej v sitastem delu prevodnega sistema stebela vinske trte, ki je dala RSP pozitiven rezultat v procesu indeksiranja na *V. rupestris* St George (15, 19). Vendar pa opazovani delci v opisanem poskusu niso mogli biti prepoznani kot RSPaV virus, ker v času, ko je bil poskus izveden, ni bilo na voljo RSPaV specifičnih protiteles.

RSPaV virusne delce je na osnovi naših dognanj mogoče opazovati le v primeru, ko delce poprej ulovimo na mrežice EM, ki so prekrivane s specifičnimi protitelesi As 7-276. To dognanje ponovno kaže, da so virusi RSPaV v okuženi vinski trti zastopani v izredno nizkih koncentracijah. Druga razlaga bi lahko bila, da so virusni delci RSPaV zelo nestabilni in hitro razpadejo, razen, če jih nemudoma ne imobiliziramo s protitelesi na mrežicah EM. Avtorji se bolj nagibamo k prvi razlagi, saj smo na mrežicah EM vedno opazili le izredno nizko število delcev, ne glede na izvorni material. Tudi drugi avtorji, ki so poskušali opazovati viruse v RSP okuženem materialu, so navajali, da so opazovane viruse zasledili le v izredno nizki koncentraciji (15, 19), kar je hkrati lahko

tudi razlog za to, da so viruse uspeli opazovati le v zelo majhnem deležu analiziranih RSP okuženih trsov.

Kljub izredno nizki koncentraciji RSPaV delcev v gostiteljskih rastlinah, je uporaba protiteles As 7-276 omogočala zanesljivo detekcijo virusnih delcev v trtah, ki so rasle v različnih razmerah, okoljih in v različnih delih teh trt. Poudariti pa velja, da je po naših izkušnjah nujno nadzorovati nekatere dejavnike, ki so pomembni za ponovljivost rezultatov. V našem primeru smo delce RSPaV opazili le, kadar smo jih ulovili z metodo ISEM. Drugi pomembni dejavniki v našem primeru predstavljajo problem stabilnosti delcev v ekstraktih okuženih rastlin, zaradi česar je potrebno uporabiti krajše čase inkubacije v koraku lovljenja delcev (1 ura pri sobni temperaturi), primeren pufer (fosfatni pufer s PVP) in uporabiti svež material iz mladih rastlinskih tkiv. Vzporedno smo pokazali (10), da je tudi testiranje ELISA, z uporabo istih As 7-276 protiteles uspešnejše, kadar uporabimo mlada tkiva in bolj zgodaj v rastnem obdobju. Enako se je pokazalo tudi za vzorce, ki smo jih uporabili za opazovanje RSPaV delcev z ISEM.

Minafra s sod. (14) poroča o protitelesih, ki so jih proizvedli proti rekombinantnemu CP izolata RSPaV (20). Protitelo so uspešno uporabili za detekcijo RSPaV virusa v metodi WB, ne pa tudi v metodi ELISA, kar je v nasprotju z našim protitelesom, ki RSPaV viruse zasledi v metodah ISEM, WB in indirektni ELISA (10). Zanimivo bi bilo primerjati učinkovitost obeh protiteles z metodo ISEM.

Rekombinantni CP so izrednega pomena kot viri antigena za proizvodnjo protiteles za viruse, ki jih je težko ali nemogoče pripraviti v čisti obliki iz okuženega rastlinskega materiala, bodisi zaradi nizke koncentracije ali zaradi nepoznavanja alternativnih zelnatih gostiteljskih rastlin. Oboje velja za mnoge viruse lesnatih rastlin in za nekatere viruse vinske trte. Zanimiv je podatek, da protitelesa As7-276 niso bila učinkovita za detekcijo RSPaV s kombinirano metodo imunske vezave (immunocapture, IC) in RT-PCR (IC-RT-PCR) (Petrovič, neobjavljeno), medtem, ko so se protitelesa proti rekombinantnemu CP različnih drugih virusov pokazala kot učinkovita v tej metodi (4, 5). Rezultati analiz z ISEM, o katerih poročamo, nakazujejo, da je nezmožnost uporabe As 7-276 za analizo RSPaV v metodi IC-RT-PCR mogoče pripisati nizki koncentraciji RSPaV delcev in hkrati njihovi nestabilnosti v rastlinskih ekstraktih, ne pa slabi kvaliteti protiteles. Naša dognanja in dognanja v drugih poročilih (12, 20) odpirajo nove možnosti za odkrivanje ostalih molekularnih in fizičnih značilnosti RSPaV. Dognanja kažejo, da je RSPaV lahko dejanski povzročitelj bolezn, definirane kot RSP (10, 11, 12, 20). Obstaja poročilo, da RSPaV sam po sebi ne povzroča bolezenskih znamenj RW na številnih pregledanih okuženih trsah *Vitis vinifera* (2). Bonfigioli s sod. (2) predlaga nujnost kombinacije zastopanosti virusov GVA in RSPaV za izraz bolezenskih znamenj RW. Tudi naši najnovejši rezultati na podlagi laboratorijskih analiz RSPaV v večjem številu trsov sorte Refoš, cepljenih na podlago SO4, z RT-PCR, ELISA, WB in ISEM, ne kažejo neposredne povezave med izrazom bolezenskih znamenj RW in zastopanostjo virusa RSPaV. Hkrati pa ti rezultati ne podpirajo domneve avtorjev Bonfigioli s sod. (2), o nujni vpletenosti virusov GVA in RSPaV v izraz bolezn RW (neobjavljeni preliminarni rezultati). Zmožnost opazovanja delcev RSPaV s specifičnimi protitelesi nam vsekakor daje dragoceno orodje za bolj učinkovito raziskovanje odnosa med RSPaV in boleznijo razbrzdanja lesa vinske trte. Za nadaljnje raziskave o vlogi virusnih povzročiteljev te bolezn je nujno vključiti tudi inokulacijo vinske trte s čistimi kulturami posameznih virusov in kombinacij med njimi.

5 LITERATURA

- Azzam, O. I., Gonsalves, D. and Golino, D. A. 1991. Detection of dsRNA in grapevines showing symptoms of rupestris stem pitting disease and the variabilities encountered. *Plant Dis.* 75: 960-964.
- Bonfigioli, R. G., Habili, N., Green, M., Schliefert, L. F. and Symons, R. H. 1998. The hidden problem – Rugose wood associated viruses in Australian viticulture. *The Australian Grapegrower and Winemaker* 9-13.
- Goheen, A. C. 1988. *Rupestris stem pitting*, Page 53 in Compendium of grape diseases. R. C. Pearson and A. C. Goheen, Editor. American Phytopathological Society Press: St. Paul.
- Jelkmann, W. and Keim-Konrad, R. 1997. Immuno-capture polymerase chain reaction and plate-trapped ELISA for the detection of apple stem pitting virus. *J. Phytopathology* 145: 499-503.
- Ling, K. S., Zhu, H. Y., Petrovič, N. and Gonsalves, D. 2001. Comparative effectiveness of ELISA and RT-PCR for detecting grapevine leafroll associated closterovirus-3 in field collected samples. *American Journal of Enology and Viticulture* 52: 21-27.
- Martelli, G. P. 1993. Rugose wood complex. Pages 45-54 in Graft-transmissible diseases of grapevines, handbook for detection and diagnosis. G.P. Martelli, Editor. Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome.
- Martelli, G. P. and Jelkmann, W. 1998. Foveavirus, a new plant virus genus. *Archives of Virology* 143: 1245–1249.
- Martelli, G. P. and Jelkmann, W. 2000. *Genus Foveavirus* Pages 985-989 in *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Virology Division, International Union of Microbiological Societies, M.H.V. Van Regenmortel, et al., Editor, Academic Press, New York.
- Meng, B., Credi, R., Petrovič, N. and Gonsalves, D. 2000. Serological detection of RSPaV in grapes as compared to RT-PCR and indicator indexing. Pages 131-132 in *Proceedings of the 13th meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like diseases of the Grapevine*. Adelaide, South Australia:
- Meng, B. Z., Credi, R., Petrovič, N., Tomazič, I. and Gonsalves, D. 2003. Detection of *Rupestris stem pitting associated virus* in grapes and the indicators by antiserum to recombinant virus coat protein. *Plant Disease*, April 2003.
- Meng, B. Z., Johnson, R., Peressini, S., Forsline, P. L. and Gonsalves, D. 1999. *Rupestris stem pitting associated virus-1* is consistently detected in grapevines infected with *rupestris stem pitting*. *European Journal of Plant Pathology* 105: 191-199.
- Meng, B. Z., Pang, S. Z., Forsline, P. L., McFerson, J. R. and Gonsalves, D. 1998. Nucleotide sequence and genome structure of grapevine *Rupestris stem pitting associated virus-1* reveal similarities to apple stem pitting virus. *J. Gen Virol* 79: 2059-2069.
- Meng, B. Z., Zhu, H. Y. and Gonsalves, D. 1999. *Rupestris stem pitting associated virus-1* consists of a family of sequence variants. *Archives of Virology* 144: 2071-2085.
- Minafra, A., Casati, P., Elicio, V., Rowhani, A., Saldarelli, P., Savino, V. and Martelli, G. P. 2000. Serological detection of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV) by a polyclonal antiserum to recombinant virus coat protein. *Vitis* 39: 115-118.
- Monette, P. L. and Godkin, S. E. 1995. Detection of capillovirus-like particles in a grapevine affected with rugose wood. *Vitis* 34: 241–242.
- Petrovič, N., Penev, B., Krastanova, T., Meng, B. Z. and Gonsalves, D. 2000. Distribution of *Rupestris stem pitting associated virus* in greenhouse and field grown *Vitis rupestris* "cv. Saint George". Pages 35-36 in *Proceedings of the 13th meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like diseases of the Grapevine*. Adelaide, South Australia:
- Petrovič, N., Soster, P., Korosec-Koruza, Z., Ravnikar, M. and Gonsalves, D. 2000. First results on the use of laboratory methods for detection of *Rupestris stem pitting associated virus 1* in grapevines in Slovenia. Page 137 in *Proceedings of the 13th meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like diseases of the Grapevine*. Adelaide, South Australia:

- Steward, S. and Nassuth, A. 2001. RT-PCR Based detection of Rupestris stem pitting associated virus within field-grown grapevines throughout the year. *Plant Disease* 85: 617-620.
- Tzeng, H. L., Tzeng, D. D. and Goheen, A. C. 1993. Anatomical and tissue culture studies of rupestris stem pitting-affected grapevines. *Botanical Bulletin of Academia Sinica (Taipei)* 34: 73-82.
- Zhang, Y.-P., Uyemoto, J. K., Golino, D. A. and Rowhani, A. 1998. Nucleotide sequence and RT-PCR detection of a virus associated with grapevine rupestris stem-pitting disease. *Phytopathology* 88: 1231-1237.