

PRVI REZULTATI UPORABE NOVIH LABORATORIJSKIH METOD ZA UGOTAVLJANJE ZASTOPANOSTI VIRUSA, KI POVZROČA RAZBRAZDANJE LESA NA VINSKI TRTI V SLOVENIJI

Nataša PETROVIČ¹, Petra ŠOSTER², Zora KOROŠEC – KORUZA³,
Maja RAVNIKAR⁴, Bao Zhong MENG⁵ in Dennis GONSALVES⁶

^{1,2,4} Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana

Oddelek za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo,
Ljubljana, Slovenija

³ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo,
Ljubljana, Slovenija

^{5,6} Department of Plant Pathology, Cornell University,
New York State Agricultural Experiment Station (NYSAES),
Geneva, ZDA

IZVLEČEK

Uvajamo laboratorijske metode za ugotavljanje zastopanosti povzročitelja boleznih razbrazdanja pri vinski trti (Rupestris stem pitting associated virus 1, RSPaV-1): serološke metode (imunski pivnik in ELISA) in RT-PCR. Preliminarne analize kažejo okuženost šestih od šestih analiziranih trsov indikatorske trte *Vitis rupestris* sorte St. George in okuženost štirih od petih analiziranih trsov *Vitis vinifera* sorte Refošk. Zanimivo je dejstvo, da nobeden od okuženih trsov *V. rupestris* in dva od štirih okuženih trsov Refoška ne kaže nikakršnih znamenj razbrazdanja.

Ključne besede: detekcijske metode, RSPaV-1, vinska trta, virus razbrazdanja lesa vinske trte, *Vitis vinifera*, *Vitis rupestris*

ABSTRACT

FIRST RESULTS ON THE USE OF LABORATORY METHODS FOR DETECTION OF RUPESTRIS STEM PITTING ASSOCIATED VIRUS 1 IN GRAPEVINES IN SLOVENIA

We are introducing laboratory methods for a detection of the causal agent of rupestris stem pitting disease, a rupestris stem pitting associated virus 1 (RSPaV-1): serological methods (ELISA and Western blot) and RT-PCR. The techniques have generated some interesting preliminary results on the presence of the RSPaV-1 in indicator vines of *V. rupestris* cv. St. George, and in *V. vinifera* cv. Refošk. Analyses showed the infection of six (out of six analysed) St. George plants, and the infection of four (out of five

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

² študentka mikrobiol., prav tam

³ doc. dr. znan., SI-1111 Jamnikarjeva 101

⁴ prof. dr. znan., SI-1000 Večna pot 111

⁵ dr. bio. znan., Geneva, NY 14456, ZDA

⁶ prof. dr. znan., prav tam

analysed) Refošk vines. Interestingly, all infected St. George vines and two of the positively analysed Refošk vines show no symptoms of rugose wood.

Key words: detection methods, grapevine, rugose wood, Rupestris stem pitting associated virus, RSPaV-1, *Vitis vinifera*, *Vitis rupestris*

1. UVOD

Rupestris stem pitting (RSP) je leta 1976 odkril A. C. Goheen v Kaliforniji (Goheen, 1998). Novejše objave kažejo, da je RSP ena zelo razširjenih boleznih, ki jo povzroča virus, povezan z razbrazdanjem lesa vinske trte *Vitis rupestris* cv. St. George (angl. Rupestris stem pitting associated virus 1, RSPaV-1) (Meng s sod., 1998; Zhang s sod. 1998; Meng s sod. 1999b).

Klasičen način ugotavljanja okuženosti vinske trte z virusom RSPaV-1, ki je eden od povzročiteljev boleznih razbrazdanja lesa, je indeksiranje na lesni indikator *V. rupestris* cv. Saint George, kjer se po cepljenju v obdobju 2-3 let opazuje pojav značilnih simptomov (Goheen, 1998). Ker je RSP ena zelo razširjenih in gospodarsko pomembnih virusnih boleznih vinske trte, je razvoj hitrejših diagnostičnih metod zelo pomemben za zdravstveno selekcijo klonov vinske trte ter za nadzor pri mednarodnem prometu s sadilnim materialom. Na osnovi določitve sekvence genoma RSPaV-1 je bilo razvitih več metod: serološke metode na osnovi pridobitve protitelesa, kjer so uporabili virusni plaščni protein izražen v bakterijah *Escherichia coli* kot antigen za imunizacijo kuncev (ELISA, imunski pivnik, Meng 1999a) in RT-PCR (Meng s sod. 1998).

2. MATERIAL IN METODE

Analizirali smo šest trsov *Vitis rupestris* sorte St. George (A, B, C, D, E, F, Ampelografski vrt Biotehniške fakultete v Kromberku pri Novi Gorici) in pet trsov *Vitis vinifera* sorte Refošk iz nasada zbirke klonov Refoška v Komnu na Krasu.

Za analizo smo uporabili sveže nastrgan floem prevodnega dela enoletnih olesenelih poganjkov (rožg) ali pa floem sveže zmrznjen pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

ELISA

Uporabili smo indirektni postopek ELISA (Clark in Bar-Joseph, 1984) ter poliklonska primarna protitelesa (As 7-276, Cornell University, Meng 1999a), pridobljena z rekombinantnimi tehnikami, v razmerju 1:1000 in sekundarna protitelesa, konjugirana z alkalno fosfatazo (Sigma, A-8025), v razmerju 1:5000. Ostale razmere: Substrat para nitrofenil fosfat (Sigma, 104-105) v koncentraciji 1mg/ml, mikrotiterske ploščice Nunc Maxi sorp, čitalec Dynatech MR 5000 pri 405 nm.

Imunski pivnik

Metodo smo priredili po postopkih opisanih v Dunbar, 1994. Uporabili smo primarna specifična protitelesa za RSPaV-1 (As 7-276, Cornell University), v razmerju 1:2000, in sekundarna protitelesa z vezano alkalno fosfatazo (Biorad, 170-6518), v razmerju 1:6000. Uporabili smo kemiluminiscenten substrat (Biorad, 170-5018) ter markerske proteine za določanje molekulskih mas pa so bili Prestained SDS-PAGE Standards, Low range (Biorad, 161-0305). PAGE elektroforeza in prenos proteinov iz gela na membrano sta potekala v aparatu za elektroforezo Trans Blot Mini Cell (Biorad). Proteine smo iz gela prenesli na najlonsko membrano (Sigma), ki smo jo izpostavili delovanju sekundarnih protiteles in substrata ter končni produkt zasledili po izpostavljanju filmu (Kodak x-omat, Sigma 19H1287).

Ekstrakcija virusne ds RNK (dvojnovičajne RNK) in RT-PCR (reverzna transkripcija in verižna reakcija polimeraze)

Ekstrakcija dsRNK RSPaV-1 je potekala po postopku prirejenem po Hu s sod., 1990. Za RT-PCR po postopku opisanem v Meng s sod. (1999b) smo uporabili reverzno transkriptazo (N808-0018, Perkin Elmer) in Taq polimerazo (N801-0060) ter par začetnih sintetskih nukleotidov, ki določa pomnoževanje 498 bp dolgega fragmenta virusne cDNK (začetnika 9 in 10, Meng s sod. 1999b): RSP 9: 5-GGCCAAGGTTTCAGTTTG-3; RSP 10: 5-ACACCTGCTGTGAAAGC-3. RT in PCR reakciji sta potekali v GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer).

3. REZULTATI IN DISKUSIJA

V Preglednici 1 so zbrani podatki o okuženosti šestih trsov *V. rupestris* St. George z virusom RSPaV-1, ki so bili testirani po treh metodah. Rezultati vseh treh metod so pozitivni pri floemu rozg trsov *V. rupestris* B, C in E. Za te trse tako lahko z gotovostjo trdimo, da se v floemu njihovih rozg nahajajo virusi RSPaV-1. Eksperimentalno je bilo dokazano, da je od obeh seroloških testov (ELISA in imunski pivnik) bolj občutljiv imunski pivnik. S to metodo torej lahko zaznamo manjše koncentracije virusa. Tako lahko za *V. rupestris* D in *V. rupestris* F, pri katerih so bili rezultati ELISA negativni, rezultati immunskega pivnika pa pozitivni, predvidevamo, da je do negativnega ELISA rezultata prišlo zaradi manjše občutljivosti tega testa, ki ne zazna dovolj majhnih koncentracij virusa v rastlinskem tkivu. Dodatno potrdilo za okuženost floema rozg trsa *V. rupestris* D nam daje pozitiven rezultat testa RT-PCR. V primeru, ko pri RT-PCR nismo dobili pozitivnega rezultata, moramo upoštevati naslednje pomanjkljivosti te metode: 1) virusno dsRNA pri ekstrakciji lahko izgubimo in 2) začetniki 9 in 10 ne zajamejo vsega spektra sekvenčnih različic genoma RSPaV-1 (Meng, 1999a).

Preglednica 1: Primerjava rezultatov treh različnih diagnostičnih metod za analizo virusa RSPaV-1 (ELISA, imunski pivnik in RT-PCR), po katerih so bili testirani trsi *V. rupestris* St. George (trsi A-F) in prikaz zastopanosti znamenj obolelosti razbrazdanja lesa na testiranih trsih.

Table 1: Comparison of the results of three different methods of analyses of RSPaV-1 virus (ELISA, Western blot and RT-PCR), on *Vitis rupestris* cv. St. George (vines A-F), and description of the presence of rugose wood symptoms on each of the tested vines.

<i>Vitis rupestris</i> St. George	ELIS	Imunski pivnik	RT-PCR	Bolezenska znamenja razbrazdanja lesa
A	+	+	-	Jih ni
B	+	+	+	Jih ni
C	+	+	+	Jih ni
D	-	+	+	Jih ni
E	+	+	+	Jih ni
F	-	+	-	Jih ni

Preglednica 2 zajema skupen prikaz rezultatov treh diagnostičnih metod za trse *V. vinifera* sorte Refošk. Z njeno pomočjo si lahko, kakor pri trsih *V. rupestris* razložimo, kateri trsi so okuženi z RSPaV-1, oziroma ki s tem virusom niso okuženi. Pri Ref. 38VIII/44 in Ref. 24V/61 negotovosti ni, saj smo z vsemi uporabljenimi metodami dokazali, da sta okužena z virusom RSPaV-1. Ref. 6II/18 je pozitiven po obeh seroloških metodah in negativen po RT-PCR, kar lahko razložimo podobno kot v primeru

V. rupestris A (pomanjkljivosti RT-PCR metode). Ref. 20V/4 je z virusom RSPaV-1 okužen, čeprav ELISA tega ni pokazala, kajti, kot je bilo že omenjeno, je imunski pivnik občutljivejša metoda od metode ELISA. Gotovost, s katero lahko trdimo ali je trs okužen ali ne, pa je močno zmanjšana pri Ref. 23V/60, pri katerem je bil virus dokazan le z RT-PCR.

Analiza zastopanosti RSPaV-1 pri vseh analiziranih trsah je pokazala, da so uporabljene laboratorijske metode izredno pomembne, saj lahko ugotovimo virus v rastlini preden (če sploh) se pokažejo kakršnakoli bolezenska znamenja. Tako smo za tri trse Refoška, ki ne kažejo znamenj obolezlosti razbrazdanja lesa, dokazali virus RSPaV-1 z eno (Ref 23V/60), z dvema (Ref 6II/18) ali z vsemi tremi (Ref 24V/61) metodami. Tudi tu (kot pri *V. rupestris* St. George) lahko sklepamo na latentno okužbo z RSPaV-1 in na možno toleranco. Možno pa je tudi razmišljati, da razbrazdanje povzroča nek tretji, neznan, nedoločen, neizoliran patogen, saj etiologija boleznih razbrazdanja lesa še ni popolnoma znana (Goheen, 1998; Meng s sod., 1999b). Za dokončno potrditev zanesljivosti hitrih diagnostičnih metod bi bilo potrebno vzporedno z njimi izvajati klasičen način preverjanja okuženosti vinskih trsov z RSPaV-1 – s cepljenjem na zdrav indikator *V. rupestris* St. George in na večjem številu rastlin.

Preglednica 2: Primerjava rezultatov treh različnih diagnostičnih metod za analizo RSPaV-1 (ELISA, imunski pivnik in RT-PCR), po katerih je bilo testiranih pet trsov *Vitis vinifera* sorte Refošk ter prikaz znamenj obolezlosti razbrazdanja lesa na testiranih trsah.

Table 2: Comparison of the results of three different methods of analyses of RSPaV-1 virus (ELISA, Western blot and RT-PCR) on five vines of *Vitis vinifera* cv. Refošk, and description of the presence of rugose wood symptoms on each of the tested vines.

<i>Vitis vinifera</i> Refošk (oznaka trsa)	ELISA	Imunski pivnik	RT-PCR	Bolezenski znamenja razbrazdanja lesa
Ref. 20 V / 4	-	+	+	Razbrazdanje na podlagi
Ref. 6 II / 18	+	+	-	Bolezenskih znamenj ni
Ref. 38 VIII / 44	+	+	+	Razbrazdanje na zgornjem delu
Ref. 23 V / 60	-	-	+	Bolezenskih znamenj ni
Ref. 24 V / 61	+	+	+	Bolezenskih znamenj ni

4. SKLEPI

Naše analize opravljene z vsemi tremi tehnikami kažejo okuženost šestih trsov (od šestih testiranih) *V. rupestris* Saint George in okuženost štirih trsov (od petih testiranih) *V. vinifera* sorte Refošk. Zanimivo je, da nobeden od šestih trsov St. George ne kaže bolezenskih znamenj razbrazdanja lesa. Dva od pozitivno testiranih trsov Refoška ne kažeta nobenih znamenj razbrazdanja lesa, eden kaže izrazito razbrazdanje na podlagi (SO 4), eden pa na zgornjem delu. Ti preliminarni rezultati nakazujejo, da so laboratorijske metode lahko izredno pomembne za odkrivanje virusa RSPaV-1 ter za odkrivanje povezanosti tega virusa z boleznijo razbrazdanja lesa.

Prednosti hitrih diagnostičnih metod so relativno visoka občutljivost, hitra izvedba, sposobnost odkrivanja latentnih okužb in možnost njihove priredbe za rutinsko uporabo (RT-PCR in ELISA).

5. VIRI

- Clark, M. F., Bar-Joseph, M. 1984. Enzyme Immunosorbent assays in plant virology. Academic Press, Inc., 51-85.
- Dunbar, B. S. 1994. Protein blotting, A practical approach. Oxford University Press, 11-52
- Goheen, A. C. 1989. Virus Diseases and Grapevine Selection. *Am. J. Enol. Vitic.*, 40, 1: 67-72
- Hu, J. S., Gonsalves, D., Teliz, D. 1990. Characterization of Closterovirus-like Particles Associated with Grapevine Leafroll Disease. *J. Phytopathology* 128: 1-14
- Meng, B. 1999a. Rupestris stem pitting of grapevines: Insights on etiology, and development of reverse transcription-polymerase chain reaction and immunoassays for diagnosis. Doktorska disertacija, Cornell University. 130 s.
- Meng, B., Johnson, R., Peressini, S., Forsline, P.L., Gonsalves, D. 1999b. Rupestris stem pitting associated virus-1 is consistently detected in grapevines that are infected with rupestris stem pitting. *European Journal of Plant Pathology*, 105: 191-199
- Meng, B., Sheng-zhi Pang, Forsline, P.L., McFerson, J.R., Gonsalves, D. 1998. Nucleotide sequence and genome structure of grapevine rupestris stem pitting associated virus-1 reveal similarities to apple stem pitting virus. *Journal of General Virology*. 79: 2059-2069
- Zhang, Y. P., Uyemoto, J. K., Golino, D. A., Rowhani, A. 1998. Nucleotide sequence and RT-PCR detection of a virus associated with grapevine rupestris stem-pitting disease. *Phytopathology* 88: 1231-1237