

DOLOČANJE ToMV VIRUSA V VODAH S PCR V REALNEM ČASUJana BOBEN¹, Matjaž PETERKA², Petra KRAMBERGER³, Katarina CANKAR⁴, Nataša PETROVIĆ⁵, Aleš ŠTRANCAR⁶, Maja RAVNIKAR⁷^{1, 4, 5, 7}Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana
^{2, 3, 6}Separations d. o. o., Ljubljana**IZVLEČEK**

Namakalne vode, ki vsebujejo patogene rastlinske viruse, lahko predstavljajo pomemben vir okužbe za kmetijske rastline, saj le-ti z vstopanjem prek koreninskega sistema lahko povzročijo pojav bolezenskih znamenj na gostiteljskih rastlinah. Prenos lahko poteka tudi v nasprotni smeri, kjer virusi prehajajo iz okuženih rastlin v namakalno vodo in tako širijo okužbo na sosednje rastline. V primerih intenzivne pridelave je zato priporočljivo testiranje namakalne vode na patogene rastlinske viruse. Ti so ponavadi v vodi v nizkih koncentracijah in jih z navadnimi diagnostičnimi metodami, kot je ELISA test, ne moremo določiti. Na modelnem virusu mozaika paradižnika smo razvili občutljivejšo in visoko specifično metodo PCR v realnem času. Za ta virus je znano, da povzroča okužbo testnih rastlin *Nicotiana glutinosa* prek namakalne vode tudi v koncentracijah pod mejo detekcije za ELISA test. Novo razvita metoda omogoča natančnejše določanje mnogo nižjih koncentracij ToMV v namakalni vodi, saj je za okoli 1000-krat bolj občutljiva. Obenem smo uvedli tudi postopek koncentriranja vodnih vzorcev s CIM monolitnimi kromatografskimi nosilci. Z njihovo uporabo smo uspeli določiti ToMV tudi v vodah, ki so bile po predhodnih testih negativne, oziroma so se virusni delci nahajali v vodi v koncentracijah tudi pod mejo občutljivejše molekularno-biološke metode. Kombinacija postopka koncentriranja namakalne vode in analize z občutljivejšo metodo omogoča dokaj zanesljivo spremljanje stanja v okolju in zagotavljanja kvalitete namakalnih voda, predvsem v intenzivni pridelavi rastlin.

Ključne besede: laboratorijsko določanje, PCR v realnem času, ToMV virus, voda

ABSTRACT**DETECTION OF ToMV VIRUS IN WATER USING REAL-TIME PCR**

Irrigation waters can represent a source of infection for plants as plant viruses can enter the plants through the root system and cause disease symptoms on host plants. Viruses can also be released from infected plants into a drainage water and can spread to the neighbouring plants. Concentration of plant viruses in irrigation waters is usually below the sensitivity of frequently used detection methods such as ELISA. ToMV (*Tomato mosaic virus*) was used as a model for development of a highly specific and more sensitive real-time PCR assay. ToMV is known to cause symptoms on *Nicotiana glutinosa* in concentrations below the sensitivity of ELISA. Newly developed method is around 1000-times more sensitive and enables us to detect the viruses in much lower concentrations. CIM[®] Convective Interaction Media disk monolithic columns were also used in order to concentrate water samples where the virus concentration was below the detection limit of real-time PCR. They proved to be successful in concentrating the water samples where virus concentration was below the detection limit of real-time PCR. Combination of concentrating procedure using CIM monolithic chromatographic supports and detection of viruses using a more sensitive method can be used to effectively monitor the condition of irrigation waters and to use the information about the health status of waters in intensive plant production.

Key words: laboratory detection, real-time PCR, ToMV virus, water

¹univ. dipl. mikrobiol., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

²dr., univ. dipl. inž. zoot., Teslova 30, SI-Ljubljana

³univ. dipl. biol., Teslova 30, SI-Ljubljana

⁴univ. dipl. biol., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

⁵dr., univ. dipl. biol., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

⁶doc. dr., univ. dipl. inž. kem., Teslova 30, SI-Ljubljana

⁷prof. dr., univ. dipl. biol., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

1. UVOD

Pomemben vir okužbe za rastline so lahko namakalne vode (Horvath, 1999). Prek koreninskega sistema lahko rastlinski patogeni virusi vstopijo v rastlino in na njih povzročijo pojav bolezenskih znamenj. Prenos lahko poteka tudi v nasprotni smeri, saj lahko virusi v namakalno vodo preidejo iz okoliških okuženih rastlin in se preko vode razširijo na druge gostiteljske rastline (Koenig, 1986).

Za virus mozaika paradižnika (ToMV – *Tomato mosaic virus*) je značilno, da je razširjen skoraj povsod v okolju. Med gostiteljskimi rastlinami se lahko prenaša na različne načine. Med pomembnejše sodi mehanski prenos s pomočjo katerega se virus razširi na zdrave gostiteljske rastline z rastlinskim sokom okuženih rastlin. Možni pa so še prenosi virusa z rokami, z orodjem, s cepljenjem med okuženimi in zdravimi rastlinami, s semenom, z zemljo (substratom) in tudi z namakalno vodo (Huttinga in Rast, 1985). V preteklih raziskavah smo dokazali (Kramberger s sod. (2004), da ToMV okužuje testne rastline *Nicotiana glutinosa* tudi v koncentracijah, ki so pod mejo detekcije serološke semikvantitativne metode ELISA. Po zalivanju rastlin z nizkimi koncentracijami virusa je namreč prišlo do pojava tipičnih bolezenskih znamenj na rastlinah.

ToMV *tobamovirus* smo zaradi omenjenih razlogov izbrali kot model za razvoj občutljivejše metode PCR v realnem času, saj smo želeli določiti virusne delce v namakalnih vodah, kjer so koncentracije virusa večinoma pod mejo detekcije splošno uporabljenega ELISA testa. Močno razredčeni vzorci nukleinskih kislin ali virusnih delcev se lahko uspešno koncentrirajo z uporabo CIM monolitnih kromatografskih nosilcev (Branović s sod., 2003 in Kramberger s sod., 2004) in zato smo njihovo uspešnost preverili tudi v primeru namakalnih voda, okuženih s ToMV, kjer je bila koncentracija virusnih delcev tudi pod mejo detekcije za PCR v realnem času. Obenem smo preverili občutljivost PCR v realnem času glede na občutljivost običajnega serološkega diagnostičnega testa ELISA.

2. MATERIALI IN METODE

2.1 Virusni material

Za namnožitev ToMV virusa smo uporabili testne rastline *Nicotiana clevelandii*. Iz rastlinskega materiala smo očistili virusne delce s postopkom ultracentrifugiranja. Končna koncentracija virusnih delcev je bila 0,42 mg/mL. V nadaljnjih poskusih za razvoj metode smo uporabili ToMV v omenjeni koncentraciji.

2.2 Razvoj specifičnega PCR v realnem času

S pomočjo računalniškega programa smo na odseku virusne nukleinske kisline, ki kodira za gibalni protein, skonstruirali začetne oligonukleotide in specifično sondo. Z njimi pomnožimo lahko 71 bp dolg odsek zapisa za virusni gibalni protein. Določili smo mejo občutljivosti in kvantifikacije testa ter njegovo specifičnost za ToMV.

2.3 Analiza vzorcev namakalne vode

Različne vzorce namakalnih voda iz različnih območij Slovenije smo testirali na ToMV takoj po vzorčenju s PCR v realnem času. V primerih, ko ToMV virusa nismo mogli določiti, smo vzorec namakalne vode koncentrirali s CIM[®] monolitnimi kromatografskimi nosilci (BIA Separations, Ljubljana). Elucijske frakcije, ki smo jih dobili po postopku koncentriranja smo testirali na prisotnost ToMV.

2.4 Koncentriranje namakalnih voda s CIM

Preverili smo učinkovitost uporabe CIM za koncentriranje vzorcev namakalne vode. Vzorec naravne namakalne vode smo okužili z znano koncentracijo ToMV – en vzorec s koncentracijo 10^{-9} mg/mL in drugi vzorec s koncentracijo 10^{-7} mg/mL. Za analizo okužene vode smo uporabili PCR v realnem času. ToMV smo v vodi določali pred koncentriranjem s CIM in po njem.

2.5 Primerjava kvantitativne in semikvantitativne metode

Semikvantitativni ELISA test smo izvedli tako, kot je predhodno opisala Kramberger s sod. (2004). Določili smo mejo detekcije za semikvantitativni test in le-to primerjali z mejo detekcije kvantitativnega PCR v realnem času.

3. REZULTATI

Vzorci za preverjanje občutljivosti za ToMV specifičnega PCR v realnem času smo pripravili tako, da smo čisti virusni pripravek redčili v pufru. Ugotovili smo, da je koncentracija ToMV, ki jo z gotovostjo določimo, 10^{-9} mg/mL (delcev na mL). To pomeni, da lahko določimo količine ToMV, ki se gibljejo okoli 0,001 ng na mL vode, kar je za približno 1000-krat več, kot pri uporabi semikvantitativne metode ELISA. S slednjo določimo okoli 2 ng ToMV na mL vode.

Pri analizi naravne namakalne vode, kjer ToMV nismo mogli določiti PCR v realnem času, smo uporabili postopek koncentriranja s CIM monolitnimi kromatografskimi nosilci. V elucijskih frakcijah, ki so bile rezultat postopka koncentriranja s kromatografskimi kolonami smo uspešno dokazali ToMV. Uspešnost kromatografskih nosilcev za koncentriranje virusov smo določili na vzorcih z znano začetno koncentracijo. Ugotovili smo, da njihova uporaba pred testiranjem za dva reda velikosti (z 10^{-9} mg/mL na 10^{-7} mg/mL in z 10^{-7} mg/mL na 10^{-5} mg/mL) poveča občutljivost PCR v realnem času in so zato zelo uspešni za koncentriranje močno razredčenih vzorcev namakalnih voda.

1. SKLEPI

- Razvili smo za ToMV specifično metodo PCR v realnem času. Prilagodili smo jo za analizo naravnih namakalnih voda in za analizo kromatografskih frakcij, ki jih dobimo po postopku koncentriranja. V obeh primerih se je metoda izkazala kot uspešna.
- CIM monolitni kromatografski nosilci so se izkazali kot uspešni v primeru koncentriranja s ToMV okuženih naravnih namakalnih voda.
- Metoda PCR v realnem času je za 3 velikostne rede (okoli 1000-krat) bolj občutljiva od serološke semikvantitativne metode ELISA.
- Koncentriranje vzorcev s CIM monolitni kromatografski nosilci je uspešno, saj omogoča, da lahko določimo ToMV tudi v vzorcih, kjer je koncentracija tudi pod mejo občutljivejšega PCR v realnem času in poveča njegovo občutljivost za dva velikostna reda.
- Serološka metoda ELISA je ustrezna predvsem za analizo rastlinskih vzorcev, kjer so koncentracije virusnih delcev dokaj visoke in je metoda dovolj občutljiva. Za analizo namakalnih voda pa je ustrežnejša metoda PCR v realnem času, saj je občutljivost tega testa mnogo višja. Kombinacija postopka koncentriranja s CIM in analize s PCR v realnem času je trenutno dokaj zanesljiv postopek za določanje rastlinskih virusov – v tem primeru ToMV – v zelo razredčenih vzorcih.

5. ZAHVALA

Zahvaljujemo se Alešu Blatniku in Klaudiji Matjaž Petek za vzorčenje ter Ministrstvu za visoko šolstvo, znanost in tehnologijo za financiranje projekta.

6. LITERATURA

- Baranović, K., Forčić, D., Ivančić, J., Štrancar, A., Barut, M., Košutić-Gulija, T., Zgorelec, R., Mažuran, R. 2003. Application of short monolithic columns for improved detection of viruses. *Journal of Virological Methods*, 110: 163-171.
- Horvath, J. s sod., 1999. Plant virus contamination of natural waters in Hungary, Lecture and Papers presented at the 4th Slovenian Conference on Plant Protection in Portorož, March 3-4, 1999, Ljubljana 1999, pp. 353-356.
- Huttinga, H., Rast, A. Th. B. 1985. Tomato mosaic *tobamovirus*. Plant Viruses Online, Descriptions and Lists from the VIDE Database. Dostopno na internetu: <http://image.fs.idaho.edu/vidе/descr832.htm> (9. 3. 2004)
- Koenig, R. 1986. Plant viruses in rivers and lakes. *Adv. Virus Res.* 31, 321-333.
- Kramberger, P., Petrovič, N., Štrancar, A., Ravnikar, M. 2004. Concentration of plant viruses using monolithic chromatographic supports. *J. Virol. Meth.*, 120, 51-57.