

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
INTERDISCIPLINARNI PODIPLOMSKI ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Jana BOBEN

**KVALITATIVNO IN KVANTITATIVNO DOLOČANJE
RASTLINSKIH VIRUSOV Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO
V REALNEM ČASU**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF
PLANT VIRUSES WITH REAL-TIME POLYMERASE CHAIN
REACTION**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2006

Doktorska disertacija predstavlja zaključek Interdisciplinarnega podiplomskega študija biotehnologije. Večina dela je bila opravljena v Ljubljani, na Oddelku za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo Nacionalnega inštituta za biologijo, kromatografski del koncentriranja vzorcev namakalne vode pa je bil izveden v molekularno-biološkem laboratoriju podjetja BIA Separations d. o. o..

Senat Biotehniške fakultete je za mentorico doktorske disertacije imenoval prof. dr. Majo Ravnikar.

Mentorica: prof. dr. Maja Ravnikar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. David STOPAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Maja RAVNIKAR
Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo

Članica: prof. dr. Tatjana AVŠIČ ŽUPANC
Univerza v Ljubljani, Medicinska Fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora: 17. 5. 2006

Izjavljam, da je predložena doktorska disertacija rezultat samostojnega raziskovalnega dela.

Jana Boben

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd
DK 578.2/.4:577.2.083:632.3:631.67(043)=863
KG Rastlinska virologija / molekularna biologija / namakalne vode / rečne vode / ToMV / CSNV / qPCR / PCR v realnem času / diagnostika
AV BOBEN, Jana, univerzitetna diplomirana mikrobiologinja
SA RAVNIKAR, Maja (mentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije
LI 2006
IN KVALITATIVNO IN KVANTITATIVNO DOLOČANJE RASTLINSKIH VIRUSOV Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO V REALNEM ČASU
TD Doktorska disertacija
OP XIV, 98 str., 18 pregl., 18 sl., 7 pril., 109 vir.
IJ sl
JI sl / en
AI Določanje rastlinskih virusov je posebej težavno v vzorcih, v katerih se slednji nahajajo v nizkih koncentracijah. Te so lahko posledica specifične interakcije med virusom in rastlino, z njo pa se srečujemo tudi pri okoljskih vzorcih (na primer v rekah, zajetjih vode in namakalnih vodah). Klasične metode, kot je na primer ELISA test, so v primeru takih vzorcev velikokrat premalo občutljive in specifične. Za rastlinske viruse je dokazano, da lahko z namakalnimi vodami preko koreninskega sistema okužijo rastline. Metode, ki bi določale prisotnost virusov v vodah in tako prispevale k razumevanju pojava okužb in njihovem preprečevanju, so slabo razvite. Na modelnem virusu ToMV smo razvili občutljivo, specifično in kvantitativno molekularno metodo PCR v realnem času, s katero lahko zaznamo do $4,2 \times 10^{-10}$ mg/ml ToMV v namakalnih vodah iz okolja. Hkrati smo pokazali, da je občutljivost qPCR 1000-krat večja od DAS-ELISA. Metodo smo razvili in prilagodili tako, da je z njo moč odkrivati prisotnost ToMV tako v namakalnih vodah kot v vzorcih, ki vsebujejo inhibitorje reakcije pomnoževanja virusne nukleinske kisline s polimerazo. S postopkom koncentriranja virusov v vzorcih s CIM monolitnimi kromatografskimi nosilci smo povečali občutljivost testa, saj nam je uspelo povečati koncentracijo ToMV v osnovnem vzorcu za več velikostnih redov (od 1 do 6). Pokazali pa smo tudi, da se ToMV delci v originalnih vzorcih namakalne vode nahajajo v infektivni obliki ter da to svojo lastnost ohranijo tudi po postopku koncentriranja. Na primeru virusa CSNV smo razvili občutljivo in specifično molekularno metodo, ki uspešno razlikuje omenjeni virus od sorodnih tospovirusov. Z njo je moč zanesljivo določiti prisotnost CSNV v rastlinah, uporabna pa je tudi za študij biologije virusa, kjer zaznavamo različne količine virusov v različnih delih rastlin. Z določitvijo nukleotidnega zaporedja CSNV, ki smo ga v Sloveniji prvič določili na gerberi, smo sklepali o možnem izvoru virusa in ga primerjali z edinim dosedaj objavljenim nukleotidnim zaporedjem CSNV.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ŠD Dd
DK 578.2/.4:577.2.083:632.3:631.67(043)=863
KG Plant virology / molecular biology / irrigation waters / river waters / ToMV / CSNV / qPCR / real-time PCR / diagnostics
AV BOBEN, Jana
SA RAVNIKAR, Maja (supervisor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Interdisciplinary Postgraduate Study in Biotechnology
LI 2006
IN QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF PLANT VIRUSES WITH REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION
TD Doctoral Dissertation
OP XIV, 98 p., 18 tab., 18 fig., 7 ann., 109 ref.
IJ Sl
JI sl / en
AI The diagnosis of plant viruses may be especially difficult in samples, where they are present in low concentrations. The cause of this can be specific interactions between plants and viruses. However, low concentrations of viruses can also be present in various environmental samples such as rivers, irrigation waters and water tanks. It has been proven that they can enter and infect plants through the root system. In such cases, classical detection methods such as ELISA are not sensitive or specific enough to detect low concentrations of plant viruses. In general, methods that would detect the presence of viruses in water samples and help understand the development of the disease, are not well developed. We have introduced and optimized a sensitive, specific, quantitative real-time PCR, where we used ToMV as a model virus. We were able to detect up to $4,2 \times 10^{-10}$ mg/ml of ToMV in samples of environmental irrigation waters. We also showed that qPCR is 1,000-times more sensitive than semi-quantitative DAS-ELISA. Our method was optimized for detection of ToMV in original samples as well as in concentrated samples that usually contain inhibitors of PCR reaction. The sensitivity of the test was even higher after the concentration step using CIM® monolithic chromatographic supports had been introduced. The concentration of viruses in samples increased by several (1 to 6) orders of magnitude. ToMV particles were infective in the original irrigation water and remained so even after the concentrating procedure. CSNV was used as a model for the development and optimisation of a molecular method that is able to distinguish serologically related tospoviruses. This method can be used to detect the presence of CSNV in plant samples and to study the biology of the virus when different amounts of virus are detected in different parts of the plant. The nucleotide sequence of the CSNV isolate found on gerbera plant in Slovenia was determined and compared to the published sequence.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	iii
Key word documentation	iv
Kazalo vsebine	v
Kazalo preglednic	ix
Kazalo slik	x
Kazalo prilog	xi
Okrajšave in simboli	xii

1 UVOD	1
1.1 CILJI	2
1.2 HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 Ekonomski pomen rastlinskih virusov.....	4
2.2 Diagnostika rastlinskih virusov	5
2.3 Virusi v vodah.....	6
2.3.1 Rastlinski virusi v vodah.....	6
2.3.2 Razvoj občutljivih metod za določanje humanih virusov v vodah	7
2.3.3 Razvoj občutljivih metod za določanje patogenih protozojev in bakterij v vodah	8
2.4 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času.....	9
2.5 Modelni virusi.....	12
2.5.1 Virus mozaika paradižnika (ToMV).....	12
2.5.2 Virus nekroze stebel krizantem (CSNV)	13
3 MATERIALI IN METODE	15
3.1 RAZVOJ DETEKCIJE IN KVANTIFIKACIJE ToMV S KVANTITATIVNIM PCR V REALNEM ČASU (qPCR).....	15
3.1.1 RASTLINSKI MATERIAL IN VZORCI ZA ANALIZO.....	15
3.1.2 Priprava očiščenih virusnih delcev	15
3.1.2.1 Uporabljeni sev virusa	15
3.1.2.2 Mehanska inokulacija propagacijskih rastlin	16
3.1.2.3 Čiščenje virusnih delcev	16
3.1.3 Priprava ToMV standarda za nadaljnje analize	18
3.1.3.1 Izolacija RNA	18
3.1.3.1.1 Izolacija RNA s kompletom RNeasy	18
3.1.3.1.1.1 Preverjanje izkoristka izolacije RNA z reagentom "Ribogreen"	18
3.1.3.1.2 Izolacija RNA s temperaturno denaturacijo virusnih delcev	19
3.1.3.2 Določanje količine virusnih delcev v ToMV standardu.....	19
3.1.3.2.1 Določanje koncentracije virusne RNA po izolaciji s kompletom RNeasy Plant Mini Kit ..	19
3.1.3.2.2 Določanje koncentracije ToMV v standardu po temperaturni denaturaciji.....	19
3.1.4 Priprava vzorcev za analizo na prisotnost ToMV	20
3.1.4.1 Priprava kromatografskih frakcij	20

3.1.4.1.1 Razsoljevanje in redčenje.....	21
3.1.4.1.1.1 Razsoljevanje z etanolnim obarjanjem	21
3.1.4.1.1.2 Razsoljevanje z gelsko fitracijo	21
3.1.4.1.2 Redčenje in razsoljevanje.....	22
3.1.4.1.2.2 Razsoljevanje z gelsko filtracijo	22
3.1.4.2 Priprava vzorcev vode za analizo.....	22
3.1.4.3 Priprava vzorca prsti za analizo	23
3.1.4.4 Priprava rastlinskih vzorcev za analizo.....	23
3.1.4.4.1 Izolacija RNA.....	23
3.1.4.4.2 Obdelava vzorcev izolirane RNA z DNazo.....	23
3.1.5.1 Primerjave nukleotidnih zaporedij	23
3.1.5.2 Uporaba računalniškega programa za načrtovanje začetnih oligonukleotidov in sonde	25
3.1.6 Izvedba kvantitativne analize ToMV s qPCR.....	25
3.1.6.1 Obratno prepisovanje (RT)	25
3.1.6.1.1 Priprava vzorcev za obratno prepisovanje.....	26
3.1.6.1.1.1 Redčenje RNA pred RT.....	26
3.1.6.1.2 RT s kemikalijami proizvajalca Applied Biosystems (ZDA)	26
3.1.6.1.3 Obratno prepisovanje s kompletom High Capacity cDNA Archive Kit.....	27
3.1.6.2 Kvantitativni PCR v realnem času (qPCR)	28
3.1.6.2.1 Optimizacija koncentracij začetnih oligonukleotidov in sonde	29
3.1.6.2.2 Analiza qPCR reakcij	29
3.1.6.2.3 Določanje meja detekcije in kvantifikacije	30
3.1.6.2.4 Določanje učinkovitosti pomnoževanja	30
3.1.6.2.5 Določanje specifičnosti qPCR reakcije	30
3.1.7 Analiza vzorcev namakalne vode	31
3.1.7.1 Analiza originalnih vzorcev namakalne vode	31
3.1.7.1.1 Prilagoditev qPCR testa za analizo namakalne vode.....	31
3.1.7.1.2 Končna izvedba analize originalnih vzorcev namakalne vode	32
3.1.7.2 Koncentriranje vzorcev namakalne vode z uporabo CIM® (Convective Interaction Media) monolitnih kromatografskih nosilcev	32
3.1.8 Druge analize vzorcev na prisotnost ToMV	33
3.1.8.1 DAS-ELISA	33
3.1.8.2 Testi infektivnosti	34
3.1.8.2.1 Mehanska inokulacija testnih rastlin z elucijsko frakcijo	34
3.1.8.2.2 Zalivanje rastlin s ToMV okuženo vodo	34
3.1.8.3 Elektronska mikroskopija	35
3.1.9 Primerjava qPCR in DAS-ELISA	35
3.2 RAZVOJ METODE ZA DOLOČANJE CSNV S PCR V REALNEM ČASU	36
3.2.1 MATERIAL ZA ANALIZO	36
3.2.2 Izolacija RNA	36
3.2.3 Obratno prepisovanje (RT)	36
3.2.4 Določitev nukleotidnega zaporedja za Virus nekroze stebel krizantem (CSNV – <i>Chrysanthemum stem necrosis virus</i>)	37
3.2.4.1 PCR za kasnejše določanje nukleotidnega zaporedja.....	37
3.2.4.2 Izolacija specifičnih produktov PCR	38
3.2.4.3 Kloniranje specifičnih produktov v plazmid pGEM-T	38
3.2.4.4 Transformacija bakterij <i>E. coli</i> DH5α.....	39
3.2.4.4.1 Preverjanje vstavitev specifičnega produkta PCR v plazmid pGEM-T	39
3.2.4.5 Izolacija plazmida z vstavljenim specifičnim produkтом PCR	40
3.2.4.6 Reakcija za določanje nukleotidnega zaporedja.....	41
3.2.4.7 Čiščenje produktov po reakciji za določanje nukleotidnega zaporedja.....	41
3.2.5 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov in sonde za specifično določanje CSNV	42
3.2.6 Kvalitativna analiza CSNV s PCR v realnem času.....	42
3.2.6.1 RT reakcija.....	42
3.2.6.2 PCR v realnem času	43
3.2.6.2.1 Analiza PCR v realnem času	44

3.2.6.2.2 Določanje specifičnosti načrtovanih začetnih oligonukleotidov in sonde za CSNV	44
--	----

4 REZULTATI 45

4.1 RAZVOJ DETEKCIJE IN KVANTIFIKACIJE ToMV S KVANTITATIVNIM PCR V REALNEM ČASU (qPCR).....	45
4.1.1 Priprava očiščenih virusnih delcev ToMV.....	45
4.1.2 Določanje količine virusnih delcev v standardu	45
4.1.2.1 Količina virusne RNA v standardu po izolaciji s kompletom	46
4.1.2.1.1 Preverjanje izkoristka izolacije RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit	46
4.1.2.2 Količina virusnih delcev v standardu po izolaciji RNA s temperaturno denaturacijo.....	46
4.1.2.3 Razvoj qPCR	47
4.1.3.1 Načrtovani začetni oligonukleotidi in sonda	47
4.1.3.2 Redčenje vzorcev pred ali po obratnem prepisovanju (RT).....	48
4.1.3.3 Optimizacija koncentracije začetnih oligonukleotidov in sonde v qPCR reakciji.....	48
4.1.3.4 Priprava ToMV standarda	50
4.1.4 Izvedba qPCR analiz.....	51
4.1.4.1 Meja detekcije, meja kvantifikacije in učinkovitost pomnoževanja ToMV specifičnega qPCR	51
4.1.4.3 Specifičnost ToMV qPCR	53
4.1.4.4 Priprava vzorcev namakalne vode za analizo	54
4.1.4.4.1 Razvoj metode za določanje količine ToMV v vzorcih vode	54
4.1.4.4.2 Uporaba CIM® monolitnih kromatografskih nosilcev za koncentriranje vzorcev namakalne vode	54
4.1.4.4.2.1 Priprava elucijske kromatografske frakcije na analizo s qPCR	55
4.1.4.4.2.2 Učinkovitost CIM za koncentriranje vzorcev namakalne vode	56
4.1.5 Testiranje vzorcev namakalne vode	57
4.1.5.1 Preverjanje infektivnosti virusnih delcev v elucijski kromatografski frakciji	58
4.1.5.2 Infektivnost ToMV v vzorcih namakalne vode	60
4.1.6 Primerjava qPCR in DAS-ELISA za kvantifikacijo ToMV	62

4.2 RAZVOJ DETEKCIJE CSNV S PCR V REALNEM ČASU

4.2.1 Določanje nukleotidnega zaporedja CSNV izolata iz gerber.....	63
4.2.1.1 Rezultati PCR.....	63
4.2.1.2 Preverjanje prisotnosti vstavljenega produkta PCR v transformiranih bakterijah.....	64
4.2.1.3 Izolacija plazmidne DNA.....	65
4.2.1.4 Nukleotidno zaporedje CSNV z gerbere	65
4.2.2 Razvoj za CSNV specifičnega kvalitativnega PCR v realnem času	66
4.2.3 Določanje CSNV in TSWV v rastlinskih vzorcih	66
4.2.3.1 Specifičnost PCR v realnem času za določanje CSNV	68

5 RAZPRAVA IN SKLEPI 69

5.1 RAZPRAVA.....	69
5.1.2 Nizke koncentracije rastlinskih virusov in njihovo določanje	69
5.1.3 Kvantitativno določanje ToMV	70
5.1.3.1 Razvoj kvantitativne metode	70
5.1.3.2 Priprava vzorcev za analizo	72
5.1.3.3 Analiza vzorcev	73
5.1.3.3.1 Uporaba CIM kromatografskih nosilcev za koncentriranje vzorcev namakalne vode	74
5.1.3.3.2 Infektivnost ToMV v vzorcih in v elucijski frakciji	75
5.1.3.4 Primerjava DAS-ELISA in qPCR za kvantifikacijo ToMV	76
5.1.3.5 Predlagani protokol za analizo namakalnih voda	77
5.1.4 Določanje Virusa nekroze stebel krizantem (CSNV)	79
5.1.4.1 Določanje nukleotidnega zaporedja CSNV	79
5.1.4.2 Razvoj PCR v realnem času za določanje CSNV	80
5.1.4.3 Predlagani protokol za analizo rastlinskih vzorcev na CSNV	81

5.2 SKLEPI	83
6 POVZETEK (SUMMARY)	85
6.1 POVZETEK.....	85
6.2 SUMMARY.....	88
7 VIRI	91
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

PREGLEDNICA 1: SESTAVA FC PUFRA	16
PREGLEDNICA 2: SEZNAM RAZLIČNIH ToMV SEVOV, KJER SMO PRIMERJALI DELNA NUKLEOTIDNA ZAPOREDJA ZA CP IN PRIPADAJOČE ŠTEVILKE ZAPOREDIJ IZ BAZE NCBI	24
PREGLEDNICA 3: SEZNAM RAZLIČNIH ToMV SEVOV/IZOLATOV, KJER SMO PRIMERJALI ZAPOREDJA ZA MP IN PRIPADAJOČE ŠTEVILKE ZAPOREDIJ IZ BAZE NCBI	24
PREGLEDNICA 4: KEMIKALIJE ZA OBRATNO PREPISOVANJE	26
PREGLEDNICA 5: SEZNAM NAČRTOVANIH, ToMV SPECIFIČNIH ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV IN SONDE.	28
PREGLEDNICA 6: SEZNAM ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV ZA KASNEJŠE DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA CSNV VIRUSA	37
PREGLEDNICA 7: SEZNAM UNIVERZALNIH ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV, UPORABLJENIH ZA DOLOČANJE INSERCIJE SPECIFIČNEGA PRODUKTA PCR V PLAZMID IN ZA REAKCIJO DOLOČANJA NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA	40
PREGLEDNICA 8: SEZNAM NAČRTOVANIH, ZA CSNV SPECIFIČNIH ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV IN SONDE..	43
PREGLEDNICA 9: SEZNAM TSWV IN COX ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV IN SOND	43
PREGLEDNICA 10: PRIMERJAVA V FORMULAH UMERITVENE KRIVULJE IN UČINKOVITOSTI, KADAR SMO REDČILI RNA PRED RT, OZIROMA cDNA PO RT REAKCIJI.	48
PREGLEDNICA 11: PRIMERJAVE PODATKOV QPCR V ENI TIPIČNI REAKCIJI (INTRA-ASSAY) IN MED RAZLIČNIMI REAKCIJAMI (INTER-ASSAY).	52
PREGLEDNICA 12: PRIMERJAVA NAKLONOV UMERITVENIH KRIVULJ IN R^2 KOEFICIENTOV PRI VZORCIH, KI SMO JIH RAZSOLJEVALI NA RAZLIČNE NAČINE IN REDČILI PRED ALI PO RAZSOLJEVANJU	55
PREGLEDNICA 13: ANALIZA TREH VZORCEV VODE ZZNANO KONCENTRACIJO ToMV S QPCR IN VPLIV POSTOPKA KONCENTRIRANJA S CIM.....	56
PREGLEDNICA 14: ANALIZA VZORCEV NAMAKALNE VODE S ToMV SPECIFIČNIM QPCR PRED IN PO POSTOPKU KONCENTRIRANJA S CIM.....	57
PREGLEDNICA 15: VZORCI TESTNIH RASTLIN, ANALIZIRANIH NA ToMV.....	59
PREGLEDNICA 16: PRIMERJAVA QPCR IN SEMIKVANTITATIVNE DAS-ELISA.....	62
PREGLEDNICA 17: SEZNAM ANALIZIRANIH RASTLIN, V KATERIH SMO DOLOČALI PRISOTNOST CSNV IN TSWV Z REZULTATI.....	67
PREGLEDNICA 18: DOLOČANJE SPECIFIČNOSTI ZA CSNV SPECIFIČNEGA PCR V REALNEM ČASU	68

KAZALO SLIK

SLIKA 1 SHEMATIČNI PRIKAZ VIRUSNEGA DELCA IZ DRUŽINE <i>BUNYAVIRIDAE</i> (FAUQUET IN SOD., 2005).	13
SLIKA 2: SHEMA RAZLIČNIH POSKUSOV RAZSOLJEVANJA ELUCIJSKE KROMATOGRAFSKE FRAKCIJE ZA KASNEJŠO ANALIZO.	21
SLIKA 3: SHEMA POTEKA DELA PRI PRIPRAVI ToMV STANDARDA.	45
SLIKA 4: 72 BP DOLG AMPLIKON ZA SPECIFIČNO DOLOČANJE ToMV.	47
SLIKA 5: OPTIMIZACIJA KONCENTRACIJE ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV.	49
SLIKA 6: OPTIMIZACIJA KONCENTRACIJE SONDE.	50
SLIKA 7: 10% POLIAKRILAMIDNI GEL, KI PRIKAZUJE PRISOTNOST 72 BP DOLGEGA PRODUKTA QPCR REAKCIJE.	53
SLIKA 8: ToMV V ELUCIJSKI FRAKCIJI (FOTO: TUŠEK-ŽNIDARIČ)	58
SLIKA 9 (LEVO): SLIKA BOLEZENSKIH ZNAMENJ NA <i>N. CLEVELANDII</i> PO DVOTEDENSKEM ZALIVANJU Z NAMAKALNO VODO IZ GRAMOZNICE IVANCI	60
SLIKA 10 (DESNO): SLIKA BOLEZENSKIH ZNAMENJ NA <i>N. CLEVELANDII</i> PO DVOTEDENSKEM ZALIVANJU Z RAZREDČENO ELUCIJSKO FRAKCIJO NAMAKALNE VODE IZ GRAMOZNICE IVANCI	60
SLIKA 11: RASTLINA <i>N. CLEVELANDII</i> , KI SMO JO DVA TEDNA ZALIVALI Z NAVADNO VODOVODNO VODO, KI NE KAŽE NOBENIH BOLEZENSKIH ZNAMENJ	60
SLIKA 12: SHEMA NALEGANJA UPORABLJENIH PAROV ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV (BR060-BR066 IN CZ1-UHP) NA OBJAVLJENO NUKLEOTIDNO ZAPOREDJE ZA CSNV VIRUSNI GEN N (AF067068)	63
SLIKA 13: REZULTATI PCR REAKCIJE Z BR060-BR066 IN CZ1-UHP PAROMA ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV.	63
SLIKA 14: PCR IZ BAKTERIJSKIH KOLONIJ Z VSTAVLJENIMI PLAZMIDI.	64
SLIKA 15: IZOLIRANA PLAZMIDNA DNA.	65
SLIKA 16: 70 BP DOLG AMPLIKON ZA SPECIFIČNO DOLOČANJE CSNV.	66
SLIKA 17: SHEMA PREDLAGANEGA PROTOKOLA ZA ANALIZO NAMAKALNIH VODA	78
SLIKA 18: SHEMA PREDLAGANEGA PROTOKOLA ZA ANALIZO RASTLINSKIH VZORCEV NA PRISOTNOST CSNV IN TSWV	82

KAZALO PRILOG

- Priloga A: **Sestava pufrov za test DAS-ELISA**
Priloga B: **Poravnava CSNV nukleotidnega zaporedja z gerbere in AF067068**
Priloga C: **Ct in SD vrednosti za COX**
Priloga D: **Primerjava qPCR reakcij za določanje ToMV z vmesnimi izračuni koncentracij in standardnih deviacij (SD) ter pripadajočimi koeficienti variacije (CV)**
Priloga E: **Rezultati qPCR za ugotavljanje prisotnosti ToMV v mehansko inokuliranih testnih rastlinah *N. Glutinosa***
Priloga F: **Rezultati qPCR za ugotavljanje prisotnosti ToMV v propagacijskih rastlinah *N. clevelandii*, ki smo jih zalivali s ToMV okuženo vodo in vodovodno vodo**
Priloga G: **Rezultati štirih poskusov DAS-ELISA**

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ACLSV	Virus klorotične pegavosti listov jablan (<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>)
Amp	ampicilin
A_n	absorbanca, izmerjena pri valovni dolžini »n«
ApMV	Virus mozaika jablan (<i>Apple mosaïc virus</i>)
APS	amonijev persulfat
ASGV	Virus razbrazdanja stebel jablan (<i>Apple stem grooving virus</i>)
BKV	Virus BK (BK virus)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BMMV	Virus blagega mozaika ječmena (<i>Barley mild mosaïc virus</i>)
BMYV	Virus blagega rumenenja pese (<i>Beet mild yellows virus</i>)
BR060	smiseln začetni oligonukleotid za CSNV PCR
BR066	protismiseln začetni oligonukleotid za CSNV PCR
BYDV	Virus rumene pritlikavosti ječmena (<i>Barley yellow dwarf virus</i>)
BYMV	Virus rumenega mozaika ječmena (<i>Barley yellow mosaic virus</i>)
BYV	Virus rumenenja pese (<i>Beet yellows virus</i>)
CaMV	Virus mozaika cvetače (<i>Cauliflower mosaïc virus</i>)
CarMV	Virus lisavosti nageljnov (<i>Carnation mottle virus</i>)
CarVY	Virus korenja Y (<i>Carrot virus Y</i>)
CERV	Virus obročkastih razjed nageljnov (<i>Carnation etched ring virus</i>)
cfu	enota, ki tvori kolonijo (colony forming unit)
CGMMV	Virus zelene lisavosti in mozaika kumar (<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i>)
CIM	monolitni kromatografski nosilec s patentiranim imenom: Convective Interaction Media
CMV	Virus mozaika kumar (<i>Cucumber mosaïc virus</i>)
cox	gen za citokrom oksidazo
COX-F	smiseln začetni oligonukleotid za COX PCR v realnem času
COX-RW	protismiseln začetni oligonukleotid za COX PCR v realnem času
COXSOL-1511T	sonda za specifično določanje COX s PCR v realnem času
CP	virusni plaščni protein (coat protein)
CRSV	Virus obročkaste pegavosti nageljnov (<i>Carnation ringspot virus</i>)
CSNV	Virus nekroze stebel krizantem (<i>Chrysanthemum stem necrosis virus</i>)
CSNVF	smiseln začetni oligonukleotid za CSNV PCR v realnem času
CSNVMGB	sonda za specifično določanje CSNV s PCR v realnem času
CSNVR	protismiseln začetni oligonukleotid za CSNV PCR v realnem času
Ct	točka, v kateri pride do dviga signala fluorescence poročevalske molekule nad vrednostjo praga, ki se izraža v številu ciklov
CVMV	Virus lisavosti žil nageljnov (<i>Carnation vein mottle virus</i>)
CymMV	Virus mozaika orhidej (<i>Cymbidium mosaïc virus</i>)
CZ1	smiseln začetni oligonukleotid za CSNV PCR
DAS-ELISA	dvojni sendvič-ELISA test
DEPC	dietil pirokarbonat
dNTP	deoksi-nukleotid-trifosfat
dUTP	deoksi-uridin-trifosfat
E	učinkovitost (pomnoževanja v qPCR reakciji)
EDTA	etilen-diamin-tetraocetna kislina

FAM	6-karboksifluorescein
FC pufer	fosfat-citronska kislina pufer
GRSV	Virus obročkaste pegavosti arašidov (<i>Groundnut ringspot virus</i>)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
INSV	Virus nekrotične pegavosti vodenke (<i>Impatiens necrotic spot virus</i>)
IPTG	izopropil-beta-D-tiogalaktopiranozid
ISEM	elektronska mikroskopija z uporabo protiteles (imuno-serološka elektronska mikroskopija)
IYSV	Virus rumene pegavosti irisa (<i>Iris yellow spot virus</i>)
1	dolžina poti svetlobe skozi kivetno (cm)
LB gojišče	Luria-bujon (ang. Luria-Broth) gojišče (hranilno gojišče)
LOD	meja detekcije
LOQ	meja kvantifikacije
luc	gen za luciferazo
M13	začetni oligonukleotid za preverjanje uspešnosti transformacije s PCR
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
MGB	molekula, ki se veže na mali graben verige DNA (minor groove binder)
MNSV	Virus nekrotične pegavosti melon (<i>Melon necrotic spot virus</i>)
MP	virusni gibalni protein (movement protein)
MuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MYSV	Virus rumene pegavosti melon (<i>Melon yellow spot virus</i>)
N _A	avogadrovo število ($6,022137 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)
Na-DIECA	natrijev dietilditiokarbamat
NCBI	National Centre for Biotechnology Information
OD	optična gostota
ORSV	Virus obročkaste pegavosti orhidej (<i>Odontoglossum ringspot virus</i>)
PBS pufer	fosfatni pufer z NaCl
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PEG	polietilenglikol
pGEM-T	plazmid, uporabljen za kloniranje
PMMV	Virus blage lisavosti paprik (<i>Pepper mild mottle virus</i>)
pNPP	p-nitrofenil fosfat
PSTVd	Viroid vretenoidnosti krompirjevih gomoljev (<i>Potato spindle tuber viroid</i>)
PVP	polivinilpirolidon
PVY	Virus krompirja Y (<i>Potato virus Y</i>)
QA	kvarterni amin (aktivna skupina na CIM kromatografskem nosilcu)
qPCR	kvantitativni PCR v realnem času
R40	začetni oligonukleotid za preverjanje uspešnosti transformacije s PCR
rpm	obrati na minuto
RSV	Respiratorni sincicijski virus (<i>Respiratory syncytial virus</i>)
RT	obratno prepisovanje
SCV	Virus zgubnosti jagod (<i>Strawberry crinkle virus</i>)
SMoV	Virus lisavosti jagod (<i>Strawberry mottle virus</i>)
SMYEV	Virus blagega rumenenja robov jagod (<i>Strawberry mild yellow edge virus</i>)
SqMV	Virus mozaika buč (<i>Squash mosaic virus</i>)
SVBV	Virus progavosti žil jagod (<i>Strawberry vein banding virus</i>)
TAE pufer	tris-acetatni pufer
TAMRA	6-karboksi-tetra-metilrodamin

TCSV	Virus klorotične pegavosti paradižnika (<i>Tomato chlorotic spot virus</i>)
TE pufer	tris-EDTA pufer
TEMED	N,N,N,N-tetrametil-etilendiamin
T_m	temperatura tališča verige DNA
TMGMV	Virus blagega in zelenega mozaika tobaka (<i>Tobacco mild green mosaic virus</i>)
TMV	Virus mozaika tobaka (<i>Tobacco mosaic virus</i>)
ToMV-D	Virus mozaika paradižnika, sev Dahlemense (<i>Tomato mosaic virus</i>)
ToMVF	smiselni začetni oligonukleotid za določanje ToMV
ToMVMGB	MGB sonda za specifično določanje ToMV
ToMVR	protismiselni začetni oligonukleotid za določanje ToMV
TSWV	Virus pegavosti in uvelosti paradižnika (<i>Tomato spotted wilt virus</i>)
TSWV-CP-100R	protismiselni začetni oligonukleotid za TSWV PCR v realnem času
TSWV-CP-17F	smiselni začetni oligonukleotid za TSWV PCR v realnem času
TSWV-CP-73T	sonda za specifično določanje TSWV s PCR v realnem času
UHP	protismiselni začetni oligonukleotid za CSNV PCR
VIC	komercialno ime za fluorescentno barvilo SONDE za PCR v realnem času
WMV	Virus mozaika lubenic (<i>Watermelon mosaic virus</i>)
WSMoV	Virus srebrne lisavosti lubenic (<i>Watermelon silver mottle virus</i>)
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil-beta-D-galaktopiranozid
ZYMV	Virus rumenega mozaika bučk (<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>)
ΔR_n	sprememba v signalu fluorescence
ϵ	ekstinkcijski koeficient ($M^{-1} cm^{-1}$)

1 UVOD

Okužba rastlin z virusi povzroča nastanek bolj ali manj izrazitih bolezenskih znamenj. Okužbe ekonomsko pomembnejših rastlin z virusi lahko povzročijo velik izpad pridelka in veliko gospodarsko škodo. Eden od možnih vstopov rastlinskih virusov v gostiteljsko rastlino je z namakalno vodo preko koreninskega sistema. Iz okuženih rastlin se virusi lahko sproščajo v okolje in tako se okužba širi tudi na okoliške, zdrave rastline. Virusi so v namakalnih vodah prisotni v koncentracijah, ki jih z obstoječimi metodami težko zaznamo, zato je pomemben razvoj občutljive in zanesljive metode, ki lahko odkrije prisotnost rastlinskih virusov v namakalni vodi in s katero lahko posledično preprečujemo večje izpade pridelka.

Diagnostične metode v rastlinski virologiji morajo biti zanesljive, hitre ter cenovno in izvedbeno dostopne. Zanesljivost metode je odvisna od specifičnosti in od občutljivosti. Ni pomembno le dejstvo, da smo sum na okužbo v rastlinah ovrgli ali potrdili, marveč tudi to, s kolikšno verjetnostjo lahko trdim, da je dobljeni rezultat pravilen. Zaplete se takrat, kadar pri uporabi metode pride do nespecifičnosti, ki so lahko rezultat podobnih struktur proteinov, ki jih določamo s serološkimi metodami. Nekatera protitelesa niso dovolj specifična za določen tip virusa, in zato povzročijo pojav navzkrižne reaktivnosti. V takih primerih moramo uporabiti dodatno metodo, ki temelji na drugačnem principu detekcije.

Z razvojem novejših, bolj občutljivih molekularno-bioloških diagnostičnih metod so se odprle nove možnosti tudi pri diagnostiki rastlinskih virusov. Veliko avtorjev opisuje prednosti molekularnih metod pred serološkimi in poudarja predvsem njihovo večjo občutljivost (Candrese in sod., 1998; Mumford in sod., 2004). Z razvojem metode verižne reakcije s polimerazo (PCR) v realnem času se je občutljivost obstoječih molekularnih metod, kot sta obratno prepisovanje-PCR (RT-PCR) in PCR, še dodatno povečala. Z neno uporabo so se razvili številni diagnostični testi, pri katerih gre za določanje koncentracije patogenega mikroorganizma v vzorcu. Razvoj bolezni, tudi rastlinskih, je lahko odvisen od njihove količine. PCR v realnem času omogoča pomnoževanje krajsih odsekov tarčnega nukleotidnega zaporedja in tako poveča specifičnost testov (Afonina, 1997; Kutyavin, 2000) v primerjavi s klasično PCR metodo. Z njegovo uporabo se zato hkrati poveča tudi možnost za razvoj specifičnih testov za patogene mikroorganizme, kar prej zaradi variabilnosti v njihovem genomu ni bilo možno.

Problem določanja serološko navzkrižno reaktivnih Tobamovirusov so z uporabo molekularnih metod uspeli rešiti Letschert in sod., 2002. Naš cilj je pokazati, da je PCR v realnem času dovolj zanesljiva in občutljiva metoda, da jo lahko uporabimo za določanje serološko navzkrižno reaktivnih Tospovirusov (Virus nekroze stebel krizantem (CSNV – *Chrysanthemum stem necrosis virus*) in Virus pegavosti in uvelosti paradižnika (TSWV – *Tomato spotted wilt virus*), kar opisujejo Ravnikar in sod. (2003)). Razvili bomo specifični PCR v realnem času za določanje CSNV in ga prilagodili za uporabo v diagnostične namene. Na podlagi določitve nukleotidnega zaporedja CSNV, bomo preverili sorodnost virusa z znanimi izolati.

Prisotnost rastlinskih virusov in patogenih mikroorganizmov v namakalnih vodah zaenkrat še ni bila podrobno raziskana. Potreben je namreč razvoj dovolj občutljivih, hkrati pa specifičnih metod za njihovo določanje. Načrtovali bomo poskus na modelnem virusu

mozaika paradižnika (*Tomato mosaic virus* –ToMV), kjer bo princip detekcije virusov temeljil na molekularni metodi PCR v realnem času, ki bo uporabna tudi za določanje koncentracije ToMV v vzorcu (kvantifikacijo). Optimizirali bomo metodo za analizo vzorcev namakalnih voda ter primerjali občutljivosti razvitega qPCR in prej pogosto uporabljene serološke metode DAS-ELISA. Preverili bomo, ali so ToMV virusi v namakalnih vodah infektivni in ali povzročajo pojav bolezenskih znamenj pri testnih rastlinah.

1.1 CILJI

Cilji doktorske naloge so:

- Razviti in optimizirati metodo, uporabno za kvalitativno in kvantitativno določanje rastlinskih virusov, ki se v okolju ali v rastlinah nahajajo v nizkih koncentracijah. Kot modelni virus bomo določali ToMV virus v namakalnih vodah.
- Ugotoviti, ali so ToMV virusi v namakalnih vodah infektivni in ali lahko povzročajo pojav bolezenskih znamenj pri gostiteljskih rastlinah.
- Določiti občutljivost kvantitativne metode qPCR za določanje ToMV in jo primerjati z občutljivostjo serološke, semikvantitativne metode DAS-ELISA.
- Razviti in optimizirati metodo, ki bo uspešno določala CSNV tospoviruse, za katere je dokazana serološka navzkrižna reaktivnost.
- Določiti nukleotidno zaporedje CSNV izolata z gerbere, določiti podobnost z objavljenim nukleotidnim zaporedjem.

1.2 HIPOTEZE

- S pomočjo razvite in optimizirane metode qPCR bomo uspeli določiti prisotnost in koncentracijo rastlinskih virusov (modelnega virusa ToMV) v namakalnih vodah iz okolja.
- Molekularna metoda qPCR, ki jo bomo razvili in optimizirali, bo bolj občutljiva od serološke metode DAS-ELISA, kar pomeni, da bomo z njeno uporabo uspeli določiti nižje koncentracije ToMV v vzorcih namakalne vode.
- Razvili in optimizirali bomo molekularno metodo PCR v realnem času, ki bo uspela razlikovati med serološko navzkrižno reaktivnimi Tospovirusi. Metoda bo uporabna za spremljanje koncentracij Tospovirusov v različnih delih rastline.
- Z določitvijo nukleotidnega zaporedja za nukleokapsidni gen CSNV virusa, ki je bil v Sloveniji najden na gerberi, bomo ugotovili podobnost tega izolata z že objavljenim zaporedjem CSNV s krizantem v Braziliji.

2 PREGLED OBJAV

2.1 Ekonomski pomen rastlinskih virusov

Rastlinski virusi lahko povzročijo znatne izgube pridelka in tako vplivajo na gospodarsko stanje na okuženem območju. Kadar so sejanci sladkorne pese okuženi z Virusom rumenenja pese (BYV – *Beet yellows virus*), je lahko proizvodnja sladkorja manjša tudi za 60 %, medtem ko je pri okužbi z Virusom blagega rumenenja pese (BMYV – *Beet mild yellows virus*) lahko manjša za 35 % (de Koeijer in van der Werf, 1999). Pridelek korenja se lahko občutno zmanjša, kadar so rastline okužene z Virusom korenja Y (CarVY – *Carrot virus Y*). Latham in Jones (2004) navajata, da je v letih 1998 in 1999 na dveh kmetijah v Avstraliji prišlo do občutnega zmanjšanja pridelka, ko je bilo okuženih od 65 do 99 % vseh rastlin korenja. Okužba je vplivala na pojav vozličavosti korenin. Ozkolistni volčji bob (*Lupinus angustifolius*) je po poročanju Thackray in sod. (2000) dovzeten za okužbo z Virusom mozaika kumar (CMV – *Cucumber mosaic virus*). Njegovo seme predstavlja primarni vir okužbe za ostale rastline, na katere ga s sejancev raznesejo uši. Izgube lahko predstavljajo tudi do 60 % vseh rastlin na območju. Virusne okužbe okrasnih rastlin lahko pomembno vplivajo na ekonomsko stanje celotne države. Španija je druga največja izvoznica nageljnov v EU, kjer je 1300 ha kmetijskih površin namenjenih izključno njihovemu pridelovanju. Okužbe z virusi, kot so Virus lisavosti nageljnov (CarMV – *Carnation mottle virus*), Virus obročkastih razjed nageljnov (CERV – *Carnation etched ring virus*), Virus lisavosti žil nageljnov (CVMV – *Carnation vein mottle virus*), Virus obročkaste pegavosti nageljnov (CRSV – *Carnation ringspot virus*), lahko povzročijo le blažji pojav bolezenskih znamenj. Kadar pa so bolj izrazita, lahko bistveno vplivajo na pridelek, saj lahko povzročijo odmiranje rastlin (Sánchez-Navarro in sod., 1999). Za azijske države imajo orhideje velik gospodarski pomen. Dovzetne so za okužbe z Virusi obročkaste pegavosti orhidej (ORSV – *Odontoglossum ringspot virus*) (Ryu in Park, 1995; Tan in sod., 2000) in Virusi mozaika orhidej (CymMV – *Cymbidium mosaic virus*) (Tan in sod., 2000), ki vplivajo na količino in kvaliteto proizvedenih rastlin. Ekonomski pomen pridelave orhidej izpostavljajo predvsem na Havajih, Tajske, v Singapurju (Tan in sod., 2000) in v Koreji (Ryu in Park, 1995).

Gosalves in sod. (2003) izpostavljajo pomembnost Virusa nekrotične pegavosti melon (MNSV – *Melon necrotic spot virus*), ki je po njihovih navedbah lahko odgovoren za velik upad v pridelku melon tako na poljih kot pri hidroponičnih kulturah. Po navedbah Stapleton in Summers (2002) pa je lahko pridelek melon v celoti uničen (popoln izpad pridelka), kadar so rastline *Cucumis melo* L. var. *Cantalupensis* cv. Primo okužene z virusi, ki jih prenašajo uši. Med take viruse sodijo CMV, Virus rumenega mozaika bučk (ZYMV – *Zucchini yellow mosaic virus*), Virus mozaika lubenic (WMV – *Watermelon mosaic virus*) in Virus mozaika buč (SqMV – *Squash mosaic virus*). Tudi jagode (*Fragaria* spp.) so občutljive na okužbo z različnimi virusi, ki jih prenašajo uši. Stirje najpomembnejši virusi, ki hkrati povzročajo tudi največjo škodo, so Virus zgubnosti jagod (SCV – *Strawberry crinklr virus*), Virus blagega rumenenja robov jagod (SMYEV – *Strawberry mild yellow edge virus*), Virus lisavosti jagod (SMoV – *Strawberry mottle virus*) in Virus progavosti žil jagod (SVBV – *Strawberry vein banding virus*), ki se večinoma pojavljajo v mešanih okužbah. Pri komercialnem gojenju jagod so ugotovili, da je zaradi okužb z enim od naštetih virusov pridelek manjši za 30 %; če pa so prisotne

mešane okužbe, lahko odstotek naraste tudi do 80 % (Thompson in sod., 2003). Jablane so ena izmed najbolj pomembnih kmetijskih rastlin v svetu. V primeru mešanih virusnih okužb z Virusom klorotične pegavosti listov jablan (ACLSV – *Apple chlorotic leaf spot virus*), Virusom razbrazdanja stebel jablan (ASGV – *Apple stem grooving virus*) in Virusom mozaika jablan (ApMV – *Apple mosaic virus*), se lahko pridelek jabolk zmanjša tudi do 60 % (Menzel in sod., 2002).

Pridelek se lahko zmanjša tudi zaradi okužb z viroidi. Tako so lahko rastline krompirja okužene z Viroidom vretenoidnosti krompirjevih gomoljev (PSTVd - *Potato spindle tuber viroid*) in takrat se lahko pridelek zmanjša tudi do 65 % (Shamloul in Hadidi, 1999; Boonham in sod., 2004).

2.2 Diagnostika rastlinskih virusov

Dejstvo, da so rastline okužene z virusi, in da se pri njih zato bolj ali manj izražajo bolezenska znamenja, ima torej globalni pomen in lahko močno vpliva na ekonomsko stanje nekaterih držav. Ne samo, da lahko pride do zmanjšanja pridelka, ampak je, kot poudarjajo Katoch in sod. (2003), pomemben nadzor nad rastlinskimi virusi tudi zaradi kontrole izvoza oziroma uvoza rastlin. Za nadzor nad stanjem okuženosti je nujen razvoj občutljivih in zanesljivih diagnostičnih metod, ki bodo specifično določale prisotnost virusov na rastlinah, bo pa z njimi tudi možno določati prisotnost virusov v okolju – zemlji in/ali namakalnih vodah, ki lahko predstavljajo vir okužbe.

Za diagnostiko virusov na splošno velja, da mora biti hitra, zanesljiva, natančna in čim hitrejša. Vsi našteti parametri so pomembni tako za humano in živalsko kot tudi za rastlinsko virologijo. Pri razvoju metod, ki bi ustrezale takim kriterijem, je treba upoštevati značilnosti patogenega mikroorganizma, katerega prisotnost želimo dokazovati.

V rastlinski virologiji je bilo do sedaj uporabljenih veliko različnih metod. Tako so za določanje rastlinskih virusov na voljo serološki testi, kot je na primer ELISA (Alexandre in sod., 1996; Horvath in sod., 1999; Verma in sod., 2003; Kramberger in sod., 2004). Protitelesa, ki se uporabljajo pri tej metodi, so uporabna tudi pri imunski elektronski mikroskopiji (ISEM), ki je uporabna za opazovanje specifičnih virusnih delcev (Piazzolla in sod., 1986; Katoch in sod., 2003; Verma in sod., 2003; Mehle in sod., 2004). Molekularno biološke metode temeljijo na določanju prisotnosti specifičnih virusnih nukleinskih kislin. Njihovo prisotnost je možno določati z različnimi načini hibridizacij, kjer se nukleinsko kislino rastlinskega virusa določi s specifično sondijo (Sánchez-Navarro in sod., 1999; Eiras in sod., 2001). Specifični odsek virusne nukleinske kisline lahko pomožujemo tudi v PCR reakciji. V primeru določanja prisotnosti RNA virusov, se najprej izvede reakcija obratnega prepisovanja (RT), nato pa še PCR reakcija. Razvoj RT-PCR za določanje prisotnosti rastlinskih virusov opisujejo številni avtorji, med drugim tudi Ryu in Park (1995) za določanje ORSV, Eiras in sod. (2001) ter Okuda in Hanada (2001) za univerzalno določanje Tospovirusov, Menzel in sod. (2002) za določanje štirih različnih virusov na jablanah, Letschert in sod. (2002) za ločevanje med serološko navzkrižno reaktivnimi Tospovirusi, Katoch in sod. (2003) za določanje različnih virusov na gladiolah, Thompson in sod. (2003) za določanje štirih virusov na jagodah, in Gosalves in sod. (2003)

za določanje MNSV v namakalnih vodah. Za določanje rastlinskih virusov so Boonham in sod. (2003a) razvili detekcijski sistem z uporabo mikromrež.

V zadnjem času avtorji poročajo o razvoju PCR v realnem času. Kadar gre za določanje RNA virusa, govorimo o RT-PCR v realnem času, saj je pred reakcijo PCR treba virusno RNA obratno prepisati. Na ta način lahko določamo Krompirjev virus Y (*PVY – Potato virus Y*) (Toplak in sod., 2004), Virus rumenega mozaika ječmena (*BYMV – Barley yellow mosaic virus*) in Virus blagega mozaika ječmena (*BMMV – Barley mild mosaic virus*) (Mumford in sod., 2004), Virus pegavosti in uvelosti paradižnika (*TSVV – Tomato spotted wilt virus*) (Boonham in sod., 2002) in druge RNA viruse. V primeru DNA rastlinskih virusov, kot je Virus mozaika cvetače (*CaMV – Cauliflower mosaic virus*), RT korak ni potreben, zato lahko reakcijo PCR v realnem času izvedemo kar neposredno iz izolirane DNA (Cankar in sod., 2005). V vseh primerih se je izkazalo, da ima ta metoda velike prednosti pri specifičnem določanju rastlinskih virusov in je zato zelo uporabna v diagnostiki rastlinskih virusov.

Infektivnost rastlinskih virusov se določa z uporabo testnih rastlin, ki specifično reagirajo na posamezni virus. Za namnoževanje in osamitev (izolacijo) posameznih virusov v mešanih okužbah predstavljajo testne rastline edino možnost.

2.3 Virusi v vodah

2.3.1 Rastlinski virusi v vodah

Prehod virusov iz namakalne vode na rastline je podrobnejše opisala Koenig (1986), ki je ugotovila, da so rastline sposobne sprejeti virusne delce preko koreninskega sistema brez pomoči dodatnih prenašalcev, kot so žuželke in nematodi. Tudi semena se lahko okužijo z namakalno vodo, vendar je pri njih vredno poudariti, da je okužba večja, kadar je seme poškodovano (npr. počeno) ali pa, ko že kali. V vodo virusi preidejo preko zemlje, v kateri so rasle okužene rastline, z glivnimi sporami ali pa se vanjo sproščajo preko koreninskega sistema okuženih rastlin. Korenine torej virusnih delcev ne le sprejemajo, marveč jih tudi oddajajo in prenašajo (Koenig, 1986).

O pregledu namakalnih voda v Italiji so poročali Piazzolla in sod. (1986). Preverjali so prisotnost rastlinskih virusov v štirih italijanskih rekah. Vzorce so koncentrirali s centrifugiranjem in mehansko inokulirali testne rastline s ponovno suspendirano usedlino. Te so nato pregledali z ISEM elektronsko mikroskopijo in ugotovili, da so bili v vzorcih prisotni TMV (Virus mozaika tobaka – *Tobacco mosaic virus*), CMV (Virus mozaika kumar – *Cucumber mosaic virus*) in še dva, morfološko različna si virusa, ki ju niso mogli natančneje določiti s pomočjo testnih rastlin. Podobno študijo prisotnosti rastlinskih virusov v namakalnih vodah na Madžarskem so izpeljali Horvath in sod. (1999). V 47 odvetih vzorcih so ugotovili prisotnost 17 različnih virusov. Določili so jih s serološko metodo ELISA in s testi infektivnosti na različnih testnih rastlinah (biotični testi). Tudi oni so pred serološko analizo in pred mehansko inokulacijo testnih rastlin skoncentrirali vzorce vode, za kar so uporabili metodo z ultracentrifugiranjem. Metode za detekcijo virusov so se v naslednjih letih razvijale in tako o določanju rastlinskih virusov z novejšo, molekularno-biološko metodo, v namakalnih vodah poročajo Gosalves in sod. (2003). Ugotovili so, da je okužba melon večja, kadar te hidroponično gojijo. Razlog za to je prenos MNSV z zoosporami glive *Olpidium bornovanus*. Ker je za MNSV značilna visoka obstojnost v

zemlji, je namakalna voda tudi dober vir okužbe za rastline. Razvili so molekularno metodo (RT-PCR) za določanje MNSV tako v rastlinah kot tudi v namakalni vodi. V slednji je njihov način določanja virusa temeljal na predhodnem koncentriranju vodnega vzorca, ki so ga izvedli z ultracentrifugiranjem in precipitacijo v polietilenglikolu (PEG), čemur je sledila analiza.

Poleg rastlinskih virusov so v vodi dokazali tudi prisotnost bakteriofagov (Stopar in sod., 2004) in različne humane viruse, ki so opisani v naslednji točki.

2.3.2 Razvoj občutljivih metod za določanje humanih virusov v vodah

Do danes je bilo torej možno določiti prisotnost rastlinskih virusov v namakalnih vodah z uporabo seroloških metod, boitičnih testov ali pa RT-PCR. Predvsem na področju humane virologije je prišlo do razvoja še drugih, bolj občutljivih molekularnih metod (na primer verižna reakcija s polimerazo v realnem času). Tudi za humane viruse namreč velja, da je voda primeren medij za njihovo širjenje in da lahko predstavlja rezervoar za nadaljnje izbruhe bolezni.

Enterovirusi, kot so poliovirusi, ehowirusi, astrovirusi in rotavirusi, se lahko nahajajo v sladkovodnih vodah tudi več dni, ravno tako pa so jih našli tudi v podtalnici in vodovodni vodi (Rzezutka in Cook, 2004). Posebno pozornost so Fijan in sod. (2006) posvetili detekciji RNA rotavirusov v odplakah iz bolnišničnih pralnic. Ugotovili so, da razmere v pralnicah niso primerne za odstranitev virusne RNA, ki so jo zaznali v odplakah kljub uporabi različnih kemičnih sredstev ob pranju. Pusch in sod. (2005) so določali prisotnost enterovirusov in bakterij v različnih virih površinskih voda v Nemčiji. S klasično metodo PCR so ugotovili, da je količina virusov, ki jo določijo z uporabljenou metodo, odvisna od mesta vzorčenja in tipa vzorčene vode. Ob določanju virusov v izhodnih vodah iz čistilnih naprav, so pokazali tudi, da koncentracije virusov le počasi upadajo z razdaljo od čistilne naprave.

Metodo PCR so uporabili za določanje prisotnosti enterovirusov v južni Franciji, kjer so preiskovali odpadne vode, komunalne odplake in vodo v območjih javnih kopališč. Ugotovili so, da je njihova metoda uporabna za izvajanje pregleda stanja voda in da je dokaj občutljiva. Iz 50 µl vode so izolirali RNA, jo obratno prepisali in pomnožili v PCR reakciji. Sledila je nested-PCR reakcija in analiza produktov na agaroznem gelu. Za potrjevanje rezultatov so uporabili metodo hibridizacije v tekoči fazi s sondami, označenimi z biotinom (Schvoerer in sod., 2000). Wetz in sod. (2004) so v in-vitro študiji obstojnosti enterovirusov v morski vodi ugotovili, da je metoda detekcije direktno z uporabo RT-PCR uporabna takrat, kadar so v vodi prisotni visoki titri virusov. Ti so pokazatelj zdravstvene oporečnosti take vode. Zanimiv način reševanja občutljivosti detekcije enterovirusov z RT-PCR opisujejo Sano in sod. (2003), ki so razvili posebno metodo za odstranjevanje inhibitornih snovi iz odplak, s čimer so kasneje izboljšali detekcijo enterovirusov. Gre za encimsko odstranjevanje nečistoč iz odplak oziroma encimatsko elucijo virusov (EVE – enzymatic virus elution), ki deluje tako, da v odplake dodajo lizocim, papain in kimotripsin. Ti encimi razgradijo organski matriks v odplaki, razgradni produkti se usedejo na dno vzorčevalne posode, virusi pa ostanejo na vrhu v vodi. Na ta način so za 31 % povečali občutljivost RT-PCR. Kljub temu Parshionikar in

sod. (2004) navajajo, da nobena od metod, ki jih uporabljajo za odstranjevanje inhibitorjev, ne deluje popolnoma, zato so razvili interne kontrole za več različnih enteropatogenih virusov. Uspešno so delovale, saj so ločevale negativne od lažno negativnih vzorcev (Parshionikar in sod., 2004). Občutljivost RT-PCR v primeru enterovirusov so izboljšali tudi Forminga-Cruz in sod. (2005). Metodo so »nadgradili« z uvedbo dodatne, nested-PCR reakcije, in test izboljšali tako, da je možno določati več virusov (adenoviruse, enteroviruse in *Hepatitis A*) hkrati (multipleks nested RT-PCR) v vzorcih školjk in zelo majhnem volumnu odplak. Za adenoviruse je po njihovi metodi meja detekcije 1 kopija na PCR reakcijo, za enteroviruse in *Hepatitis A* pa 10 kopij na PCR reakcijo.

Vivier in sod. (2004) so opravili študijo prisotnosti enterovirusov v pitni vodi. Študija je trajala eno leto, za spremjanje prisotnosti virusov pa so razvili metodo, ki jim je omogočala hkratno določanje in tipizacijo enterovirusov v večjem volumnu vode. Vzorce vode so najprej filtrirali, nato pa so jih koncentrirali s PEG. Po izolaciji RNA so vzorce analizirali s kombinacijo metode molekularne detekcije z nested-PCR-RFLP in testov patogenosti na celičnih kulturah. Ugotovili so, da se v pitni vodi iz dveh virov v 11% oziroma 16 % nahajajo predvsem *Coxsaecki B* virusi. Drugačen postopek za koncentriranje so na primeru vzorcev morske vode, ki so jih želeli analizirati na prisotnost enteropatogenih virusov, opisali Katayama in sod. (2002). Uporabili so membrane z negativnimi naboji in nadaljnje določanje poliovirusov v vzorcu izboljšali od 33% do 95%. Uporabo nitroceluloznih membran za adsorpcijo enterovirusov so na vzorcih vode iz vodarn (mesto, kjer tretirajo pitno vodo in jo razdeljujejo v vodovodno omrežje) opisali Ali in sod. (2004). Vodo so prefiltirali preko teh membran, jih sprali v 1,5 % govejem ekstraktu (ang. »beef extract«) in nato ponovno skoncentrirali s PEG.

Detekcija in kvantifikacija enteričnih virusov, pomembnih povzročiteljev diareje, je možna z metodo qPCR, ki jo opisujejo Monpoeho in sod. (2000). Razvili so jo za določanje enteričnih virusov v odplakah, kjer so kasneje Le Cann in sod. (2004) s svojo metodo določali tudi prisotnost astrovirusov. Slednji so povzročitelji akutne diareje pri otrocih, zato je nujna zanesljiva metoda za odkrivanje njihove prisotnosti. Vsi avtorji so pred analizo vzorce odplak koncentrirali z ultracentrifugiranjem, medtem ko so Monpoeho in sod. (2000) uporabljali še dodatno precipitacijo s PEG. Slednji avtorji lahko z razvito metodo določijo do 5 kopij virusne RNA na 10 g posušenih odplak, medtem ko lahko Le Cann in sod. (2004) določijo do 1×10^4 genomov astrovirusov na 100 ml odplake. O razvoju dodatne metode PCR v realnem času, kjer gre za detekcijo norovirusov na splošno in ne le v vodi, poroča Beuret (2004). Razvili so protokol, s katerim lahko hkrati, v multipleks reakciji PCR v realnem času, določajo noroviruse (Norwalk-like virus) iz genske skupine I in II. Prednost njihove metode je v tem, da skrajša čas, ki je potreben za identifikacijo povzročitelja bolezni.

2.3.3 Razvoj občutljivih metod za določanje patogenih protozojev in bakterij v vodah

Razvoj občutljivih metod za določanje patogenih mikroorganizmov v vodah je potekal tudi za druge patogene mikroorganizme. Tako uporabljajo PCR v realnem času tudi za določanje protozojev (*Cryptosporidium parvum*) (Fontaine in Guillot, 2002; Fontaine in Guillot, 2003) ter bakterij *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Rodríguez-Lázaro in sod., 2005) in *Helicobacter pylori* (McDaniels in sod., 2005).

Metodo določanja koncentracij oocist *Cryptosporidium parvum* so najprej razvili na standardu: komercialno dostopne oociste so redčili v vodi in določili občutljivost metode. DNA so iz spor sproščali s temperaturno denaturacijo in dodatkom chelexa (reagent, ki denaturira oociste). Občutljivost tega testa je bila med $6,6 \times 10^6$ oocist /PCR reakcijo do 5 oocist / PCR reakcijo (Fontaine in Guillot, 2002). Postopek so kasneje prilagodili za določanje oocist v različnih vodnih virih (reke in vodovodna voda) (Fontaine in Guillot, 2003). Vodo so najprej prefiltrirali, sprali oociste s posebnim elucijskim pufom, jih dodatno skoncentrirali s centrifugiranjem in ponovno suspendirali v destilirani vodi. Sledil je postopek imunomagnetenega ločevanja (IMS – »immunomagnetic separation«), kjer so uporabili temu namenjen, komercialno dostopen komplet. Z denaturacijo so sprostili DNA in jo pomnožili v reakciji PCR v realnem času. Tako prilagojen postopek za analizo vod iz okolja je imel občutljivost do 5 oocist / PCR reakcijo. Pri tem je potrebno omeniti, da so za PCR v realnem času uporabili celoten volumen DNA iz prečiščenih oocist, ki so jih dobili po opisanem postopku z IMS. Začetni volumni vode so bili med 20 in 100 l (Fontaine in Guillot, 2003).

Nizke koncentracije bakterij *Helicobacter pylori* v vodi so določali s qPCR (kvantitativni PCR v realnem času) tako, da so vzorce vode predhodno filtrirali preko polikarbonatnih filtrov, iz katerih so kasneje izolirali DNA in jo pomnožili v specifični qPCR reakciji. Obenem so s pretočno citometrijo izmerili točno število bakterijskih celic, ki so se zadržale na filtru in tako ovrednotili občutljivost qPCR metode. Ugotovili so, da lahko z metodo qPCR s 95 % stopnjo zaupanja določijo približno 40 celic na ekstrakt enega filtra, kar v njihovem primeru v povprečju znaša 1 bakterijsko celico na qPCR reakcijo (McDaniels in sod., 2005). V primeru razvoja qPCR metode za določanje in kvantifikacijo *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) so v vzorce pitne vode dodajali različno število bakterijskih celic. Pri določanju števila dodanih celic so si pomagali s hemocitometrom. Za izvedbo analize so vzorce vode centrifugirali, usedlino ponovno suspendirali v 1 ml PBS pufra, čemur je sledilo ponovno centrifugiranje in suspendiranje usedline v še manjšem volumnu PBS pufra – 100 µl. Od tega so 2 µl analizirali v qPCR reakciji. Metoda je z 99 % verjetnostjo zaznala manj kot 3 kopije genomske DNA MAP (Rodríguez-Lázaro in sod., 2005).

2.4 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času

Klasična RT-PCR metoda spada med najbolj občutljive diagnostične metode, vendar je vprašljiva njena uporaba v primerih določanja količin oziroma koncentracije tarčne molekule. Tarčne molekule so lahko deli genoma mikroorganizmov kot tudi mRNA, RNA ali DNA molekule različnih izvorov (Bustin, 2000; Niesters, 2002; Peters in sod., 2004). RT-PCR spada po navedbah Bustin (2000) med kompleksne metode, kjer se lahko pojavi več problemov: od vprašljive občutljivosti metode, do njene ponovljivosti in specifičnosti.

Specifično in ponovljivo nadgradnjo osnovne metode RT-PCR, ki pa je uporabna tudi za kvantifikacijo obratno prepisane RNA ali mRNA predstavlja RT-PCR v realnem času (Peters in sod., 2004). Njena prednost je tudi v tem, da ni potrebna končna analiza pomnoženih PCR produktov, kajti njihovo nastajanje se spremlja med samim potekom reakcije. S tem je manjša možnost za pojav kontaminacij po poteku PCR reakcije, do

katerih lahko prihaja, kadar analiziramo končne produkte na agaroznih ali poliakrilamidnih gelih (Freeman in sod., 1999).

Detekcija pomnoženih produktov je z uporabo PCR v realnem času olajšana, zato je njena uporaba čedalje pogostejša:

- na področju molekularne diagnostike:
 - za določanje in kvantificiranje nukleinskih kislin živih ali mrtvih patogenih mikroorganizmov,
 - kvantifikacija izražanja različnih genov (Pompe Novak in sod., 2006)
- na področju klinične onkologije,
- na področju klinične mikrobiologije (Klein, 2002).

K slednji spada tudi klinična virologija, kjer gre za razvoje tako kvalitativnih kot kvantitativnih testov (Niesters, 2002).

Princip metode PCR v realnem času temelji na detekciji pomnoževanega odseka nukleinske kisline med samo verižno reakcijo s polimerazo. Pri TaqMan kemiji gre za izkoriščanje $5' \rightarrow 3'$ eksonukleazne aktivnosti encima *Taq* polimeraze, ki se v PCR reakciji uporablja za pomnoževanje odsekov nukleinske kisline. To pomeni, da polimeraza lahko razgrajuje eno verigo nukleinske kisline, medtem ko pomnožuje drugo verigo. TaqMan kemija temelji tudi na uporabi sond, ki so tako na 5' kot na 3' koncu označene s fluorescentnimi barvili. Molekula na 5' koncu je poročevelska molekula (ang. »reporter«) (npr. 6-karboksifluorescein: FAM), molekula na 3' koncu pa je dušilec (ang. »quencher«) (npr. 6-karboksi-terta-metilrodamin: TAMRA). Do oddajanja fluorescentnega signala poročevelske molekule po principu FRET (prenos energije s fluorescentno resonanco, oziroma ang. »fluorescence resonance energy transfer«), pride med fazo podaljševanja verige DNA s strani *Taq* polimeraze, ki hkrati cepi sondu zaradi svoje eksonuklezne aktivnosti. Medtem se oddaljita molekuli poročevelca in dušilca. Večja razdalja med temo dvema molekulama pomeni, da ne prihaja več do prenosa energije s poročevelca na dušilec in zato detektorji zaznajo fluorescentni signal poročevelske molekule (Morrison, 1999; Giulietti in sod., 2001). Do oddajanja fluorescence pri FAM molekuli prihaja, na primer, pri 518 nm. Detekcija fluorescentnega signala se izvrši v vsakem ciklu PCR reakcije, nanjo pa ne vpliva kopiranje PCR produktov. Fluorescencija je direktna posledica pomnoževanja tarčne molekule. Računalniški program preračuna spremembo v signalu fluorescence, oziroma ΔRn . Pri tem velja, da je $\Delta Rn = Rn^+ - Rn^-$, kjer je Rn^+ fluorescencija produkta v kateri koli časovni točki med pomnoževanjem, Rn^- pa fluorescencija bazne linije (neke vrste ozadje) (Giulietti in sod., 2001). ΔRn vrednost je tudi merilo za razgrajenost sonde. S pomočjo računalniškega programa, ki se uporablja tudi za izvedbo PCR v realnem času (npr. SDS 2.1 računalniški program pri izvedbi PCR v realnem času na aparaturi ABI Prism7900HT proizvajalca Applied Biosystems, ZDA), se narišejo diagrami, kjer gre za prikaz odvisnosti ΔRn od števila ciklov reakcije. Pri zgodnjih ciklih signal fluorescence poročevelske molekule ne preseže praga. Slednji je ponavadi definiran kot desetkratna vrednost standardne deviacije bazne linije med 3. in 15. cikлом. Točka, kjer pride do dviga signala fluorescence poročevelske molekule nad vrednostjo praga, predstavlja Ct vrednost.

Ta se izraža v številu ciklov, ki so bili potrebni za dvig signala fluorescence nad prag. Ct vrednosti linearno padajo, kadar je količina tarčne molekule v reakciji večja (Giulietti in sod., 2001). Metoda PCR v realnem času se razlikuje od klasične PCR metode torej v tem, da je od začetnega števila kopij tarčnega zaporedja (nukleinske kisline) odvisno, koliko ciklov PCR reakcije bo potrebnih, da bo prišlo do rezultata – t.j. pojava signala poročevalske molekule. Več kopij tarčnega zaporedja pomeni manjše število ciklov (vrednost Ct) za pojav fluorescence (Walker, 2002).

Poleg zgoraj opisanega principa detekcije s TaqMan kemijo, kjer gre za razgradnjo sond s pomočjo *Taq* polimeraze, obstajajo tudi drugačni principi oziroma kemije za detekcijo nastajanja produktov med PCR v realnem času.

Tako gre lahko za detekcijo z uporabo molekularnih svetil (ang. »molecular beacons«). Ta imajo posebno strukturo stebla in zanke (ang. »stem and loop«), ki se tvori iz enoverižne molekule DNA. Do dušenja fluorescence poročevalske molekule pride zaradi strukture molekule, ki je podobna šivanki in ki zbližuje molekuli poročevalca in dušilca, kar vodi do pojava FRET. Sonde, ki niso vezane na tarčno zaporedje, tako ne oddajajo signala poročevalske molekule. Ob vezavi sonde na tarčno zaporedje pride do konformacijske spremembe in molekuli poročevalca in dušilca se toliko oddaljijo, da pojav FRET ni več prisoten (Giulietti in sod., 2001; Mackay in sod, 2002).

Naslednji način detekcije je lahko s pomočjo škorpijonskih začetnih oligonukleotidov (ang. »scorpion primers«). Tukaj gre za kombinacijo dveh začetnih oligonukleotidov, kjer je eden klasičen, drugi pa ima tako vlogo začetnega oligonukleotida kot sonde. Na začetku začetna oligonukleotida tvorita dupleks, kjer gre za vezavo klasičnega začetnega oligonukleotida s sondo (na drugem začetnem oligonukleotidu). Oblikuje se struktura zanke, ki povzroči zbližanje molekul poročevalca in dušilca in tako ne prihaja do oddajanja fluorescence poročevalske molekule. To se zgodi takoj, ko se začetni oligonukleotid in sonda vežeta na tarčno zaporedje. V primerjavi s prej opisanimi molekularnimi svetili so škorpijonski začetni oligonukleotidi hitrejši pri vezavi, oddani signal fluorescence pa je močnejši (Giulietti in sod., 2001; Mackay in sod, 2002).

Pri detekciji s pomočjo hibridizacijskih sond se uporablja sistem štirih oligonukleotidov, in sicer dveh začetnih oligonukleotidov in dveh sond. Vsaka sonda je označena le z enim barvilm – ena z donorskim in druga z akceptorskim barvilm. Zaporedje sond je izbrano tako, da s tarčnim zaporedjem hibridizirata tako, da sta sondi obrnjeni v smeri »glava proti repu« (ang. »head-to-tail«). To spravi obe barvili v bližino in pride do oddajanja fluorescence (Giulietti in sod., 2001).

Nastajanje produktov med reakcijo PCR v realnem času lahko določamo tudi s pomočjo interkalirajočih barvil. Ta sama po sebi ne oddajajo fluorescene, se pa lahko vgradijo v strukturo nukleinske kisline (pomnožen produkt PCR reakcije) in nato oddajo signal. Eno takih barvil je SYBR Green I (asimetrično cianinsko barvilo). Njegov signal po vgraditvi v dvojerižno strukturo DNA je nespecifičen, kar pomeni, da se lahko vgradi tudi med dimere začetnih oligonukleotidov, če le-ti nastajajo. Po poteku PCR reakcije je treba narediti še analizo talilnih krivulj nastalih dvojerižnih molekul DNA (ang. »melting curve analysis«) (Giulietti in sod., 2001; Vandesompele in sod., 2002). Po priporočilih Vandesompele in

sod. (2002) je za potek PCR reakcije s čim manjšim številom nespecifičnih produktov treba z DNazo dobro očistititi RNA, ki jo želimo pomnoževati v RT-PCR v realnem času.

Kombinacijo obeh načinov detekcije predstavljajo svetleče sonde (ang. »light-up probes«). Specifične so za del tarčnega nukleotidnega zaporedja, vezano pa imajo asimetrično cianinsko barvilo. Ob vezavi sonde na tarčno zaporedje barvilo zasveti. Sonde imajo vezano le eno poročevalsko barvilo in na tarčno zaporedje se vežejo le v fazi naleganja začetnih oligonkleotidov. V fazi pomnoževanja, torej ko se spremeni temperatura v PCR reakciji, disociira in ne posega v proces pomnoževanja, kot je to pri TaqMan sondah (Svanvik in sod., 2000).

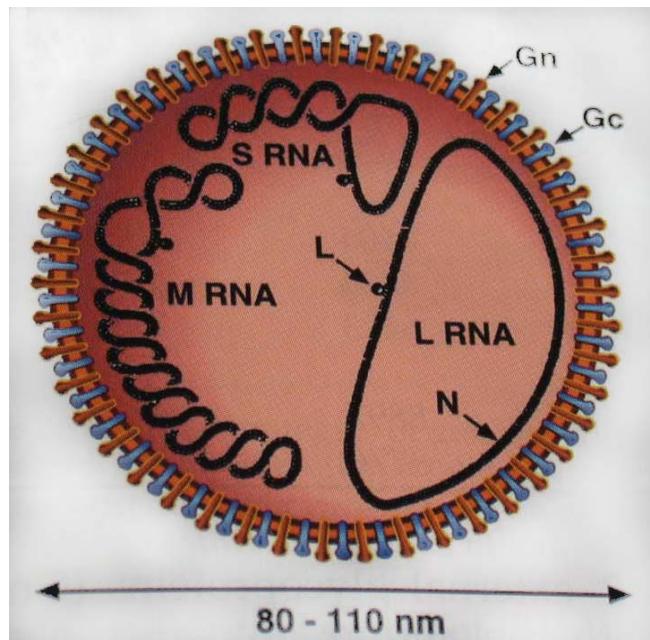
2.5 Modelni virusi

2.5.1 Virus mozaika paradižnika (ToMV)

Virus mozaika paradižnika, oziroma angleško »Tomato mosaic virus« je rastlinski virus, ki se med rastlinami ne prenaša z vektorji. Spada v rod *Tobamovirus*, tako kot njemu zelo podoben Virus mozaika tobaka (TMV). Virusni delci so paličasti, brez ovojnice in ponavadi ravni. Veliki so okoli 300 nm in široki 18 nm, s 4 nm širokim kanalčkom na osi delca. 5 % delca predstavlja nukleinska kislina, 95 % delca pa predstavljajo plaščni proteini (Huttinga in Rast, 1985). Teža enega virusnega delca je okoli 40×10^6 Da (Caspar, 1963). Do prenosa virusov lahko prihaja z mehansko inokulacijo, s cepljenjem okuženih rastlin na zdrave in obratno, s stikom med okuženimi in zdravimi rastlinami ter s semenom. Kar 94 % semen paradižnika naj bi bilo okuženih s tem virusom. Po navedbah iz literature, je virus prisoten skoraj povsod v okolju in povsod po svetu (Huttinga in Rast, 1986). RNA ToMV virusov so našli celo v starih plasteh ledu z ledenikov z Grenlandije (Castello in sod., 1999). Leschert in sod. (2002) so poročali o serološki navzkrižni reaktivnosti med TMV in ToMV virusoma, zato so razvili občutljivejšo RT-PCR-RFLP metodo za nukleotidno zaporedje za virusni plaščni protein, ki je uspešno ločevala med njima. Kramberger in sod. (2004) pa so uporabili ToMV za preverjanje postopka koncentriranja virusnih delcev s CIM® monolitnimi kromatografskimi nosilci. Za diagnostiko so razvili tudi semikvantitativno metodo DAS-ELISA.

2.5.2 Virus nekroze stebel krizantem (CSNV)

Virus nekroze stebel krizantem po vseh svojih lastnostih spada med tospoviruse, kamor pa uradno še ni bil razvrščen. Ni torej še uradna vrsta v omenjenem rodu, pač pa je kandidat zanjo (Fauquet in sod., 2005). Tospovirusi spadajo v družino *Bunyaviridae*, tipski sev pa je TSWV. Prenašajo se z resarji in s sadilnim materialom. Najpogosteje povzročajo nekroze na listih, včasih pa tudi na steblih in cvetovih (Fauquet in sod., 2005). Virus se v resarjih ne prenaša s populacije staršev na potomce. Med rastlinami se lahko prenaša z mehansko inokulacijo ali s cepljenjem, kar se navadno dogaja pri postopkih gojenja sadilnega materiala. Ne prenašajo se s stikom med okuženimi in zdravimi rastlinami, kot tudi ne s semenom ali pelodom (Gibbs, 1990). Tudi za viruse tega rodu se predvideva, da so razširjeni povsod po svetu. Virusni delci so izometrični in imajo ovojnico. V premeru so veliki 85 nm in imajo zaokrožen profil. Delci vsebujejo 5 % nukleinske kisline, 70 % proteinov, 20 % lipidov in 5 % ogljikovih hidratov. Njihov genom predstavlja enoverižna, linearna RNA molekula, ki je tripartitna, deli pa se med seboj ločijo po velikosti (L-, M- in S-RNA) (slika 1). L-RNA je protismiselna, medtem ko sta M- in S-RNA obe orientacij (ang. »ambisense«) hkrati (Mumford in sod., 1996). TSWV ima širok spekter gostiteljskih rastlin, tako kot tudi sorodni INSV, ki se nahaja na različnih okrasnih rastlinah, na primer na vodenkah (*Impatiens*), anemonah (*Anemone*), gladiolah (*Gladiolus*), begonijah (*Begonia*) in ostalih (Gibbs, 1990; Brunt, 1995). CSNV so prvič odkrili v Braziliji na krizantemah (Bezerra in sod., 1999), kasneje pa so ga v Evropi odkrili še na Nizozemskem (Verhoeven in sod., 1996) in v Veliki Britaniji (Mumford in sod., 2003). V Sloveniji je bil odkrit na krizantemah (Ravnikar in sod., 2003; Pirc, 2003) in kasneje še na enem vzorcu gerbere (neobjavljeno).



Slika 1 Shematični prikaz virusnega delca iz družine *Bunyaviridae* (Fauquet in sod., 2005).

G_n in G_c predstavljata dva različna površinska glikoproteina v virusni ovojnici; S, M in L RNA predstavljajo tri različno velike molekule RNA. Vsaka molekula je ločeno obdana z nukleokapsidno ovojnico, ki jo sestavlja protein N, povezane pa so s proteinom L.

Figure 1: Schematic representation of a bunyavirus virion (Fauquet *et al.*, 2005)

Na večini testnih rastlin se razvijejo zelo podobna bolezenska znamenja ob okužbi s CSNV ali TSWV. *Datura stramonium* naj bi pokazala še najbolj očitne razlike med obema virusoma, saj le okužba s CSNV pri njej povzroči pojav nekroze stebel, *Physalis floridana* pa ob okužbi s TSWV razvije pojav sistemskih bolezenskih znamenj (bolezenska znamenja, ki se pojavijo po celi rastlini in niso omejena le na inokulirane liste), ki se ob okužbi s CSNV ne pojavijo (Verhoeven in sod., 1996). Bolezenska znamenja virusa CSNV na gostiteljskih okrasnih rastlinah so podobna tistim, ki jih povzroča TSWV in vključujejo pojav blagih ali hujših nekroz na steblu, venenje listov in stebel ter pojav kloritičnih in/ali nekrotičnih peg in obročkov na nekaterih listih (Verhoeven in sod., 1996; Bezzera in sod., 1999). Po navedbah Verhoeven in sod. (1996) in Bezzera in sod. (1999) pa se virusa med seboj ločita po jakosti bolezenskih znamenj, ki se izražajo na krizantemah. Tam so pri okužbi s CSNV zasledili izrazitejša bolezenska znamenja, kot so rjavi ali črni pasovi na steblih ali pa celo popolno nekrozo nekaterih delov stebla, katere posledica je bilo venenje delov rastline (Verhoeven in sod., 1996).

Ker je ločevanje med omenjenima virusoma CSNV in TSWV glede na bolezenska znamenja nezanesljivo oziroma lahko celo nemogoče, so opisane dodatne analize s serološkimi testi (Verhoeven in sod., 1996), za katere pa so Ravnikar in sod. (2003) ugotovili, da so tudi nezanesljivi in da prihaja do navzkrižne reaktivnosti protiteles. Pirc (2003) je opisala RT-PCR postopek, ki specifično določa CSNV virus.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 RAZVOJ DETEKCIJE IN KVANTIFIKACIJE ToMV S KVANTITATIVNIM PCR V REALNEM ČASU (qPCR)

3.1.1 RASTLINSKI MATERIAL IN VZORCI ZA ANALIZO

- Za razvoj metode smo uporabili očiščene virusne delce ToMV-D (Dahlmense), ki smo jih pripravili sami po spodaj opisanem postopku (točka 3.1.2). Koncentracija delcev v vzorcu, ki smo ga uporabili v vseh korakih razvoja kvantitativne metode je bila 0,42 mg/ml.
- Analizirali smo 6 vzorcev namakalne vode, ki smo jo vzorčili na različnih lokacijah po Sloveniji v letih 2004 in 2005:
 - 5 l namakalne vode iz vodnega zbiralnika v Presečnem, uporabljene za namakanje v rastlinjaku, kjer je bila potrjena okužba s ToMV; vzorčena jeseni 2004,
 - 5 l vode iz reke Drave, vzorčene jeseni 2004,
 - 3 l vode iz reke Gradaščice, vzorčene v zimi 2004/2005,
 - dvakrat po 5 l vode iz reke Krke; enkrat vzorčene jeseni 2004, drugič pa jeseni 2005,
 - 5 l vode iz gramoznice v Ivancih. Gramoznica je v bližini polij, v njej se zbira namakalna voda. Vzorčena je bila jeseni 2005.
- Analizirali smo vzorec prsti, odvzete v rastlinjaku v Presečnem, kjer je bila potrjena okužba s ToMV. Vzorčili smo jo jeseni 2004.
- Za preverjanje infektivnosti ToMV delcev smo uporabili testne rastline *Nicotiana glutinosa* in propagacijske rastline *Nicotiana clevelandii*.

3.1.2 Priprava očiščenih virusnih delcev

3.1.2.1 Uporabljeni sev virusa

V vseh poskusih na Virusu mozaika paradižnika smo uporabljali ToMV-D (Dahlmense) sev. S ToMV-D okužen liofiliziran rastlinski material z *Nicotiana clevelandii* smo prejeli od dr. Renee van der Vlugt-a, Plant Research International, Wageningen, Nizozemska.

3.1.2.2 Mehanska inokulacija propagacijskih rastlin

Posejali smo testne rastline *N. clevelandii* in jih čez približno 14 dni presadili v večje lončke s substratom Fruhstorfer Erde® (Archut, Nemčija). Ko so rastline razvile 4-6 listov, smo tri spodnje liste pri vsaki rastlini posuli s karborundom. Liofilizirani, okuženi rastlinski material smo redčili 1:10 v fosfatnem pufru za mehansko inokulacijo. Pufer smo pripravili iz 6,5 ml raztopine A (0,2 M NaH₂PO₄ × H₂O, pH 4,3), 43,5 ml raztopine B (0,2 M Na₂HPO₄ × 12H₂O, pH 9,0) in 1 g PVP 10000, pri čemer smo dobili 50 ml 0,02 M fosfatnega pufra s pH 7,6. S tako pripravljenim rastlinskim materialom smo s karborundom posute liste premazali in po 15 min inkubaciji sprali z vodovodno vodo.

Rastline smo vzgajali v rastni komori pri temperaturi 20 ± 2 °C v času osvetljevanja in 18 ± 2 °C v času teme. Osvetljevali smo jih z žarnicami Osram L36/W77, ki imajo gostoto pretoka fotonov 120 - 150 µmol m⁻²s⁻¹ in fotoperiodo 16 ur svetlobe in 8 ur teme. Relativna zračna vlaga v komori je bila 75 ± 2 %. Rastline smo zalivali z vodovodno vodo.

4-5 tednov kasneje so se na rastlinah pokazala bolezenska znamenja. Takrat smo pobrali zelene (ne nekrotične) liste rastlin in jih shranili na -20 °C do postopka čiščenja virusnih delcev iz okuženega materiala.

3.1.2.3 Čiščenje virusnih delcev

Čiščenje virusnih delcev iz okuženega rastlinskega materiala *N. clevelandii* smo izvedli po protokolu, ki ga opisujejo Kramberger in sod. (2004):

- 30 g listov smo zmleli v tekočem dušiku ter prahu dodali 60 ml FC pufra (fosfat – citronska kislina, pH 7,0 – preglednica 1) in 30 ml kloroformu.

Preglednica 1: Sestava FC pufra.

Podane so količine za 1 l pufra. Krepko označene količine so pufru dodane le v prvi fazi, kjer centrifugiramo zmlet rastlinski material s pufrom. V vseh nadaljnjih korakih uporabljamo pufer brez dodatkov.

Table 1: Contents of FC buffer.

Kemikalija	Količina
Dinatrijev hidrogenfosfat hidrat (Na ₂ HPO ₄ × H ₂ O)	29,4 g
Sol citronske kisline (C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃)	3,6 g
2-merkatptoetanol (C₂H₆OS)	0,1%
Natrijev dietilditiokarbamat trihidrat (Na-DIECA) (C₅H₁₀NNaS₂ × 3H₂O)	0,2%

- Homogenat smo centrifugirali 10 minut pri 10000 g v 250 ml centrifugirkah na centrifugi Beckmann.
- Odvzeli smo supernatant, mu dodali 5% PEG 6000 in mešali 30 min pri 4 °C. Sledilo je 10 min centrifugiranje pri 10000 g. Usedlino smo ponovno suspendirali v 3 ml FC pufra brez 2-merkaptoetanola in Na-DIECA in stresali pri 4 °C čez noč.
- Naslednji dan smo homogenat centrifugirali 10 min pri 10000 g in supernatant prestavili v svežo epico na ledu.
- Posebej smo pripravili linearni saharozni gradient (10-40% w/v) v pufru brez 2-merkaptoetanola in Na-DIECA. Na 36 ml gradiента smo nanesli 2 ml virusnega supernatanta in centrifugirali na ultracentrifugi Centrikon T-2070 (Kontron, Švica) 2,5 h pri 22000 rpm.
- Po končanem centrifugiranju smo z vrha pazljivo odvzemali po 2 ml, tako da smo dobili na vsako centrifugirko približno 20 frakcij. Vsaki frakciji smo na spektrofluorimetru (GENion, Tecan, ZDA) izmerili absorbanco pri 260 nm, kot ozadje smo izmerili absorbanco pufra in združili frakcije, ki so imele približno enako visoko izmerjeno vrednost. Kjer so bile izmerjene absorbance najvišje (0,9 – 1,9) so bili prisotni ToMV delci – te frakcije smo shranili na ledu in v hladni sobi pri 4 °C čez noč.
- Naslednji dan smo frakcije, kjer so bili prisotni virusni delci, redčili s pufrom brez 2-merkaptoetanola in Na-DIECA v razmerju 1:2 in centrifugirali na ultracentrifugi 2,5 h pri 35000 rpm.
- Supernatant smo nato odlili in usedlino ponovno suspendirali v FC pufru z dodanim CsCl (na 30 g začetnega rastlinskega materiala dodamo 20,4 g CsCl v 30 ml pufra). Ponovno smo centrifugirali na ultracentrifugi, tokrat 20 h pri 23500 rpm in po poteku centrifugiranja z vrha odvzemali 2 ml frakcije in jim izmerili absorbanco pri 260 nm. Ponovno smo združili frakcije, kjer je bila izmerjena vrednost najvišja (0,3 – 1,6), kajti v tistih se nahajajo virusni delci.
- Združeno frakcijo smo dializirali proti FC pufru brez 2-merkaptoetanola in Na-DIECA v dializni vrečki D-7884 (Sigma, Nemčija) 3 h v hladni sobi (4 °C).
- Po dializi smo združeni frakciji izmerili volumen ter absorbanco pri 260 in 280 nm. Iz vrednosti absorbance pri 260 nm, znanega ekstinkcijskega koeficiente za ToMV ($\epsilon = 3,1 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in znane vrednosti poti žarka ($l = 0,54 \text{ cm}$) smo izračunali koncentracijo virusnih delcev v vzorcu po formuli:

$$A_{260} = \epsilon \times l \times c \quad \dots(1)$$

Koncentracijo virusnih delcev smo izrazili v mg/ml ali ng/ml.

- Razmerje med izmerjenima vrednostima absorbanc pri 260 in pri 280 nm je pomenilo merilo za čistost virusnih delcev in za njihovo celovitost. V primeru ToMV je faktor 1,17 tisti, pri katerem so delci dobro očiščeni in so v veliki meri

nerazpadli. Integriteto virusnih delcev smo preverili z elektronsko mikroskopijo, kjer smo uporabili metodo negativnega kontrastiranja. Kapljico vzorca z očiščenimi virusnimi delci smo 5 min inkubirali na mrežici, ki je bila predhodno naparjena z ogljikom in nato sprali z destilirano H₂O (s kapalko, približno 20 kapljic). Na mrežico smo nato s kapalko nanesli 4-5 kapljic 1 % raztopine uranil acetata in spet sprali z 20 kapljicami destilirane H₂O. Mrežico smo posušili in očiščene virusne delce opazovali pod elektronskim mikroskopom (CM 100, Philips, Nizozemska).

3.1.3 Priprava ToMV standarda za nadaljnje analize

Ko smo s postopkom, ki je vključeval ultracentrifugiranje v gradientu saharoze in CsCl, očistili ToMV virusne delce in določili njihovo koncentracijo v celotnem volumnu frakcije, smo morali izbrati primeren način za njihovo uporabo v kasnejših molekularnih analizah. Očiščene virusne delce smo namreč pripravljali zato, da bi jih uporabili kot standard za kvantifikacijo ToMV v neznanih vzorcih. Preizkusili smo različne načine izolacije virusne RNA, nato pa smo izbrali način, s katerim bi ponazorili količino virusnih delcev v standardu in posledično v standardni krivulji.

3.1.3.1 Izolacija RNA

3.1.3.1.1 Izolacija RNA s kompletom RNeasy

Iz frakcije očiščenih ToMV delcev smo izolirali virusno RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, ZDA). Frakcijo z izoliranimi virusnimi delci smo 20-krat redčili v 20 mM Na-acetatnem pufru s pH 5,5. 100 µl redčine smo dodali 450 µl RLT pufra iz kita in nadaljevali s postopkom izolacije po navodilih proizvajalca. Virusno RNA smo izprali v 40 µl vode brez RNaz (»RNase-free water«) in shranili pri -20 °C do analize z RT-qPCR (obratno prepisovanje in kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času).

3.1.3.1.1.1 Preverjanje izkoristka izolacije RNA z reagentom "Ribogreen"

Izkoristek izolacije RNA z RNeasy kompletom smo preverjali tako, da smo luciferazno RNA (Luciferase Control RNA, Promega, ZDA) z znano začetno koncentracijo (1 ng/µl) izolirali z omenjenim kompletom na enak način, kot smo to naredili z RNA iz virusnih delcev. Z Ribogreen reagentom (RiboGreen® RNA Quantitation Kit, Molecular Probes, Nizozemska) smo določili začetno in končno količino RNA ter iz razlike med njima določili izkoristek postopka izolacije RNA.

Merjenje količine RNA z Ribogreen reagentom je potekalo tako, da smo 10 µl začetne, luciferazne RNA redčili v 90 µl sterilne H₂O. Enako smo redčili tudi končno luciferazno RNA. Pripravili smo Ribogreen reagent (komponento A iz kompleta) tako, da smo v 1800 µl sterilne H₂O dodali 200 µl 20-kratnega TE pufrja (komponenta B iz kompleta) in 1 µl Ribogreen reagenta. K 100 µl redčene RNA v temni mikrotitrski ploščici s 96 luknjicami in ravnim dnom (Costar/Corning, ZDA), smo dodali 100 µl redčenega reagenta in izmerili fluorescenco na spektrofotometru GENios (Tecan, ZDA). Fluorescenco smo vzbujali z valovno dolžino 485 nm, do oddajanja fluorescence reagenta pa je prišlo pri valovni dolžini 535 nm.

3.1.3.1.2 Izolacija RNA s temperaturno denaturacijo virusnih delcev

RNA smo iz standarda virusnih delcev poskusili pridobiti tudi s temperaturno denaturacijo. Po podatkih iz literature za ToMV (Huttinga in Rast, 1985) je za temperaturno denaturacijo virusnih delcev potrebna 10-minutna inkubacija pri 90°C. Virusne delce, ki smo jih predhodno očistili, smo tako redčili v Na-acetatnem pufu s pH 5,5 in inkubirali pri omenjeni temperaturi v termobloku (GeneAmp® PCR System)700, Applied Biosystems, ZDA). Po denaturaciji smo izvedli obratno prepisovanje in analizo s qPCR ter dobljene rezultate primerjali s tistimi, ki smo jih dobili po analizi vzorcev, kjer smo predhodno izolirali RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, ZDA).

3.1.3.2 Določanje količine virusnih delcev v ToMV standardu

3.1.3.2.1 Določanje koncentracije virusne RNA po izolaciji s kompletom RNeasy Plant Mini Kit

V primeru, ko smo virusno RNA izolirali s kompletom RNeasy Plant Mini Kit, smo morali določiti koncentracijo izolirane RNA s kompletom »RiboGreen® RNA Quantitation Kit (Molecular Probes, Nizozemska). Vzorec izolirane virusne RNA smo 20-krat redčili v sterilni dH₂O. RNA standard (komponenta C iz kompleta, oziroma »Ribosomal RNA standard« z osnovno koncentracijo 100 µg/ml) smo v seriji 2-kratnih redčitev redčili od 0,39 µg/ml do 0,02 µg/ml. 10 µl RiboGreen® reagenta (komponente A) smo redčili v 200 µl 20-kratnega TE pufra (komponenta B iz kompleta) in v 1800 µl sterilne dH₂O. 100 µl tako pripravljene redčine smo dodali k 100 µl redčine standarda ali vzorca in v ploščici s 96 luknjicami (temne ploščice z ravnim dnom, Costar/Corning, ZDA) izmerili fluorescenco na spektrofotometru GENios (Tecan, ZDA). Fluorescenco smo vzbujali z valovno dolžino 485 nm, do oddajanja fluorescence reagenta pa je prišlo pri valovni dolžini 535 nm.

Izmerjene vrednosti fluorescence pri pripadajočih redčitvah standarda so služile za pripravo umeritvene krivulje, s katero smo izračunali koncentracijo našega vzorca virusne RNA. Umeritveno krivuljo smo narisali v programu Microsoft Excel (Microsoft, ZDA), na x-os smo nanašali koncentracijo RNA standarda, na y-os pa pripadajoče izmerjene vrednosti fluorescence. Iz naklona krivulje in izmerjene vrednosti fluorescence vzorca virusne RNA smo izračunali koncentracijo RNA v vzorcu.

Na ta način smo določili koncentracijo RNA v našem standardu. S to metodo nismo dobili podatka o količini virusnih delcev v našem vzorcu, t. j. količini tako virusne RNA kot proteinov.

3.1.3.2.2 Določanje koncentracije ToMV v standardu po temperaturni denaturaciji

Pred temperaturno denaturacijo smo v pufu redčili očiščene virusne delce, katerim smo spetkrotometrično določili koncentracijo. Tako smo za vsako opravljenou redčitev imeli znano količino virusnih delcev v vzorcu. Količino smo izražali v mg ali ng virusnih delcev na ml pufra. Po temperaturni denaturaciji smo z molekularno metodo PCR v realnem času

določali prisotnost virusne RNA, njena količina v posamezni redčitvi pa je bila odvisna od količine virusnih delcev v vzorcu. Umeritveno krivuljo je tako predstavljala serija 10-kratnih redčitev očiščenih ToMV virusnih delcev. Če je bila osnovna koncentracija teh delcev 0,42 mg/ml, imajo uporabljeni 10-kratne redčitve ustreznno manjšo koncentracijo. Tako je na primer 100-kratna redčitev vsebovala 0,0042 mg/ml ToMV.

Iz podatka o koncentraciji virusnih delcev v vzorcu smo določili število virusnih delcev v vzorcu. Iz literature (Huttinga in Rast, 1985) je znani podatek o velikosti ToMV virusnih delcev. Ta znaša 40×10^6 Da. Iz te znane velikosti smo izračunali število virusnih delcev v našem vzorcu.

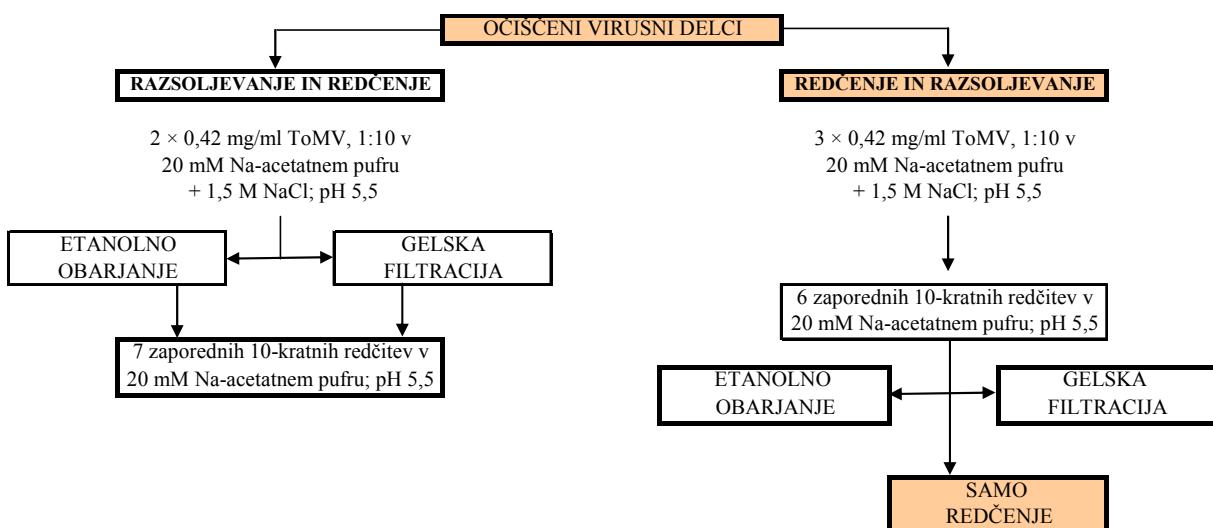
3.1.4 Priprava vzorcev za analizo na prisotnost ToMV

3.1.4.1 Priprava kromatografskih frakcij

Pri koncentriranju s CIM® monolitnimi kromatografskimi nosilci smo pridobili različne frakcije. ToMV delci so se z nosilca sprali z 20 mM NA pufrom z dodatkom 1,5 M NaCl, ki v nadaljevanju moti potek PCR reakcije (Rossen in sod., 1992).

Zato smo preizkusili tri različne načine razsoljevanja elucijske kromatografske frakcije in sicer v dveh delih. V prvem delu smo vzorce najprej razsolili na različne načine in nato redčili v Na-acetatnem pufru s pH 5,5, v drugem delu pa smo vzorce najprej redčili v pufru in nato razsolili na različne načine (slika 2).

Obenem smo preizkusili tudi vpliv NaCl na agregacijo virusnih delcev, zato smo pred izvedbo obeh delov poskusa izvedli temperaturno denaturacijo vzorcev, ki naj bi razbila aggregate virusnih delcev.



Slika 2: Shema različnih poskusov razsoljevanja elucijske kromatografske frakcije za kasnejšo analizo.

Figure 2: Scheme of different desalting procedures of elution fraction.

3.1.4.1.1 Razsoljevanje in redčenje

- Očiščene ToMV virusne delce v začetni koncentraciji 0,42 mg/ml smo v dveh 1,5 ml mikrocentrifugirkah redčili 1:10 v Na-acetatnem pufru z 1,5 M NaCl in pH 5,5.
- Pripravljeno redčino smo 10 min temperaturno denaturirali pri 90°C.

3.1.4.1.1.1 Razsoljevanje z etanolnim obarjanjem

- 2,5 ml denaturirane redčine virusnih delcev smo dodali 25 µl absolutnega etanola in 1 µl Na-acetata. Inkubirali smo 20 min pri sobni temperaturi.
- Sledilo je centrifugiranje pri 14000 rpm 20 min (5417 R Centrifuge, Eppendorf, Nemčija).
- Usedlino smo sprali s 125 µl 70% etanola in vrtinčili.
- Nato smo 5 min centrifugirali pri 11000 rpm.
- Superatanat smo odlili in usedlino posušili na zraku (da nismo več vonjali etanola).
- Usedlino smo ponovno suspendirali v 100 µl Na-acetatnega pufra s pH 5,5.
- Tak vzorec smo nato redčili v seriji 7 zaporednih 10-kratnih redčitev (od 10 \times do 10.000.000 \times).

3.1.4.1.1.2 Razsoljevanje z gelsko filtracijo

- Kolono za gelsko filtracijo (PD-10 Desalting Column, Amersham Biosciences, VB) smo sprali s 25 ml Na-acetatnega pufra pH 5,5, pufer smo na spodnji strani zbirali v erlenmajerici.
- Na kolono smo takoj po tem, ko je ves pufer stekel v gelsko fazo (ozioroma ko sta se izenačila nivoja pufra in polnila kolone), nanesli 2,5 ml vzorca (denaturirana redčina ToMV virusnih delcev).
- Ko sta se izenačila nivoja vzorca in polnila kolone, smo na vrh kolone dodali 3,5 ml Na-acetatnega pufra s pH 5,5 in takoj začeli z zbiranjem elucijske frakcije na spodnji strani kolone.
- Ko smo zbrali 3,5 ml elucijske frakcije, smo prenehali z zbiranjem in na kolono zlili le 2-3 ml acetatnega pufra, da se kolona ni zasušila in je bila uporabna še za nadaljnje poskuse.

- Vzorec smo redčili v seriji 7 zaporednih 10-kratnih redčitev (od 10 \times do 10.000.000 \times).

3.1.4.1.2 Redčenje in razsoljevanje

- Pripravili smo si tri 1,5 ml mikrocentrifugirke in v njih pripravili 10-kratne redčitve ToMV očiščenih delcev. Redčili smo v Na-acetatnem pufru z 1,5 M NaCl in pH 5,5.
- Vse pripravljeni 10-kratne redčitve smo naprej redčili v Na-acetatnem pufru brez soli. Pripravili smo serijo 6 zaporednih 10-kratnih redčitev (od 100 \times do 10.000.000 \times).

3.1.4.1.2.1 Razsoljevanje z etanolnim obarjanjem

Eno serijo redčitev smo razsolili z etanolnim obarjanjem po enakem postopku, kot je bil opisan že v točki 3.1.4.1.1.1. Vzorce smo kasneje analizirali z molekularno metodo.

3.1.4.1.2.2 Razsoljevanje z gelsko filtracijo

Drugo serijo redčitev smo razsolili po postopku gelske filtracije, opisane v točki 3.1.4.1.1.2. Razsolili smo vsako redčitev posebej in kasneje z molekularno metodo analizirali elucijske frakcije.

3.1.4.1.2.3 Razsoljevanje z redčenjem

Tu dejansko nismo izvajali nobenega dodatnega razsoljevanja, tako da gre v tem primeru le za analizo vzorca, ki je bil originalno v pufru, ki je vseboval 1,5 M NaCl, in ki je bil v seriji 6 zaporednih 10-kratnih redčitev redčen v pufru brez soli.

Tako smo preverili, če je postopek razsoljevanja sploh potreben za nadaljnjo analizo elucijskih kromatografskih frakcij, ki vsebujejo NaCl. Sklepali smo, da je morda za analizo vzorca zadostno redčenje v pufru, ki ne vsebuje NaCl.

3.1.4.2 Priprava vzorcev vode za analizo

Vzorce namakalne vode, ki so bili odvzeti v rekah ali zbirališčih za namakanje smo morali ustrezno pripraviti za nadaljnjo molekularno analizo.

Iz 5 l plastične posode, v kateri smo imeli spravljen vzorec, smo odvzeli 2-5 ml vzorca in ga nato temperaturno denaturirali (90 °C, 10 min). Vsak vzorec namakalne vode smo redčili vsaj 10 \times , oziroma 100 \times v 20 mM Na-acetatnem pufru s pH 5,5 in nato analizirali na prisotnost ToMV.

3.1.4.3 Priprava vzorca prsti za analizo

V rastlinjaku, kjer je bila dokazana okužba s ToMV virusom, smo odvzeli vzorec prsti (1 l). Prst smo namočili v 2 l bidestilirane vode in jo 3 dni namakali v hladni sobi pri 4 °C. Potem smo vodo pazljivo odlili v 5 l čašo, pri čemer smo vodo zlivali čez filtrirni papir. 5 ml filtrirane vode smo 10 min temperaturno denaturirali pri 90 °C in nato redčili 10×, 100×, 1000× in 10000× v Na-acetatnem pufu s pH 5,5.

3.1.4.4 Priprava rastlinskih vzorcev za analizo

3.1.4.4.1 Izolacija RNA

Izolacijo RNA smo izvedli s kompletom RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, ZDA). RNA vzorcev testnih rastlin *Nicotiana glutinosa* smo izolirali iz 300 mg začetnega materiala, ki smo ga strli s tekočim dušikom. Dodali smo 900 µl RLT ekstrakcijskega pufra, vzorec dobro zvrtinčili in 3 min inkubirali pri 56 °C. S postopkom smo nadaljevali po navodilih proizvajalca. RNA smo na koncu izprali s 50 µl vode brez RNaz, ki smo jo prej segreli na 56 °C in pred končnim centrifugiranjem inkubirali na koloni 2 min.

3.1.4.4.2 Obdelava vzorcev izolirane RNA z DNazo

Vzorec RNA smo obdelali z DNazo iz kompleta Dnase I Amplification Grade (Invitrogen, ZDA). 18 µl izolirane RNA iz rastlinskega materiala smo prepipetirali v 1,5 ml mikrocentrifugirko. Posebej smo naredili mešanico, sestavljeno iz 7,98 µl DEPC H₂O, 3,0 µl 10× pufra iz kompleta in 0,99 µl encima DNaze in jo dodali k izolirani RNA. Mešanico smo 15 min inkubirali pri sobni temperaturi. Nato smo dodali 3 µl 25 mM EDTA iz kompleta in inkubirali 10 min pri 65 °C. Tako obdelano RNA smo shranili pri -20 °C do poteka analize.

3.1.5 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov in sonde za ToMV

3.1.5.1 Primerjave nukleotidnih zaporedij

Iz javno dostopne baze Nacionalnega centra za informacije s področja biotehnologije (NCBI – National Centre for Biotechnology Information) smo dobili podatke o nukleotidnem zaporedju različnih ToMV sevov. Najprej smo z orodjem za poravnavo več zaporedij (»Multiple Sequence Alignment«) primerjali delna nukleotidna zaporedja za plaščni protein (CP) različnih ToMV sevov (preglednica 2).

Preglednica 2: Seznam različnih ToMV sevov, kjer smo primerjali delna nukleotidna zaporedja za CP in pripadajoče številke zaporedij iz baze NCBI

Table 2: A list of ToMV strains, where CP nucleotide sequence was compared.

ToMV sev	Številka zaporedja iz baze NCBI
ToMV-D	AF067248
ToMV-R	AF067235
ToMV-M	AF067236
ToMV-38	AF067234
ToMV-RS	AF067230
ToMV-46	AF067241
ToMV-DW	AF067242
ToMV-C	AF067249

Kljub temu, da v bazi nukleotidnih zaporedij ni bilo podatkov o zaporedju za gibalni protein (MP) seva ToMV, ki smo ga uporabljali v naših poskusih (ToMV-D), smo z orodjem za poravnavo več zaporedij primerjali zaporedja za MP ostalih sevov ToMV (preglednica 3).

Preglednica 3: Seznam različnih ToMV sevov/izolatov, kjer smo primerjali zaporedja za MP in pripadajoče številke zaporedij iz baze NCBI

Table 3: A list of different ToMV strains where MP nucleotide sequence was compared

ToMV sev/izolat	Številka zaporedja iz baze NCBI
ToMV-K	AF155507
ToMV-Kazakh K1	AF062519
ToMV izolat Queensland	AF332868
ToMV izolat S-1	AJ132845
ToMV-camelia	AJ417701
ToMV-S1 (MP)	AJ011934

3.1.5.2 Uporaba računalniškega programa za načrtovanje začetnih oligonukleotidov in sonde

Za načrtovanje specifičnih začetnih oligonukleotidov in sonde za ToMV virus smo uporabili znano nukleotidno zaporedje za gibalni protein seva ToMV-K (AF155507).

Nukleotidno zaporedje smo odprli v računalniškem programu PrimerExpress™ 2.0 (Applied Biosystems, ZDA), v katerem smo načrtovali začetne oligonukleotide in MGB (»minor groove binder«) sondu za specifično določanje ToMV. Upoštevali smo pogoje in parametre načrtovanja, ki so že nastavljeni v programu PrimerExpress™ 2.0 in jih nismo spremenjali. Pogoji in parametri so se nanašali na delež GC (30-80%), Tm (58-60 °C), dolžino amplikona (50-100 bp) in dolžino začetnih oligonukleotidov (optimalna dolžina 20 bp). Dodatno smo preverili, katera od predlaganih kombinacij začetnih oligonukleotidov po vsej verjetnosti ne tvori sekundarnih struktur in dimerov.

3.1.6 Izvedba kvantitativne analize ToMV s qPCR

Kvantitativna analiza vzorcev na prisotnost ToMV je v našem primeru pomenila ugotavljanje števila virusnih delcev oziroma njihove koncentracije v vzorcu namakalne vode ali v elucijski kromatografski frakciji po koncentriranju vzorcev s CIM® monolitnimi kromatografskimi nosilci. Količino delcev v vzorcu smo preračunali glede na standard, ki smo ga pripravili iz očiščenih virusnih delcev ToMV. Iz znane količine standarda smo po analizi s qPCR narisali umeritveno krivuljo in z neno pomočjo izračunali količino ToMV delcev v analiziranih vzorcih.

Pred analizo s qPCR smo izvedli obratno prepisovanje (RT), da smo RNA iz vzorcev in standarda prepisali v cDNA, ki smo jo dodajali v qPCR reakcije.

3.1.6.1 Obratno prepisovanje (RT)

Pred izvedbo obratnega prepisovanja smo RNA (vzorcev in standarda) denaturirali, da smo se znebili morebitnih sekundarnih struktur molekule in tako omogočili učinkovitejše prepisovanje RNA v cDNA.

20 µl ustrezne RNA ali redčine RNA smo prepipetrirali v 0,2 ml mikrocentrifugirke in denaturirali. Denaturacijo smo izvajali pri dveh različnih temperaturah in časih inkubacije:

- 5 min pri 80 °C, kadar smo obratno prepisovali RNA, ki smo jo predhodno izolirali s kompletom iz vzorca,
- 10 min pri 90 °C, kadar smo RNA izolirali s temperaturno denaturacijo virusnih delcev.

Med razvojem testa smo uporabili tudi dva različna načina obratnega prepisovanja (RT).

3.1.6.1.1 Priprava vzorcev za obratno prepisovanje

Primerjalno smo s qPCR analizirali vzorce, kjer smo redčili RNA pred RT, oziroma cDNA po RT reakciji.

3.1.6.1.1.1 Redčenje RNA pred RT

Izolirano RNA smo takoj po izolaciji s kompletom ali temperaturno denaturacijo redčili v Na-acetatnem pufru. Pripravili smo serijo 10-kratnih redčitev, le-te denaturirali (glej točko 3.1.6.1), obratno prepisali in nato analizirali s qPCR.

3.1.6.1.1.2 Redčenje cDNA po RT

Izolirano RNA smo takoj po izolaciji denaturirali, obratno prepisali in nato sintetizirano cDNA redčili v sterilni H₂O. Pripravljeni redčini smo analizirali s qPCR.

3.1.6.1.2 RT s kemikalijami proizvajalca Applied Biosystems (ZDA)

20 µl denaturirane RNA smo dodali 20 µl mešanice za obratno prepisovanje, ki je bila sestavljena iz naslednjih kemikalij:

Preglednica 4: Kemikalije za obratno prepisovanje

Table 4: Chemicals for RT

Kemikalija	Začetna koncentracija	Količina za 1 reakcijo (µl)	Originalno ime kemikalije in številka
Sterilna dH ₂ O		2,0	
PCR pufer	10×	4,0	10× PCR Buffer II
Mešanica dNTP	10 mM	8,0	dNTP Mix
Naključni heksameri	50 µM	4,0	Random Hexameres
RNazni inhibitor	20 U/µl	1,0	RNase Inhibitor (N808-0119)
MuLV reverzna transkriptaza	50 U/µl	1,0	MuLV Reverse Transcriptase (N808- 0018)

Pogoji za obratno prepisovanje, ki smo ga izvajali v termobloku GeneAmp® 9700 PCR System 9700 (Applied Biosystems, ZDA), so bili:

- 10 min pri 23 °C
- 60 min pri 42 °C

3.1.6.1.3 Obratno prepisovanje s kompletom High Capacity cDNA Archive Kit

20 µl denaturirane RNA smo dodali 20 µl mešanice za obratno prepisovanje, ki je bila sestavljena iz kemikalij iz kompleta High Capacity cDNA Archive Kit (ABI, ZDA). Mešanica za en vzorec je vsebovala 2,1 µl sterilne H₂O, 5,7 µL 10 × pufra za PCR (10× PCR Buffer II) ne iz kompleta, 2,3 µL 25 × mešanice dNTP-jev, 5,7 µL 1 × naključnih začetnih oligonukleotidov (Random Primers), 1,4 µL RNaznega inhibitorja (RNase Inhibitor, N808-0119, ABI, ZDA) na iz kompleta in 2,8 µL »Multiscribe« reverzne transkriptaze.

Pogoji za obratno prepisovanje so bili:

- 10 min pri 25 °C
- 120 min pri 37 °C

Obratno prepisovanje je potekalo v termobloku GeneAmp® 9700 PCR System 9700 (Applied Biosystems, ZDA).

Predhodne izkušnje v laboratoriju Oddelka za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo, Nacionalnega inštituta za biologijo v Ljubljani (Toplak in sod., 2004) poudarjajo prednost kompleta za obratno prepisovanje »High capacity cDNA Archive Kit«, za katerega proizvajalec zagotavlja velik izkoristek obratnega prepisovanja (High capacity cDNA Archive Kit Product Bulletin, 2001). Zato naj bi bil komplet primeren za analize, kjer gre za kvantifikacijske študije. V nadalnjih poskusih, kjer smo določali količino virusnih delcev v vzorcu, smo tako uporabili omenjeni komplet.

3.1.6.2 Kvantitativni PCR v realnem času (qPCR)

V kvantitativnem PCR v realnem času (qPCR) smo tako standard kot naše vzorce pomnoževali z začetnimi oligonukleotidi in MGB sondi, ki smo jih načrtovali sami.

Preglednica 5: Seznam načrtovanih, ToMV specifičnih začetnih oligonukleotidov in sonde.

Table 5: A list of constructed ToMV specific primers and the probe

Ime začetnega oligonukleotida / sonde	Nukleotidno zaporedje	Začetni položaj naleganja na zaporedje za virusni gibalni protein (MP)
ToMVF (smiselni)	5'- TTG CCG TGG TGG TGT GAG T-3'	5154 bp
ToMVR (protismiselni)	5'- GAC CCC AGT GTG GCT TCG T-3'	5225 bp
ToVMGMB	5'-FAM*- TCT TTC CAT TCT CTT GTC AA-MGB-3'	5202 bp

Sonda, ki smo jo uporabili v testu, je na 5' koncu označena s fluorescentnim barvilo FAM (6-karboksifluorescein), na 3' koncu pa ima molekulo dušilca, ki ne fluorescira in MGB (ang. »minor groove binder«) molekulo, ki omogoča stabilnejšo vezavo sonde na tarčno zaporedje.

Končni volumen qPCR reakcij je bil 20 µl, sestavljal pa ga je 10 µl 2× TaqMan® univerzalne mešanice za PCR (TaqMan® Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems, ZDA), po 2 µl posameznih začetnih oligonukleotidov (600 nM) in 2 µl sonde (200 nM).

Univerzalna mešanica za PCR je vsebovala optimiziran pufer za PCR, barvilo ROX (pasivno referenčno barvilo za qPCR), polimerazo DNA (AmpliTaq® Gold), mešanico dNTP z dUTP in uracil-N-glikozidazo (ang. »AmpErase UNG«), ki z odstranjevanjem uracilov v enoverižni ali dvoverižni DNA (Longo in sod., 1990) prepreči ponovno pomnoževanje produktov PCR že po poteku same reakcije.

Koncentracijo začetnih oligonukleotidov in sonde, ki smo jo uporabili v testu, smo predhodno določili v qPCR testu za optimizacijo, kjer smo uporabili začetne oligonukleotide in sondi v različnih koncentracijah.

Po 16 µl pripravljene reakcijske mešanice smo nanesli na optično ploščico (Applied Biosystems, ZDA) in v vsako reakcijo pomnoževanja dodali 4 µl cDNA (v RT reakciji prepisane RNA). Vsak vzorec smo na ploščico nanesli v treh ponovitvah. V prvo in zadnjo reakcijsko mešanico smo namesto cDNA dodali sterilno dH₂O, ki nam je služila kot kontrola kontaminacije (NTC – ang. »no template control«). Ploščico smo pokrili z lepljivo folijo, centrifugirali pri 1000 × g 1 min in jo vstavili v detektor ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, ZDA).

Pomnoževanje specifičnega odseka nukleotidnega zaporedja za MP ToMV je potekalo pri standardnih pogojih:

- 2 min, 50 °C (aktivacija UNG AmpErase®)
- 10 min, 95 °C (aktivacija polimeraze DNA AmpliTaq® Gold)
- **45 ciklov:**
 - 15 s, 95 °C (denaturacija DNA)
 - 1 min, 60 °C (vezava začetnih oligonukleotidov in prepisovanje DNA)

Poleg vzorcev in negativne kontrole (kontrola kontaminacije) smo v analizo vedno vključili tudi pozitivno kontrolo (ToMV virusni delci v koncentraciji $4,2 \times 10^{-3}$ mg/ml).

3.1.6.2.1 Optimizacija koncentracij začetnih oligonukleotidov in sonde

qPCR reakcijo smo izvedli s smiselnimi in protismiselnimi začetnimi oligonukleotidi v koncentracijah 300 nM, 600 nM in 900 nM ter s sondo v koncentraciji 150 nM, 200 nM in 250 nM. Pripravili smo serijo 10-kratnih redčitev virusnih delcev in vzorce vzporedno pomnožili z začetnimi oligonukleotidi v omenjenih koncentracijah. Kot optimalno koncentracijo začetnih nukleotidov smo vzeli naslednjo koncentracijo od najmanjše, kjer je bil ΔR_n signal (normaliziran signal reporterske molekule) nad 0,8 in Ct (ang."threshold cycle") najmanjši.

Ko smo določili optimalno koncentracijo začetnih oligonukleotidov, smo na enak način določili tudi optimalno koncentracijo sonde. 10-kratne redčitve vzorcev smo vzporedno pomnožili s sondami omenjenih koncentracij in z začetnimi oligonukleotidi v optimalni koncentraciji. Koncentracijo sonde, ki je dala optimalni rezultat, smo določili na enak način kot pri začetnih oligonukleotidih – na podlagi R_n vrednosti, ki je morala biti nad 0,8, vrednost Ct pa najmanjša.

3.1.6.2.2 Analiza qPCR reakcij

qPCR reakcije smo analizirali z računalniškim programom SDS 2.1 (Applied Biosystems, ZDA). Ct vrednost smo določili po ročni nastavitev bazne linije in vrednosti praga v omenjenem programu. Vzorce, kjer je bila Ct vrednost večja ali enaka 40, smo imeli za negativne. Vrednost Ct = 38 predstavlja teoretično mejo, pri kateri se v redčitveni vrsti specifične tarčne molekule, ki se v qPCR reakciji pomnožuje s 100% učinkovitostjo, pomnoži ena sama kopija tarčnega zaporedja. Slednjega zato pri Ct enakih ali nad 40 tako ne zaznamo več.

3.1.6.2.3 Določanje meja detekcije in kvantifikacije

Ker smo razvijali kvantitativni test, pri katerem je torej možno določiti količino tarčne molekule, v našem primeru ToMV virusa v vzorcu, smo morali določiti meji detekcije in kvantifikacije za naš test.

Očiščene virusne delce ToMV v začetni koncentraciji 0,42 mg/ml smo redčili v Na-acetatnem pufru s pH 5,5 v območju od $4,2 \times 10^{-3}$ do $4,2 \times 10^{-11}$ mg/ml. Serije redčitev smo analizirali s qPCR v petih neodvisnih poskusih. Eno redčitev smo v posameznem poskusu testirali v treh ponovitvah. Na koncu qPCR reakcije smo dobili podatke za Ct vrednosti posameznih redčitev vzorcev. Iz programa SDS 2.1 smo podatke izvozili v program Microsoft Excel (Microsoft, ZDA) in tam narisali standardno krivuljo, kjer smo na x-os nanašali logaritemske vrednosti koncentracij virusnih delcev v vzorcu, na y-os pa Ct vrednosti posamezne redčitve. Iz umeritvene krivulje smo dobili podatke o vrednosti naklona krivulje in o koeficientu linearne regresije (R^2).

S pomočjo umeritvene krivulje smo določili mejo detekcije (LOD - "limit of detection") in mejo kvantifikacije (LOQ - "limit of quantification"). LOQ je za nas pomenila najmanjšo koncentracijo virusnih delcev, kjer smo lahko v petih ločenih poskusih še vedno zanesljivo določili virusne delce. LOD pa je za nas pomenila tisto koncentracijo, kjer smo v več kot 50% izvedenih poskusih zaznali prisotnost virusnih delcev. LOD je zato nižja od LOQ, kajti pri slednji smo v 100% poskusov določili virusne delce, pri LOD pa le pri 50% izvedenih poskusov ali več.

3.1.6.2.4 Določanje učinkovitosti pomnoževanja

Učinkovitost pomnoževanja vzorcev v qPCR reakciji smo določili s pomočjo vrednosti naklona umeritvene krivulje po formuli:

$$E = 10^{(-1/naklon)-1} \quad \dots(2)$$

E pomeni učinkovitost pomnoževanja. Vrednost 1 pomeni 100% učinkovitost pri pomnoževanju tarčne molekule (Pfaffl, 2001; Ginzinger, 2002).

3.1.6.2.5 Določanje specifičnosti qPCR reakcije

Specifičnost qPCR analize za ugotavljanje prisotnosti ToMV v vzorcu smo preverili z analizo pomnoženih qPCR produktov na 10% poliakrilamidnem gelu. Preverili smo produkte, kjer smo pomnoževali ToMV delce, redčene v Na-acetatnem pufru ali pa v namakalni vodi, ki ToMV pred tem ni vsebovala. qPCR reakcijo smo za oba vzorca izvedli s specifično sondno ali brez nje. Reakcijske mešanice so tako bile sestavljene iz:

- 10 µl 2 × univerzalne reakcijske mešanice za PCR, 2 µl ToMVF, 2 µl ToMVR, 2 µl ToMVMGB in 4 µl cDNA ali pa
- 10 µl 2 × univerzalne reakcijske mešanice za PCR, 2 µl ToMVF, 2 µl ToMVR, 2 µl sterilne dH₂O in 4 µl cDNA.

3.1.6.2.5.1 Izvedba poliakrilamidne gelske elektroforeze

Sestavili smo stekelca in nosilec za izvedbo poliakrilamidne elektroforeze (BIORAD, ZDA). Pripravili smo si še svežo raztopino APS (100 mg/ml) in 5 × TAE pufer. Za pripravo enega gela smo zmešali 3,55 ml dH₂O, 2,0 ml 5 × TAE, 4,4 ml 30% bisakrilamida (Biorad, ZDA), 100 µl APS (100 mg/ml) in 10 µl reagenta TEMED (Sigma, Nemčija). Kemikalije smo zmešali v 15 ml centrifugirki s pokrovčkom. TEMED smo dodali kot zadnji in po mešanju s pasteurjevo pipeto hitro vlili gel med stekelca v nosilcu. Počakali smo 30-40 min, da se je gel dobro strdil, ga prenesli v kadičko, zalili z 0,5-1,0 l 1 × TAE pufra, v katerem je potekala elektroforeza in nanesli vzorce. Volumen posameznega vzorca je bil 20 µl, temu smo dodali še 6 µl 6 × koncentriranega nanašalnega pufra (vseboval je bromfenol modro, ksilen cianol FF, glicerol in dH₂O) in oboje skupaj s hamiltonovo brizgo nanesli v posamezni žepek na gelu. Poleg vzorcev smo v en žepek nanesli tudi 5 µl standarda za določanje velikosti fragmentov velikosti od 50 do 2000 bp (AmpliSizeTM Molecular Ruler, BIORAD, ZDA). Elektroforeza je tekla 1,5 h pri napetosti 80 V v hladni sobi (na 4 °C). Po poteku elektroforeze smo poliakrilamidni gel barvali v raztopini etidijevega bromida s koncentracijo 10 mg/ml 20 min in nato pod UV lučjo določili prisotnost in velikost fragmentov po qPCR reakciji.

3.1.7 Analiza vzorcev namakalne vode

Odvzete vzorce namakalne vode iz rek ali drugih zbiralnišč smo vedno takoj analizirali s qPCR metodo, ki pa smo jo prilagodili.

Vzorce, v katerih nismo zaznali prisotnosti ToMV z analizo originalne namakalne vode, smo koncentrirali z uporabo CIM® (Convective Interaction Media) monolitnih kromatografskih nosilcev (BIA Separations d. o. o., Slovenija) in nato analizirali kromatografske frakcije.

3.1.7.1 Analiza originalnih vzorcev namakalne vode

3.1.7.1.1 Prilagoditev qPCR testa za analizo namakalne vode

Da smo lahko na pravilen način analizirali vzorce namakalne vode, smo morali prilagoditi test za detekcijo ToMV, kot je bil opisan v točki 3.1.3. Očiščene delce ToMV smo ponovno uporabili kot standard in sicer smo pripravili serijo 10-kratnih redčitev, ki so obsegale koncentracije virusnih delcev od $4,2 \times 10^{-3}$ mg/ml do $4,2 \times 10^{-11}$ mg/ml. Redčitve smo v tem primeru, ko je šlo za prilagoditev testa, naredili v namakalni vodi iz reke Vipave, kjer s qPCR nismo dokazali prisotnosti ToMV. Vse pripravljene redčitve smo v posameznem qPCR poskusu analizirali v treh ponovitvah, opravili pa smo 4 ločene poskuse. Kot je bilo opisano v točkah 3.1.6.2.2, 3.1.6.2.3 in 3.1.6.2.4 smo analizirali qPCR poskuse ter določili LOD, LOQ in učinkovitost pomnoževanja. Vse parametre smo primerjali s tistimi, ki smo jih dobili, če smo namesto v namakalni vodi ToMV redčili v Na-acetatnem pufru s pH 5,5.

3.1.7.1.2 Končna izvedba analize originalnih vzorcev namakalne vode

Po poskusu prilagoditve testa za analizo vzorcev namakalne vode smo ugotovili, da so rezultati bolj zanesljivi, če redčitve originalnih vzorcev namakalnih voda izvajamo v 20 mM Na-acetatnem pufru s pH 5,5. Zato smo pri izvedbi analize originalnih vzorcev namakalne vode z vzorci postopali tako, kot je opisano v točki 3.1.4.2. Po ustremnem redčenju vzorca, smo redčine obratno prepisali tako, kot je to razloženo v točki 3.1.6.1 in uporabili kemikalije iz kompleta High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, ZDA). Sledila je analiza s qPCR.

3.1.7.2 Koncentriranje vzorcev namakalne vode z uporabo CIM® (Convective Interaction Media) monolitnih kromatografskih nosilcev

Ker so se CIM® kromatografski nosilci že izkazali kot učinkoviti pri koncentriranju močno razredčenih rastlinskih virusov v vodovodni vodi in v pufru (Kramberger in sod., 2004), smo želeli prilagoditi poskus koncentriranja za primere, ko se ToMV nahaja v okolju v namakalni vodi in to v koncentracijah, v katerih ga ne moremo določiti z uporabo qPCR.

3 l vode iz reke Gradaščice, v kateri nismo določili prisotnosti ToMV smo razdelili na 3 dele po 1 l. Po filtraciji originalnih vzorcev čez 0,45 µm poliamidni filter (Sartorius, Nemčija), smo v 1 l vode dodali 10 µl, v drugi vzorec 1 l vode pa 1000 µl očiščenih ToMV delcev v koncentraciji $1,3 \times 10^{-4}$ mg/ml. Koncentracija ToMV v prvem litru vode je bila tako $3,31 \times 10^{-9}$ mg/ml, v drugem litru vode pa $1,76 \times 10^{-7}$ mg/ml. Tretji liter vode je služil kot negativna kontrola in ni vseboval ToMV.

Postopek koncentriranja s CIM® monolitnimi kromatografskimi nosilci je bil izведен po postopku, ki ga navajajo Kramberger in sod. (2004) v laboratorijih podjetja BIA Separations d. o. o.. Koncentrirali smo od 1 do 5 l namakalne vode. CIM QA monolitni kromatografski nosilci so imeli premer 12 mm, dolgi so bili 3 mm in so predstavljali močan anionski izmenjevalec. Diski so bili vpeti v posebno ohišje (BIA Separations d. o. o., Slovenija) in povezani z gradientnim HPLC sistemom (Knauer, Nemčija). Med postopkom koncentriranja smo zbirali različne kromatografske frakcije: pretočno frakcijo (ang. "flow-through"), elucijsko frakcijo in frakcijo spiranja (ang. "wash").

ToMV delce smo s kolone spirali z 20 mM Na-acetatnim pufrom, ki je vseboval še 1,5 M NaCl in tako dobili elucijsko frakcijo.

Po poteku koncentriranja smo vse kromatografske frakcije analizirali tako, kot je opisano v točki 3.1.4.1.2.3. Postopek obratnega prepisovanja in qPCR analize je bil enak kot v primeru analize originalnih vzorcev namakalne vode.

3.1.8 Druge analize vzorcev na prisotnost ToMV

3.1.8.1 DAS-ELISA

Po tem, ko smo pripravili ustrezne redčine vzorcev ToMV (kromatografske frakcije smo redčili v ekstracijskem pufru za ELISA vsaj 10-krat, vzorce očiščenih ToMV virusnih delcev pa v dveh serijah 3-kratnih redčitev, ki so v končni fazi obsegale koncentracijsko območje od $2,5 \times 10^{-5}$ mg/ml do $2,6 \times 10^{-7}$ mg/ml), smo jih do analize shranili v hladilniku pri 4 °C. DAS-ELISO smo izvedli po naslednjem postopku:

- Mikrotitrskie ploščice s 96 luknjicami PolySorp™ (NUNC, Danska) smo obložili s specifičnimi primarnimi protitelesi (Plant Research International, Nizozemska). Redčili smo jih v pufru za nanos primarnih protiteles (»coating« pufer) v razmerju 1:1000. V vsako luknjico smo nanesli po 200 µl redčine protiteles, jih pokrili s plastičnim pokrovom in inkubirali pri 37 °C 4 h.
- Ploščice smo nato 3-krat sprali s pufrom za spiranje, kjer je vsako spiranje trajalo po 3 min.
- Na ploščice smo v ustrezne luknjice nanesli po 190 µl prej pripravljenih vzorcev. Vsakega smo pred nanosom vrtinčili. V test smo vedno vključili negativno kontrolo (ekstrakt *Nicotiana clevelandii* testnih rastlin, ki niso bile okužene s ToMV) in pufrsko kontrolo (ekstracijski pufer). Ploščice z vzorci smo pokrite inkubirali pri 4 °C čez noč.
- Sledilo je 3-kratno spriranje po 3 min.
- Nato smo na ploščice nanesli po 180 µl sekundarnih protiteles, konjugiranih z alkalno fosfatazo (Plant Research International, Nizozemska). Redčili smo jih v razmerju 1:1000 v konjugatnem pufru in inkubirali pri 37 °C 4 h.
- Ploščice smo 3-krat po 3 min spirali.
- V vsako luknjico smo dodali raztopino substrata pNPP (koncentracija je bila 1 mg/ml), pripravljeno v substratnem pufru. Nanesli smo po 200 µl in nato inkubirali pri sobni temperaturi.
- Po 15, 30, 60, 90 in 120 min inkubaciji smo pri 405 nm odčitavali absorbanco.

Sestava vseh pufrov (za nanos primarnih protiteles, za spiranje, konjugatnega in substratnega) je opisana v prilogi A.

3.1.8.2 Testi infektivnosti

Za preizkušanje infektivnosti ToMV virusnih delcev v vzorcih namakalne vode smo izbrali dve različni metodi. Pri eni metodi smo testne rastline *Nicotiana glutinosa* mehansko inokulirali z elucijsko frakcijo, ki smo jo dobili po postopku koncentriranja vzorca namakalne vode iz gramoznice Ivanci. V drugem delu pa smo propagacijske rastline *Nicotiana clevelandii* zalivali z izvorno namakalno vodo iz gramoznice Ivanci.

3.1.8.2.1 Mehanska inokulacija testnih rastlin z elucijsko frakcijo

Infektivnost virusnih delcev, prisotnih v namakalni vodi iz gramoznice Ivanci, ki je bila skoncentrirana z uporabo CIM® monolitnih kromatografskih nosilcev, smo preverili tako, da smo testne rastline *Nicotiana glutinosa* mehansko inokulirali z vzorcem elucijske frakcije.

Po 3 liste na vsaki testni rastlini smo v fazi, ko so imele 4-6 razvitih listov, posuli s karborundom. Vzorec elucijske frakcije smo nežno vtrli v liste in jih po 3-5 min spirali z vodovodno vodo. Počakali smo 3-4 tedne in takrat analizirali rastlinske vzorce kot je opisano v točki 3.1.4.4. S qPCR in DAS-ELISA smo analizirali tako inokulirane kot neinokulirane liste testnih rastlin. Kot standard v qPCR reakciji smo uporabili očiščene ToMV delce (osnovna koncentracija 0,42 mg/ml), ki smo jih redčili v RNA, ki smo jo izolirali iz sejancev testnih rastlin *N. glutinosa*, ki med kaljenjem in rastjo niso imeli stika s ToMV. Izolacijo smo izvedli po postopku, ki je opisan v točki 3.1.4.4 in še dodatno 10-krat redčili v bidestilirani H₂O.

3.1.8.2.2 Zalivanje rastlin s ToMV okuženo vodo

Rastline *Nicotiana clevelandii* smo zalivali z namakalno vodo iz gramoznice Ivanci. Poskus zalivanja smo razdelili na tri dele, vsak je vključeval po 5 rastlin. En del smo zalivali z navadno vodovodno vodo in ta del je služil kot negativna kontrola. Drugi del smo zalivali z vzorcem elucijske frakcije namakalne vode iz gramoznice Ivanci. Frakcijo smo razredčili v vodovodni vodi do koncentracije 10⁻⁶ mg/ml (elucijsko frakcijo smo morali 100-krat redčiti) – ta del poskusa je predstavljal pozitivno kontrolo. V tretjem delu pa smo rastline zalivali z originalnim vzorcem namakalne vode iz gramoznice Ivanci. Voda je imela koncentracijo 10⁻⁶ mg/ml, kar smo določili v predhodnih poskusih s qPCR.

Poskus zalivanja je potekal 2 tedna, po tem smo rastline analizirali s qPCR. Kot standard za določanje koncentracije ToMV smo uporabili očiščene delce ToMV, katerih koncentracija je bila 0,42 mg/ml. Delce smo redčili v 10× redčeni RNA (RNA redčena v bidestilirani H₂O), ki smo jo s pomočjo kompleta RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, ZDA) izolirali iz sejancev testnih rastlin *N. clevelandii* kot je opisano v točki 3.1.4.4. Sejanci niso imeli stika z vzorci vode iz okolja ali z očiščenimi virusnimi delci ToMV.

3.1.8.3 Elektronska mikroskopija

Za preverjanje morfologije virusnih delcev po postopku koncentriranja vzorca namakalne vode s CIM® monolitnimi kromatografski nosilci in po mehanski inokulaciji testnih rastlin *Nicotiana glutinosa* z elucijsko kromatografsko frakcijo smo uporabili imuno-serološko elektronско mikroskopijo (ISEM – ang “immuno-serological microscopy”). Na mrežice, ki so bile predhodno naparjene z ogljikom, smo inkubirali v prisotnosti ToMV specifična protitelesa (Plant Research International, Nizozemska), redčena 1:1000 in inkubirali pri sobni temperaturi 45-60 min. Mrežice smo nanesli 0,1 M PBS pH 7,0; nanesli vzorec (elucijsko frakcijo ali rastlinskim ekstraktom) ter mrežice inkubirali 45 min pri sobni temperaturi. Po ponovnem spiranju smo mrežice kontrastirali s 6-7 kapljicami 1% vodne raztopine uranil acetata in potem posušili. Vzorce smo opazovali s transmisijskim elektronskim mikroskopom (CM 100, Philips, Nizozemska).

3.1.9 Primerjava qPCR in DAS-ELISA

Primerjali smo kvantitativno molekularno metodo qPCR in semikvantitativno metodo DAS-ELISA. qPCR smo izvedli kot je opisano v točki 3.1.6, DAS-ELISO pa kot je opisano v točki 3.1.8.1. Primerjali smo občutljivost obeh testov, kar pomeni, da smo skušali za obe metodi določiti LOD za ToMV.

Očiščene virusne delce z začetno koncentracijo 0,42 mg/ml smo v DAS-ELISA testu redčili v ekstrakcijskem pufru za ELISO. Serija redčitev je obsegala koncentracije med $2,5 \times 10^{-5}$ mg/ml in $2,6 \times 10^{-7}$ mg/ml. Vse redčine smo odpipetirali na mikrotritrsko ploščico s 96 luknjicami (PolySorp™, NUNC, Danska) in po 2 urah inkubacije s substratom pNPP (*p*-nitrofenil fosfat) s koncentracijo 1 mg/ml izmerili absorbanco pri 405 nm. Narisali smo graf, kjer smo na x-os nanašali koncentracijo ToMV na ploščici in na y-os ustrezno vrednost absorbance ter narisali logaritemsko umeritveno krivuljo z izračunanim koreacijskim koeficientom. Da smo lahko določili LOD za semikvantitativno DAS-ELISO smo primerjali 4 ločene poskuse, vsako redčino vzorca smo vedno analizirali v dveh ponovitvah.

Vzorci za kvantitativno molekularno analizo s qPCR so bili redčeni v 20 mM Na-acetatnem pufru s pH 5,5 ali pa v namakalni vodi, ki ni vsebovala ToMV (reka Vipava). Slednja je bila uporabljena kot topilo tudi v DAS-ELISA testu, saj smo primerjali LOD obeh metod kadar smo vzorec redčili v pufru, oziroma v namakalni vodi.

3.2 RAZVOJ METODE ZA DOLOČANJE CSNV S PCR V REALNEM ČASU

3.2.1 MATERIAL ZA ANALIZO

Rastlinski material, ki smo ga analizirali na prisotnost tospovirusov je obsegal:

- 10 krizantem (*Dendranthema grandiflorum*)
- 4 paprike (*Capsicum annuum* var. *grossum*)
- 2 gerberi (*Gerbera spp.*)
- 3 paradižnike (*Lycopersicum esculentum*)
- 1 rastlino *Nicotiana tabacum* »White Burley« okuženo s CSNV
- 2 rastlini *Nicotiana benthamiana*; eno okuženo s CSNV in drugo, okuženo z INSV
- 1 rastlina *Nicotiana rustica*, okužena s TSWV
- 2 okrasni rastlini *Verbena* (*Verbena spp.*).

Pri določanju nukleotidnega zaporedja CSNV smo uporabili bakterije *Escherichia coli* seva DH5α.

3.2.2 Izolacija RNA

Rastlinski material, iz katerega smo izolirali RNA, smo zatehtali in strli s tekočim dušikom. RNA smo izolirali s kompletom RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, ZDA). Pred izvedbo izolacije RNA smo rastlinski material strli v terilnici s tekočim dušikom. Pri izolaciji RNA smo upoštevali navodila proizvajalca, priredili smo le količino začetnega rastlinskega materiala (0,3 g), količino ekstrakcijskega pufra RLT pa smo podvojili.

3.2.3 Obratno prepisovanje (RT)

Pred RT reakcijo smo izolirano RNA redčili 1:100 v sterilni dH₂O in v 0,2 ml mikrocentrifugirko odpipetirali 20 µl redčine.

- Redčine smo 5 min denaturirali pri 80 °C, da smo se znebili morebitnih sekundarnih struktur RNA.
- K RNA smo nato dodali 20 µl mešanice za obratno prepisovanje, ki je vsebovala 0,25 µl dH₂O, 1,0 µl MgCl₂ (25 mM), 2,0 µl 10-kratnega pufra za PCR (10 × PCR Buffer II), 1,0 µl naključnih heksamerov (50 µM Random Hexameres), 0,25 µl

RNaznega inhibitorja (20 U/ μ l RNase Inhibitor) in 0,5 μ l MuLV reverzne transkriptaze (50 U/ μ l MuLV Reverse Transcriptase)

- Program za obratno prepisovanje je obsegal inkubacijo pri 23 °C 10 min in pri 42 °C 60 min.

Proizvajalec vseh kemikalij, razen dH₂O v mešanici za obratno prepisovanje je bil Applied Biosystems (ZDA).

3.2.4 Določitev nukleotidnega zaporedja za Virus nekroze stebel krizantem (CSNV – *Chrysanthemum stem necrosis virus*)

Izolirali smo RNA iz vzorca gerbere in jo dvakrat obratno prepisali. Celoten volumen po obratnem prepisovanju – 40 μ l smo uporabili v dveh PCR reakcijah.

3.2.4.1 PCR za kasnejše določanje nukleotidnega zaporedja

V PCR reakcijah smo uporabili dva para začetnih oligonukleotidov (preglednica 6).

Preglednica 6: Seznam začetnih oligonukleotidov za kasnejše določanje nukleotidnega zaporedja CSNV virusa

Table 6: A list of primers used for later determination of nucleotide sequence

Ime začetnega oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje	Referenca
BR060	5' – CAT GGA TCC TGC AGA GCA ATT GTG TCA – 3'	Bezzera in sod., 1999
BR066	5' – CAT GGA TCC TGT AAT GTT CCA TAG CA – 3'	Bezzera in sod., 1999
CZ1	5' – CCC GGA TCC GGG AAA GTT TGC ACT GTT – 3'	Bezzera in sod., 1999
UHP	5' – CAC TGG ATC CTT TTG TTT TTG TTT TTT G – 3'	Cortez, 2001

Mešanica za eno PCR reakcijo je bila sestavljena iz 33,5 μ l dH₂O, 5,0 μ l pufra za PCR (100 mM Tris-HCl (pH 8,8), 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 1% Triton X-100), 0,6 μ l obeh začetnih nukleotidov (50 μ M) in 0,5 μ l Taq DNA polimeraze (5 U/ μ l, Applied Biosystems, ZDA).

Pogoji pomnoževanja so bili:

- 94 °C, 5 min (začetna denaturacija cDNA)
- **35 ciklov:**
 - 94 °C, 1 min (denaturacija DNA)
 - 48 °C, 1 min 30 s (vezava začetnih oligonukleotidov)
 - 72 °C, 2 min (sinteza DNA – podaljševanje verige DNA)
- 72 °C, 7 min (končno podaljševanje verige DNA)

Produkti PCR so po pomnoževanju vzorca z BR060-BR066 parom začetnih oligonukleotidov imeli velikost 850 bp, po pomnoževanju s parom CZ1-UHP pa 500 bp. Njihovo velikost smo preverili na 0,8% agaroznem gelu, ki je vseboval etidijski bromid.

3.2.4.2 Izolacija specifičnih produktov PCR

Velikost produktov PCR reakcij z BR060-BR066 in CZ1-UHP pari začetnih oligonukleotidov smo preverili na 0,8% agaroznem gelu, pripravljenem iz 1-kratnega modifirane pufre TAE (400 mM Tris-acetat pH 8,0 in 0,1 mM EDTA).

S skalpelom smo jih izrezali iz gela, ki smo ga imeli na transiluminatorju, ga obsvetljevali z UV svetlobo in tako določili položaj produkta. Izrezane produkte smo s pinceto prenesli v kolone za izolacijo produktov PCR iz gela iz kompleta DNA Gel Extraction Kit (Milipore, ZDA). Kolono smo vstavili v 1,5 ml mikrocentrifugirke in centrifugirali 10 min pri 8000 g. Po koncu centrifugiranja smo kolono zavrgli, očiščen produkt PCR pa ponovno preverili na agaroznem gelu.

Očiščene produkte PCR smo klonirali v plazmid pGEM-T (Promega, ZDA) in določili nukleotidno zaporedje vstavljenega produkta z univerzalnimi začetnimi oligonukleotidi R40 in M13 (preglednica 7).

3.2.4.3 Kloniranje specifičnih produktov v plazmid pGEM-T

Specifične produkte smo klonirali v plazmid pGEM-T, ki je del vektorskega sistema pGEM-T Easy Vector System (Promega, ZDA). Ligacijsko mešanico smo pripravili po navodilih proizvajalca. Končni volumen reakcije je bil 10 µl. Ligacija je potekala pri 4 °C čez noč. 5 µl smo je porabili za transformacijo bakterij *Escherichia coli* (sev DH5α).

3.2.4.4 Transformacija bakterij *E. coli* DH5 α

- 5 μ l ligacijske mešanice smo prepipetirali v 1,5 ml mikrocentrifugirko.
- Dodali smo 50 μ l kompetentnih celic *E. coli* DH5 α in inkubirali na ledu 20 min.
- Sledili sta inkubaciji pri 42 °C 45 s in na ledu 5 min.
- Dodali smo 950 μ l tekočega LB gojišča in inkubirali na stresalniku pri 37 °C 1,5 h.
- 100 μ l smo nacepili na ploščo s selektivnim gojiščem (LB + Amp + IPTG (induktor gena za β -galaktozidazo v bakteriji *E. coli*) + X-gal (substrat za encim β -galaktozidazo)).
- Preostanek smo centrifugirali 10 min pri 1000 g, odlili supernatant in usedlino ponovno suspendirali v 200 μ l tekočega LB gojišča.
- Na plošče s selektivnim gojiščem smo nacepili dvakrat po 100 μ l bakterijske kulture.
- Plošče smo inkubirali pri 37 °C čez noč.

Naslednji dan smo preverili prisotnost belih kolonij in v njih prisotnost plazmida z vstavljenim produkтом PCR s PCR reakcijo z univerzalnimi začetnimi oligonukleotidi (glej 3.2.3.4.1).

Uspešno transformirane kolonije smo namnožili v steklenih epruvetah s tekočim LB gojiščem z Amp (150 mg / l). Inkubirali smo jih na stresalniku pri 37 °C čez noč.

3.2.4.4.1 Preverjanje vstavitve specifičnega produkta PCR v plazmid pGEM-T

Protokol za PCR reakcijo je bil opisan v Pompe-Novak (2002):

Pripravili smo reakcijsko mešanico za PCR, ki je bila sestavljena iz 3,0 μ l 10-kratnega pufra za PCR (10 \times PCR Buffer II, Applied Biosystem, ZDA), 3,0 μ l 25 mM MgCl₂ (Applied Biosystem, ZDA), 2,0 μ l 10 mM mešanice dNTP (Applied Biosystem, ZDA) ter 0,2 μ l M13 in 0,2 μ l R40 (preglednica 7) začetnih oligonukleotidov (10 μ M).

Preglednica 7: Seznam univerzalnih začetnih oligonukleotidov, uporabljenih za določanje insercije specifičnega produkta PCR v plazmid in za reakcijo določanja nukleotidnega zaporedja

Table 7: A list of universal primers used for determining the insertion of the specific PCR product in the plasmid

Ime začetnega oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje	Referenca
M13	5'-GTA AAA CGA CGC CCA GT-3'	Pompe-Novak (2002)
R40	5'-GAA TTG TGA GCG GAT AAC-3'	Pompe-Novak (2002)

V pripravljeno mešanico, ki smo jo razdelili v 0,2 ml mikrocentrifugirke in imeli na ledu, smo s cepilno zanko pikirali kolonije (bele s plošč s selekcijskim gojiščem).

PCR reakcijo smo izvedli v termociklerju GeneAmp 9700.

Po začetni denaturaciji vzorca pri 99 °C 10 min smo v mešanico za PCR dodali 3 µl 30-krat redčene Ampli Taq DNA polimeraze (5 U/µl, Applied Biosystems, ZDA).

Sledilo je pomnoževanje DNA:

- **30 ciklov:**
 - 94 °C, 30 s (denaturacija DNA)
 - 50 °C, 30 s (vezava začetnih oligonukleotidov)
 - 72 °C, 1 min (čas podaljševanja verige DNA)
- končna inkubacija pri 4 °C

Prisotnost in velikost produktov po PCR reakciji smo preverili na 1% agaroznem gelu.

3.2.4.5 Izolacija plazmida z vstavljenim specifičnim produkтом PCR

Ko so se bakterije v tekočem LB gojišču z Amp ustrezno namnožile (18-20 ur inkubacije pri 37 °C), smo iz njih izolirali plazmide z insertom. Za izolacijo smo uporabili komplet JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed GmbH, Nemčija). Upoštevali smo navodila proizvajalca in končno elucijo plazmida s kolone izvedli v 50 µl sterilne dH₂O, ki smo jo prej segreli pri 70 °C. Izolacijo plazmidov smo preverili na agaroznem gelu in jih shranili pri -20 °C do uporabe v reakciji za določanje nukleotidnega zaporedja.

3.2.4.6 Reakcija za določanje nukleotidnega zaporedja

Vsaka reakcija za določanje nukleotidnega zaporedja je vsebovala 4,0 µl reagenta BigDye™ iz kompleta ABIPRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, ZDA), 1,0 µl M13 ali R40 začetnega oligonukleotida (100 µM), 3,0 µl dH₂O in 2,0 µl izoliranega plazmida z vstavljenim specifičnim produktom PCR (BR060-BR066 ozziroma CZ1-UHP produkt). Količino plazmida in vode v reakciji smo prilagodili glede na količino izoliranega plazmida.

Pogoji pomnoževanja so bili:

- **25 ciklov:**
 - 96 °C, 10 s (denaturacija DNA)
 - 50 °C, 20 s (vezava začetnih oligonukleotidov)
 - 60 °C, 4 min (podaljševanje verige)
- končna inkubacija pri 4 °C

3.2.4.7 Čiščenje produktov po reakciji za določanje nukleotidnega zaporedja

Produkte, ki smo jih dobili po reakciji, opisani v prejšnji točki, smo morali pripraviti za postopek avtomatskega določanja nukleotidnega zaporedja na aparaturi ABI 310 (Applied Biosystems, ZDA). Iz reakcije smo morali odstraniti vse označene dNTP-je, ki se niso vgradili v verigo in bi lahko motili potek avtomatskega določanja nukleotidnega zaporedja.

- K vzorcu smo po poteku reakcije za določanje nukleotidnega zaporedja dodali 26 µl mešanice absolutnega etanola (25,0 µl) in 3 M Na-acetata pH 5,2 (1,0 µl). Potem, ko smo vse prepipetirali, smo vzorec z mešanicami prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirke.
- Inkubirali smo pri sobni temperaturi 15 min.
- Centrifugirali smo pri 13000 rpm 20 min.
- Supernatant smo v celoti odpipetirali in pri tem pazili, da se nismo dotikali usedline. Dodali smo 125 µl 70% etanola in rahlo vrtinčili.
- Centrifugirali smo pri 13000 rpm 5 min.
- Supernatant smo odpipetirali tako, da se nismo dotikali usedline. To smo dobro posušili (odprte mikrocentrifugirke smo inkubirali v termobloku pri 90 °C 1 min).
- V tako pripravljenem vzorcu smo določili nukleotidno zaporedje na aparaturi ABI 310 (Applied Biosystems, ZDA) v laboratorijih Omege d. o. o..

3.2.5 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov in sonde za specifično določanje CSNV

Za načrtovanje začetnih oligonukleotidov in sonde za specifično določanje CSNV virusa smo uporabili znano nukleotidno zaporedje za nukleoproteinski gen (gen N) CSNV virusa z AF067068 številko iz NCBI baze.

V računalniškem programu PrimerExpress™ 2.0 smo odprli omenjeno nukleotidno zaporedje in v njem načrtovali začetne oligonukleotide in MGB sondu za specifično določanje CSNV. Pri tem smo upoštevali vse parametre, ki so opisani že v točki 3.1.5.2.

3.2.6 Kvalitativna analiza CSNV s PCR v realnem času

S kvalitativno analizo s PCR v realnem času smo v primeru CSNV ugotavljali prisotnost virusov v različnih vzorcih rastlin.

V istih vzorcih, ki smo jih analizirali na prisotnost CSNV, smo obenem določali še TSWV virus (sorodni, serološko zelo podobni tospovirusi), gen za citokrom oksidazo (COX) pa smo določali zaradi kontrole ekstrakcije RNA. COX je namreč rastlinski gen in kot tak predstavlja interno kontrolu.

Pred izvedbo PCR v realnem času smo iz rastlinskih vzorcev izolirali RNA kot je to opisano v točki 3.2.1. Vzorec smo nato v RT reakciji obratno prepisali in dobljeno cDNA analizirali s PCR v realnem času.

3.2.6.1 RT reakcija

- Pred reakcijo obratnega prepisovanja smo izolirano RNA iz rastlinskih vzorcev redčili v sterilni dH2O v razmerju 1:100. 10 µl redčine smo prepipetirali v 0,2 ml mikrocentrifugirke in denaturirali pri 80 °C 5 min.
- Pripravili smo mešanico za RT, sestavljeno iz:

12,0 µl dH2O, 4,0 µl 10-kratnega pufra za PCR (10 × PCR Buffer II), 8,0 µl mešanice dNTP (10 mM dNTP Mix), 4,0 µl naključnih heksamerov (50 µM Random Hexameres), 1,0 µl RNaznega inhibitorja (20 U/µl RNase Inhibitor) in 1,0 MuLV reverzne transkriptaze (50 U/µl MuLV Reverse Transcriptase). Proizvajalec vseh uporabljenih kemikalij je Applied Biosystems (ZDA).

- K denaturirani redčini RNA smo dodali 30 µl mešanice za RT.
- Obratno prepisovanje je potekalo pri 23 °C 10 min in pri 42 °C 60 min.

3.2.6.2 PCR v realnem času

V kvalitativnem, za CSNV specifičnem PCR v realnem času smo vse vzorce pomnoževali z začetnimi oligonukleotidi in MGB sondo, ki smo jih načrtovali sami (preglednica 8).

Preglednica 8: Seznam načrtovanih, za CSNV specifičnih začetnih oligonukleotidov in sonde

Table 8: A list of designed CSNV-specific primers and probe

Ime začetnega oligonukleotida / sonde	Nukleotidno zaporedje	Začetni položaj naleganja na zaporedje za virusni nukleoprotein (gen N)
CSNVF (smiseln)	5'- TGA ATT TGA GGA AGA ACA GAA CCA-3'	215 bp
CSNVR (protismiseln)	5'- CTG ATC CAG GTT GTC ATT GCA-3'	284 bp
CSVMG	5'-FAM*- TTG CAT TCA ACT TCC-MGB-3'	241 bp

Obenem smo uporabili še TSWV in COX specifične začetne oligonukleotide, s katerimi smo preverili specifičnost reakcije in uspešnost izolacije RNA (preglednica 9).

Preglednica 9: Seznam TSWV in COX začetnih oligonukleotidov in sond

Table 9: A list of TSWV and COX specific primers and probes

Ime začetnega oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje	Referenca
TSWV-CP-17F	5'- CTC TTG ATG ATG CAA AGT CTG TGA-3'	Boonham in sod., 2002
TSWV-CP-100R	5'- TCT CAA AGC TAT CAA CTG AAG CAA TAA-3'	Boonham in sod., 2002
TSWV-CP-73T	5'-FAM*- AGG TAA GCT ACC TCC CAG CAT TAT GGC AAG-TAMRA-3'	Boonham in sod., 2002
COX-F	5'- CGT CGC ATT CCA GAT TAT CCA-3'	Boonham (2003b) modificirano po Weller in sod. (2000)
COX-RW	5'- CAA CTA CGG ATA TAT AAG RRC CRR AAC TG-3'	Boonham (2003b) modificirano po Weller in sod. (2000)
COXSOL-1511T	5'-VIC*- AGG GCA TTC CAT CCA GCG TAA GCA- TAMRA-3'	Boonham (2003b) modificirano po Weller in sod. (2000)

V CSNV in TSWV specifičnih reakcijah PCR v realnem času smo uporabili pozitivne kontrole (rastlinski material, okužen z enim od obeh virusov) in vodo kot negativno kontrolo reakcije PCR v realnem času.

Končni volumen v reakcijah PCR v realnem času je bil 20 µl, sestavljal pa ga je 10 µl 2× TaqMan® univerzalne mešanice za PCR (TaqMan® Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems, ZDA), po 2 µl posameznih začetnih oligonukleotidov (900 nM) in 2 µl sonde (250 nM).

Po 16 µl pripravljene reakcijske mešanice smo nanesli na optično ploščico (Applied Biosystems, ZDA) in v vsako reakcijo pomnoževanja dodali 4 µl cDNA. Vsak vzorec smo na ploščico nanesli v treh ponovitvah. V prvo in zadnjo reakcijsko mešanico smo namesto cDNA dodali sterilno dH₂O, ki smo jo uporabili kot kontrolo kontaminacije (NTC – ang. »no template control«). Ploščico smo pokrili z lepljivo folijo, centrifugirali pri 1000 × g 1 min in jo vstavili v detektor ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, ZDA).

Standardni pogoji pomnoževanja so bili enaki, kot so že opisani v točki 3.1.6.2.

3.2.6.2.1 Analiza PCR v realnem času

Reakcije PCR v realnem času smo analizirali, kot je opisano v točki 3.1.6.2.2. Pozitivni na CSNV in/ali TSWV so bili tisti vzorci, kjer je bila ekstrakcija RNA dobro izvedena (C_t vrednosti za COX so bile 23 – 29) in kjer je bila C_t vrednost pri analizi na CSNV ali TSWV nižja od 38. Vzorci, ki so imeli C_t vrednosti enake ali večje od 40, so bili negativni zaradi razlogov, ki so že opisani v točki 3.1.6.2.2.

3.2.6.2.2 Določanje specifičnosti načrtovanih začetnih oligonukleotidov in sonde za CSNV

Da bi določili specifičnost načrtovanih začetnih oligonukleotidov in sonde za CSNV virus, smo preverili, če se z njimi pomnožuje tudi RNA drugih tospovirusov (TSWV in INSV). Uporabili smo rastlinski material s TSWV okuženih krizantem in testne rastline *N. rustica* ter testne rastline *N. benthamiana*, okužene z INSV.

Po analizi reakcij PCR v realnem času, kot je opisano v točki 3.2.6.2.1, smo videli, ali so naši načrtovani začetni oligonukleotidi res specifični za CSNV, ali pa morda reagirajo z RNA sorodnih tospovirusov.

4 REZULTATI

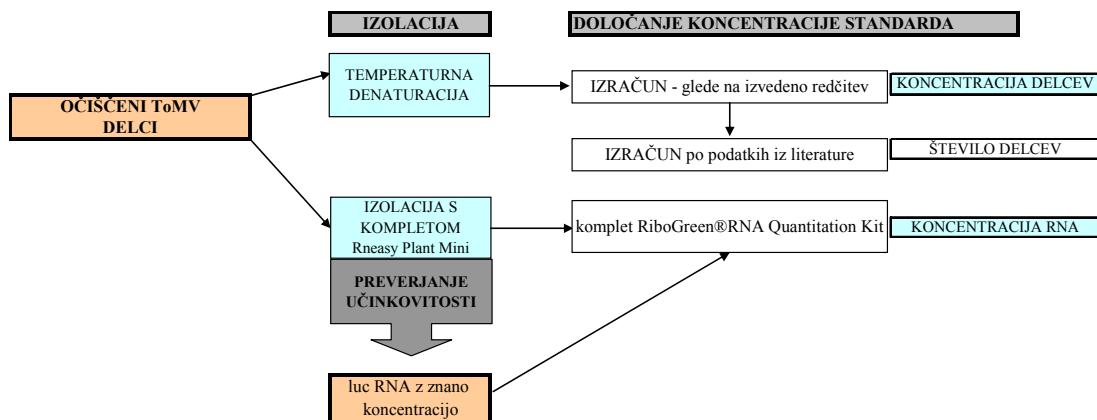
4.1 RAZVOJ DETEKCIJE IN KVANTIFIKACIJE ToMV S KVANTITATIVNIM PCR V REALNEM ČASU (qPCR)

4.1.1 Priprava očiščenih virusnih delcev ToMV

V propagacijskih rastlinah *Nicotiana clevelandii* smo namnožili ToMV-D viruse. Delce smo očistili iz okuženega rastlinsskega materiala po postopku, ki je vključeval več korakov ultracentrifugiranja. S spektrofotometrom smo določili koncentracijo delcev, ki je znašala 0,42 mg/ml. Delce ToMV v taki koncentraciji smo uporabili v nadaljnji poskusih, kjer smo razvijali metodo določanja prisotnosti in koncentracije ToMV.

4.1.2 Določanje količine virusnih delcev v standardu

Rezultati so razdeljeni na dva dela in sicer v prvem delu za primer, pri katerem smo iz standarda predhodno izolirali RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit in v drugem primeru, ko smo standard temperaturno denaturirali (slika 3). Rezultat je bila izbira primerne metode za določanje koncentracije ToMV v standardu za uporabo pri nadalnjem delu.



Slika 3: Shema poteka dela pri pripravi ToMV standarda.

Dvema različnima načinoma izolacije sta sledila dva načina določanja koncentracije.

Figure 3: Scheme of ToMV standard preparation. Two different procedures were followed by two different ways of determining the ToMV concentration.

4.1.2.1 Količina virusne RNA v standardu po izolaciji s kompletom

V tem primeru smo določali koncentracijo virusne RNA v ToMV standardu z RiboGreen® reagentom.

Najprej smo narisali umeritveno krivuljo s pomočjo ribosomalnega standarda z znano koncentracijo in pripadajočih izmerjenih vrednosti fluorescence pri 535 nm. Formula umeritvene krivulje, ki smo jo uporabili za izračun koncentracije RNA v vzorcu, je znašala: $y = 6,5786X - 117$.

Povprečna fluorescensa dveh ponovitev 20-krat redčenega vzorca ToMV standarda je bila 475,5. Glede na formulo, ki smo jo dobili s pomočjo umeritvene krivulje, je bila koncentracija ToMV RNA v standardu 90,06 ng/ml. Ko smo upoštevali še vse faktorje redčenja ($20 \times$ za redčenje vzorca in $2 \times$ za RiboGreen reakcijo), je bila osnovna koncentracija ToMV RNA po izolaciji s kompletom RNeasy Plant Mini Kit 3602,59 ng/ml.

Vse pripadajoče redčine ToMV RNA standarda so imele ustreznost manjšo koncentracijo.

4.1.2.1.1 Preverjanje izkoristka izolacije RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit

Z RiboGreen® reagentom smo izmerili fluorescenco luciferažne RNA z znano koncentracijo. Vrednost fluorescence, izmerjene pri 535 nm, ki je ustrezzala 1 ng/ μ l, je bila 1044,0.

Po izolaciji s kompletom RNeasy Plant Mini Kit, ki smo jo izvedli v dveh ponovitvah, smo izmerili dve končni vrednosti fluorescence: 855,5 in 705,0. Glede na začetno vrednost izmerjene fluorescence sta izkoristka izolacije v prvem primeru 81,9 % in v drugem primeru 67,5 %. Povprečni izkoristek izolacije z uporabljenim kompletom je tako 75,0%.

4.1.2.2 Količina virusnih delcev v standardu po izolaciji RNA s temperaturno denaturacijo

Očiščene ToMV delce s koncentracijo 0,42 mg/ml smo po temperaturni denaturaciji, opisani v točki 3.1.3.1.2, redčili v 20 mM NA pufru s pH 5,5. Pripravili smo serijo desetih 10-kratnih redčin, v katerih je vsaka vsebovala ustrezeno manj virusnih delcev. Koncentracija osnovnega vzorca je bila 0,42 mg/ml.

Velikost ToMV viriona je 40×10^6 Da (Huttinga in Rast, 1985). 1 Da je definiran kot $1/12 C^{12}$ atoma, ki ima molekulsko maso 12,0107 g/mol. Ker je v 1 molu N_A ($6,022137 \times 10^{23}$) delcev, masa 1 Da ustreza $1,66 \times 10^{-24}$ g.

Masa enega ToMV virusnega delca je tako $66,4 \times 10^{-15}$ mg, oziroma $66,4 \times 10^{-9}$ ng. Ustrezne koncentracije virusnih delcev v desetih 10-kratnih predhodno pripravljenih redčitvah lahko tako preračunamo na število delcev. Število ToMV virusnih delcev v 10-

krat redčenem vzorcu je po izračunih 6×10^{11} delcev/ml, v nadalnjih redčitvah pa ustrezn manj.

Najprej smo preizkusili izolacijo virusne RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit in s pomočjo ribosomalnega RNA standarda določili količino ToMV v virusnem standardu (slika 3). Koncentracija 3602,59 ng/ml je predstavljala koncentracijo RNA ToMV. Ob preverjanju izkoristka izolacije z omenjenim kompletom smo ugotovili, da je v povprečju izkoristek izolacije RNA po takem postopku 75%. Začetne koncentracije virusnih delcev bi bilo tako treba izračunavati, poleg tega pa bi na tak način dobili le podatke za količino oziroma koncentracijo virusne RNA.

4.1.3 Razvoj qPCR

4.1.3.1 Načrtovani začetni oligonukleotidi in sonda

Poravnava nukleotidnih zaporedij za CP in MP je pokazala, da so pri različnih sevih ToMV, ki smo jih primerjali, bolj ohranjena zaporedja za MP. To je pomenilo, da so zato tudi bolj primerna za načrtovanje začetnih oligonukleotidov in sonde ter tako za razvoj CSNV specifičnega testa, ki bi zajel čim večje število različnih sevov omenjenega virusa.

Za načrtovanje začetnih oligonukleotidov in MGB sonde smo uporabili objavljeno nukleotidno zaporedje za MP ToMV-K seva (AJ417701). Smiselni začetni oligonukleotid nalega na 5154. bp, protismiselni na 5225 bp, MGB sonda pa na 5202. bp objavljenega zaporedja. Protismiselni začetni oligonukleotid je načrtovan tako, da nalega na protismiselni verigi virusne cDNA (slika 4).



Slika 4: 72 bp dolg amplikon za specifično določanje ToMV.

Označeni so začetni oligonukleotidi in MGB sonda.

Figure 4: Amplicon of 72 bp for specific determination of ToMV. Primers and the MGB probe are marked.

4.1.3.2 Redčenje vzorcev pred ali po obratnem prepisovanju (RT)

RNA smo najprej izolirali, jo nato redčili, in vsako redčino posebej obratno prepisovali. Tako dobljeno cDNA smo pomnoževali v qPCR reakciji. Primerjalno smo obratno prepisali le osnovno, neredčeno RNA, in po RT reakciji redčili cDNA za qPCR reakcijo.

Prišlo je do razlik v učinkovitostih pomnoževanja v qPCR reakcijah (preglednica 10). Učinkovitost smo izračunali po formuli (2), opisani v točki 3.1.6.2.4, osnova za njeno izračunavanje pa je naklon umeritvene krivulje.

Preglednica 10: Primerjava v formulah umeritvene krivulje in učinkovitosti, kadar smo redčili RNA pred RT, oziroma cDNA po RT reakciji.

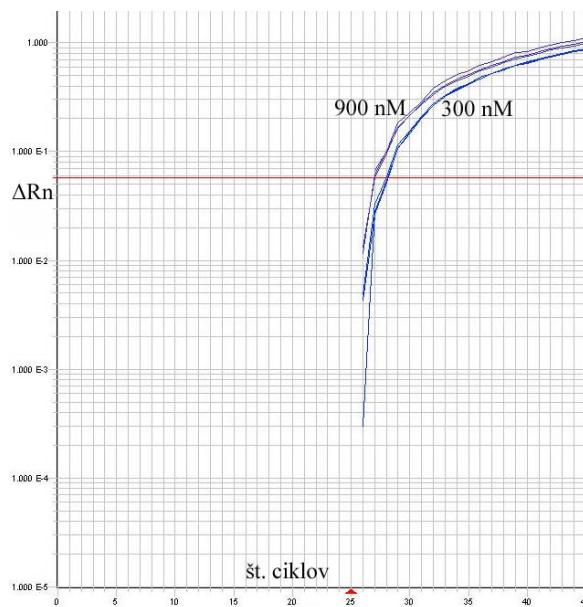
Table 10: A comparison of the standard curves and efficiencies where RNA was diluted before and cDNA after the RT step respectively.

	Redčena RNA	Redčena cDNA
Formula umeritvene krivulje	$y = -3,5157 \times X + 28,815$	$y = -3,7227 \times X + 33,352$
Učinkovitost (%)	92,5	85,6

Ugotovili smo, da je učinkovitost pri pomnoževanju vzorcev večja, kadar redčimo RNA pred RT reakcijo, kot pa če obratno prepišemo osnovni vzorec in po RT reakciji redčimo cDNA.

4.1.3.3 Optimizacija koncentracije začetnih oligonukleotidov in sonde v qPCR reakciji

Po pregledu qPCR reakcije, pri kateri smo uporabili različne koncentracije začetnih oligonukleotidov, smo ugotovili, da je najnižja koncentracija začetnih oligonukleotidov, kjer je ΔR_n (sprememba v signalu fluorescence) vrednost še nad 0,8, 300 nM (slika 5). Na podlagi tega rezultata smo v nadalnjih qPCR reakcijah uporabili 600 nM začetne oligonukleotide.

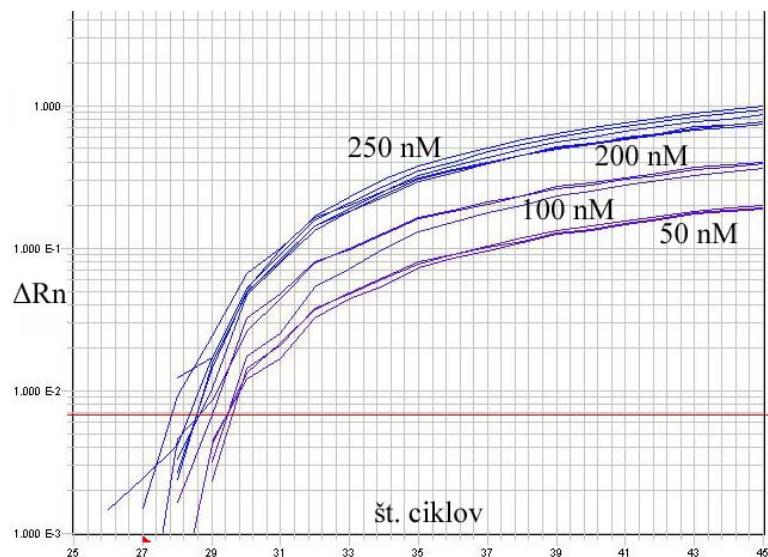


Slika 5: Optimizacija koncentracije začetnih oligonukleotidov.

Logaritemski krivulji, ki prikazujeta jakosti fluorescence molekule poročevalca v odvisnosti od števila ciklov qPCR reakcije za vzorec, pomnoževan s 300 nM oziroma 900 nM začetnimi oligonukleotidi. Krivulja je narisana v programu SDS 2.1.

Figure 5: Logarithmic curves, showing relative fluorescence signal of the reporter molecule in relation to the Ct of the qPCR reaction. The concentration of primers used was 300 nM and 900 nM respectively. SDS 2.1 software was used to produce these curves.

Pri optimizaciji koncentracije MGB sonde, smo primerjali 4 različne koncentracije: 50, 100, 200 in 250 nM. Po analizi reakcij (slika 6) smo se odločili, da bomo v naslednjih reakcijah qPCR uporabljali 200 nM sondo.



Slika 6: Optimizacija koncentracije sonde.

Logaritemske krivulje, ki prikazujejo jakost fluorescence molekule poročevalca v odvisnosti od števila ciklov qPCR reakcije za vzorec, pomnoževan s 50, 100, 200, oziroma 250 nM sondi. Krivulja je narisana v programu SDS 2.1.

Figure 6: Logarithmic curves, showing relative fluorescence signal of the reporter molecule in relation to the Ct of the qPCR reaction. The concentrations of the MGB probe used were from 50 nM to 250 nM. SDS 2.1 software was used to produce these curves.

4.1.3.4 Priprava ToMV standarda

S qPCR smo primerjali dva načina izolacije virusne RNA: če smo izolirali RNA s kompletom RNeasy Plant Mini Kit ali če smo izolirali RNA iz virusnih delcev s temperaturno denaturacijo pri 90°C 10 min.

Po primerjavi umeritvenih krivulj, kjer smo risali odvisnost Ct od koncentracije virusov v vzorcu, smo ugotovili, da je bila učinkovitost v primeru izolacije z denaturacijo 97,4 %, kjer je bila R^2 vrednost 0,92. V primeru izolacije s kompletom je bila učinkovitost 130 %, R^2 vrednost pa je znašala 0,82.

Glede na R^2 vrednost in na dejstvo, da je izkoristek izolacije s kompletom 75 %, smo se odločili, da bomo v nadalnjih poskusih virusne delce temperaturno denaturirali, saj je zanesljivost izvedenih meritev v tem primeru večja. Dodatna prednost denaturacije delcev je v tem, da je ta postopek časovno dosti manj potraten.

4.1.4 Izvedba qPCR analiz

Po optimizacijah smo v nadalnjih poskusih izvajali qPCR reakcije tako, da smo delce temperaturno denaturirali, pripravili redčine pred RT reakcijo in tako dobljeno cDNA analizirali s qPCR.

4.1.4.1 Meja detekcije, meja kvantifikacije in učinkovitost pomnoževanja ToMV specifičnega qPCR

qPCR rezultate, ki smo jih dobili na vzorcih z znano koncentracijo ToMV (standardu, pripravljenim iz očiščenih ToMV delcev), smo uporabili za pripravo umeritvenih krivulj. Vsako redčitev standarda smo v eni qPCR reakciji analizirali v treh ponovitvah. Primerjali smo 5 qPCR reakcij. Naklone umeritvenih krivulj smo uporabili za izračun učinkovitosti pomnoževanja v qPCR reakcijah in so znašale med -3,33 in -3,78. Učinkovitost je bila vedno nad 0,84, povprečna učinkovitost pomnoževanja pa je znašala 0,90. Vrednosti kvadratnega koeficienta (R^2) lineranih regresijskih krivulj so bile nad 0,987.

Preverili smo variabilnost rezultatov v tipični qPCR reakciji (intra-assay) ter primerjali rezultate vseh petih reakcij (inter-assay). Rezultati v preglednici 11 prikazujejo primerjavo za vzorce, kjer je koeficient variacije (CV) izračunan glede na preračunano koncentracijo ToMV v vzorcu. V preglednici so podane le izračunane CV vrednosti, celotna tabela s povprečnimi izračunanimi koncentracijami, standardnimi deviacijami in CV vrednostmi pa je priložena kot priloga D.

Preglednica 11: Primerjave podatkov qPCR v eni tipični reakciji (intra-assay) in med različnimi reakcijami (inter-assay).

Prikazujemo izračunano vrednost CV glede na izračunano koncentracijo ToMV v vzorcu. Pri primerjavi podatkov v eni reakciji so prikazani podatki za eno tipično reakcijo. Pri primerjavi med različnimi reakcijami pa smo primerjali 5 neodvisnih qPCR reakcij.

Table 11: Intra-assay (one typical run) and inter-assay (5 independent runs) comparisons of parameters used for determination of both LOQ and LOD

Hipotetična koncentracija ToMV (mg/ml)	Tip analize					
	Znotraj ene reakcije (intra-assay)	Med različnimi reakcijami (inter-assay)	Število pozitivnih reakcij (pozitivni / skupno število ponovitev) *	CV izrač. vrednosti konc. (%)	Število pozitivnih reakcij (pozitivni / skupno število ponovitev) **	CV izrač. vrednosti konc. (%)
$4,2 \times 10^{-3}$	3 od 3	10,9	5 od 5	17,7		
$4,2 \times 10^{-4}$	3 od 3	5,1	5 od 5	13,1		
$4,2 \times 10^{-5}$	3 od 3	10,7	5 od 5	19,3		
$4,2 \times 10^{-6}$	3 od 3	9,0	5 od 5	18,6		
$4,2 \times 10^{-7}$	3 od 3	16,0	5 od 5	13,7		
$4,2 \times 10^{-8}$	3 od 3	9,3	5 od 5	26,8		
$4,2 \times 10^{-9}$	3 od 3	28,1	5 od 5	76,5		
$4,2 \times 10^{-10}$	3 od 3	14,6	3 od 5	46,2 ^a		
$4,2 \times 10^{-11}$	1 od 3	/	0 od 5	/		
0 (vodna kontrola)	0 od 3	/	0 od 5	/		

* - Reakcija je bila pozitivna, kadar sta bili vsaj 2 od 3 ponovitev pozitivni ($C_t < 40$). Vsako redčitev smo analizirali v 3 ponovitvah.

** - qPCR reakcija je bila pozitivna, kadar sta bili vsaj 2 od 3 ponovitev pozitivni znotraj ene same reakcije. Primerjali smo 5 različnih, neodvisnih qPCR reakcij.

^a - Povprečno vrednost konc., SD in CV smo izračunali iz vseh 5 reakcij, da smo ugotovili variabilnost signala pri $4,2 \times 10^{-10}$ mg/mL of ToMV.

/ - prisotnosti virusa nismo zaznali

SD - standardna deviacija

CV - koeficient variacije

Ct - vrednost praga

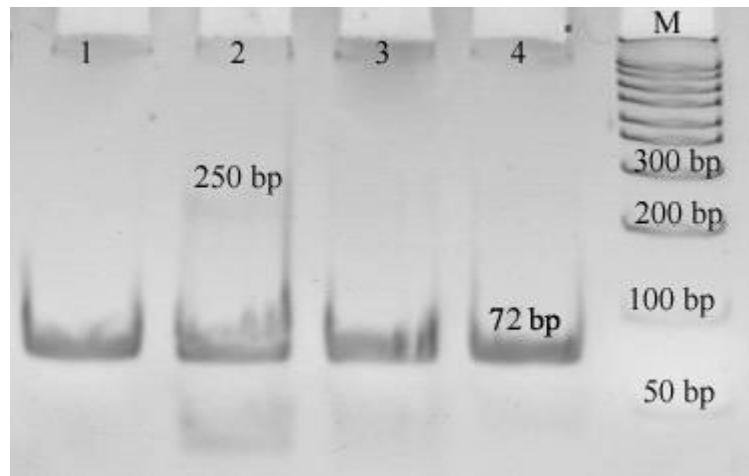
Ob primerjavi 5 različnih qPCR reakcij smo ToMV določili v vseh redčitvah, razen v eni: $4,2 \times 10^{-11}$ mg/ml. Vodna kontrola je bila v vseh reakcijah negativna.

ToMV v koncentraciji $4,2 \times 10^{-10}$ mg/ml je bil v 3 reakcijah od 5 pozitiven, zato je ta redčitev predstavljala mejo detekcije za naš test (LOD).

V primeru, ko smo računali CV glede na preračunano koncentracijo ToMV (preglednica 11), ki smo jo dobili iz posameznih umeritvenih krivulj, predstavlja mejo kvantifikacije (LOQ) koncentracija $4,2 \times 10^{-8}$ mg/ml, saj je vrednost CV tam še vedno pod 30%. Zgledovali smo se po načinu izračunavanja meja detekcije in kvantifikacije, ki so ga uporabili Burns in sod. (2004).

4.1.3.4 Specifičnost ToMV qPCR

Specifičnost qPCR analize vzorcev na prisotnost ToMV smo preverili z analizo produktov qPCR reakcije na 10% poliakrilamidnem gelu (slika 7). Na gelu smo pri vseh vzorcih opazili prisotnost specifičnega produkta qPCR reakcije, ki je imel pričakovano velikost 72 bp. Na gelu smo analizirali dva različna vzorca in sicer ToMV redčen v 20 mM NA pufru in ToMV v namakalni vodi. Med njima ni bilo opaznih razlik v velikost specifičnega produkta qPCR, ravno tako pa ni bilo med temo vzorcema razlik, če je qPCR reakcija potekala v prisotnosti ali v odsotnosti MGB sonde. Pri vzorcu ToMV v pufru, kjer je reakcija potekala brez sonde, smo opazili zelo šibko prisotnost 250 bp velikega produkta. Ker je naš sistem za detekcijo ToMV v vzorcih zasnovan tako, da uporabljam specifično sondu in ne nespecifičnih barvil (npr. SYBR®Green), ki zaznavajo prisotnost dvoverižnih molekul DNA, ta produkt ni motil našega končnega rezultata.



Slika 7: 10% poliakrilamidni gel, ki prikazuje prisotnost 72 bp dolgega produkta qPCR reakcije.

M – molekulski marker. 1 in 2 – ToMV redčen v 20 mM NA pufru. 3 in 4 – ToMV v vzorcu namakalne vode. 1 in 3 – qPCR reakcija je vsebovala ToMV specifično MGB sondu. 2 in 4 – qPCR reakcija ni vsebovala specifične MGB sonde.

Figure 7: 10 % polyacrylamide gel showing the presence of a specific 72 bp long fragment. M – marker. 1 and 2 – ToMV in 20 mM sodium acetate buffer. 3 and 4 – ToMV in environmental sample of irrigation water. 1 and 3 – real-time PCR reaction contained a ToMV specific TaqMan MGB probe. 2 and 4 – real-time PCR reaction did not contain a ToMV specific probe.

4.1.4 Priprava vzorcev namakalne vode za analizo

4.1.4.1 Razvoj metode za določanje količine ToMV v vzorcih vode

Metodo smo prilagajali na testiranje namakalne vode tako, da smo redčili očiščene virusne delce v vodi iz okolja. Uporabili smo vodo iz reke Vipave.

Ob primerjavi 4 ločenih poskusov (qPCR reakcij), kjer smo vsako redčitev virusnih delcev analizirali v treh ponovitvah, smo določili LOD, LOQ in učinkovitost pomnoževanja. Pri izračunavanju LOD in LOQ smo ponovno kot izhodišče vzeli način, ki so ga opisali Burns in sod. (2004). Ugotovili smo, da je bila LOD v tem primeru nižja, in sicer je znašala $4,2 \times 10^{-5}$ mg/ml. LOQ je tudi bila nižja, saj je znašala $4,2 \times 10^{-4}$ mg/ml. Pri koncentraciji, ki predstavlja našo LOQ, je bila CV vrednost 30%, pri LOD pa je bila 44%.

Nakloni umeritvenih krivulj so bili med -3,54 in -6,28, povprečna učinkovitost pomnoževanja v qPCR reakciji je bila 0,64 in vedno nad 0,44, vrednosti R^2 pa so bile nad 0,835.

Glede na rezultate smo vse nadaljnje vzorce namakalne vode analizirali tako, da smo redčitve pripravljali v 20 mM Na-acetatnem pufru pH 5,5.

4.1.4.2 Uporaba CIM® monolitnih kromatografskih nosilcev za koncentriranje vzorcev namakalne vode

Občutljivost metode smo povečali tako, da smo priredili koncentriranje virusov s CIM® monolitimi kromatografskimi nosilci za koncentriranje namakalne vode kot korak pred testiranjem na prisotnost ToMV s qPCR. Kramberger in sod. (2004) so CIM® monolitne kromatografske nosilce uspešno uporabili za koncentriranje infektivnih ToMV iz vodovodne vode.

4.1.4.2.1 Priprava elucijske kromatografske frakcije na analizo s qPCR

Pri pripravi kromatografskih frakcij na kasnejšo analizo s qPCR smo se morali na učinkovit način odstraniti inhibitorni vpliv NaCl iz elucijske frakcije.

Ker smo že s prejšnjimi poskusi pokazali, da so rezultati zanesljivejši, kadar redčimo vzorec RNA pred RT reakcijo, smo morali korak razsoljevanja združiti s korakom redčenja. S tem, ko smo primerjali naklone umeritvenih krivulj in R² koeficientov, smo ugotavljali, katera metoda razsoljevanja je najbolj primerna in ali je bolje vzorce redčiti pred ali po razsoljevanju.

Preglednica 12: Primerjava naklonov umeritvenih krivulj in R² koeficientov pri vzorcih, ki smo jih razsoljevali na različne načine in redčili pred ali po razsoljevanju

Table 12: A comparison of the slopes and R² coefficients of different standard curves, obtained after different desalting procedures before or after diluting the samples

POSTOPEK PRIPRAVE ELUCIJSKE FRAKCIJE	Metoda razsoljevanja	Naklon umeritvene krivulje	R ² (kvadratni koeficient linearne regresijske krivulje)
Razsoljevanje pred redčenjem	Etanolno obarjanje	-4,29	0,9950
	Gelska filtracija	-3,89	0,9977
Redčenje pred razsoljevanjem	Etanolno obarjanje	-3,77	0,8811
	Gelska filtracija	-3,44	0,8493
	Samo redčenje	-3,99	0,9981

V primeru, ko smo vzorec le redčili v 20 mM NA pufru s pH 5,5, ki ni vseboval NaCl, smo izračunali najvišji koeficient R². Poleg tega, da je ta metoda najbolj zanesljiva, je tudi časovno najmanj potratna, zato smo jo uporabili v vseh nadaljnjih poskusih, kjer smo analizirali elucijske kromatografske frakcije.

4.1.4.2.2 Učinkovitost CIM za koncentriranje vzorcev namakalne vode

V preglednici 13 so predstavljeni rezultati uporabe CIM nosilcev za koncentriranje vzorcev namakalne vode, ki smo ji dodali različno količino virusnih delcev. Voda iz reke Gradaščice, v katero nismo dodali virusnih delcev je služila kot negativna kontrola. Vzorce smo analizirali pred in po koncentriranju in tako preverili učinkovitost uporabljenih kromatografskih nosilcev.

Preglednica 13: Analiza treh vzorcev vode z znano koncentracijo ToMV s qPCR in vpliv postopka koncentriranja s CIM

Table 13: QPCR analysis of 3 samples with known ToMV concentration and the effect of the concentrating procedure using CIM

Vzorec	S qPCR ocenjena koncentracija ToMV (mg/ml)	
	Pred koncentriranjem s CIM	Po koncentriranju s CIM
Gradaščica (kontrola)	negativna	negativna
Gradaščica + 10 µl ToMV s konc. $1,3 \times 10^{-4}$ mg/ml	$3,31 \times 10^{-9}$	$2,99 \times 10^{-7}$
Gradaščica + 1000 µl ToMV s konc. $1,3 \times 10^{-4}$ mg/ml	$1,76 \times 10^{-7}$	$2,45 \times 10^{-5}$

Vzorcu, ki je vseboval nižjo koncentracijo virusnih delcev pred koncentriranjem, je po tem postopku koncentracija narasla za dva reda velikosti, pri čemer je bil volumen elucijske frakcije 9,2 ml. Ravno tako je za dva reda velikosti narasla koncentracija vzorca, ki je imel večjo začetno koncentracijo, volumen elucijske frakcije pa je v tem primeru znašal 8,5 ml. Negativna kontrola je bila pred in po postopku koncentriranja s CIM negativna, elucijska frakcija pa je obsegala 9,0 ml.

4.1.5 Testiranje vzorcev namakalne vode

S qPCR smo analizirali vzorce namakalne vode, odvzete na različnih lokacijah. Vzorce smo tudi koncentrirali z uporabo CIM kromatografskih nosilcev in nato analizirali kromatografske frakcije. Podatki o koncentraciji virusnih delcev se nanašajo na osnovni vzorec (pred koncentriranjem) in na elucijsko frakcijo (po koncentriranju). Koncentracijo ToMV v vzorcu smo določili z uporabo redčitvene vrste virusa.

Preglednica 14: Analiza vzorcev namakalne vode s ToMV specifičnim qPCR pred in po postopku koncentriranja s CIM.

Rezultati prisotnosti ToMV v vzorcih po koncentriranju se nanašajo na prisotnost ToMV v elucijski frakciji.

Table 14: Analysis of irrigation water samples with ToMV specific qPCR before and after concentrating procedure using CIM. The results of ToMV concentrations after the concentrating procedure correspond to ToMV concentration in the elution fraction.

Vzorec (čas vzorčenja)	Osnovni vzorec		Vzorec po koncentriranju	
	Rezultat	Ocenjena koncentracija ToMV (mg/ml)	Rezultat	Ocenjena koncentracija ToMV (mg/ml)
Celje – rastlinjak (2004)	+	$2,0 \times 10^{-8}$	+	$2,4 \times 10^{-5}$
Drava (2004)	+	$3,2 \times 10^{-9}$	+	$4,5 \times 10^{-8}$
Gradaščica (2004 / 2005)	-	Pod LOD	-	Pod LOD
Ivanci – gramožnica (2005)	+	$3,8 \times 10^{-6}$	+	$2,0 \times 10^{-4}$
Krka (2004)	-	Pod LOD	+	$3,0 \times 10^{-4}$
Krka (2005)	-	Pod LOD	+	$1,7 \times 10^{-4}$

Prisotnost ToMV v osnovnih vzorcih namakalne vode smo zaznali v 3 primerih: pri namakalni vodi, vzorčeni v rastlinjaku, kjer je bila že prej dokazana okužba rastlin s ToMV; v vodi iz reke Drave in v vzorcu vode iz gramožnice v Ivancih. Koncentracija ToMV vseh teh vzorcev se je po postopku koncentriranja s CIM povečala.

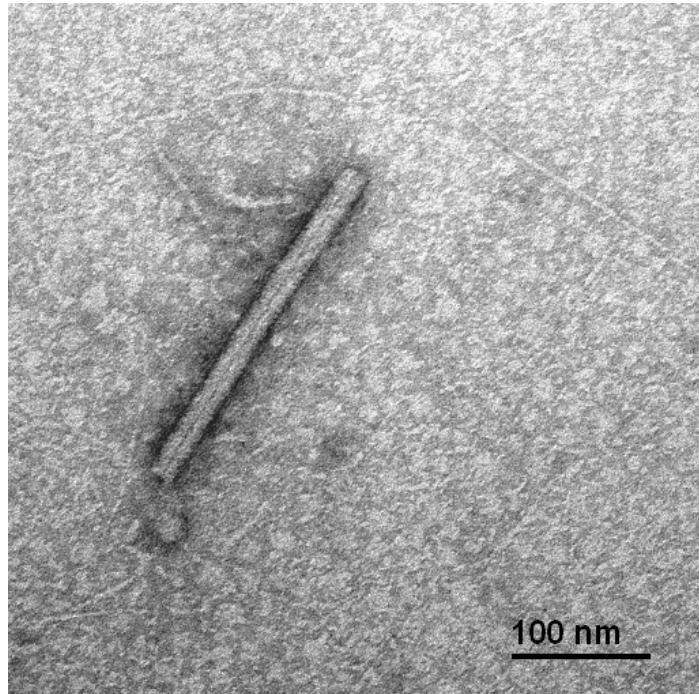
Namakalno vodo iz reke Krke smo analizirali v dveh zaporednih letih, obakrat smo dobili podoben rezultat: pred koncentriranjem je bil vzorec negativen na prisotnost ToMV, po koncentriranju pa smo virus zaznali v vzorcu.

V vzorcu vode iz reke Gradaščice nismo zaznali prisotnosti ToMV tako pred kot po koncentriranju.

Koncentracije ToMV v elucijskih frakcijah so večje od koncentracij ToMV v osnovnem vzorcu vode. Njihove koncentracije se razlikujejo od 1 (v reki Dravi) do 6 (reka Krka) redov velikosti. Začetno koncentracijo ToMV v osnovnem vzorcu vode iz reke Krke smo ocenili na 10^{-10} mg/ml, kajti ta vrednost je za nas predstavljala mejo detekcije.

4.1.5.1 Preverjanje infektivnosti virusnih delcev v elucijski kromatografski frakciji

V elucijski frakciji namakalne vode iz gramoznice Ivanci, smo z uporabo ISEM mikroskopije dokazali prisotnost celih, nepoškodovanih virusnih delcev ToMV (slika 8).



Slika 8: ToMV v elucijski frakciji (Foto: Tušek-Žnidarič)

Figure 8: ToMV in elution fraction (Photo: Tušek-Žnidarič)

3 tedne po mehanski inokulaciji testnih rastlin *N. glutinosa* smo v rastlinah, ki so na inokuliranih listih kazale blaga znamenja rumenenja, s specifičnim kvalitativnim PCR v realnem času določili prisotnost ToMV virusnih delcev (preglednica 15). Zanimalo nas je tudi, če je jakost bolezenskih znamenj odvisna od prisotnosti virusnih delcev, zato smo relativno primerjali vzorce med seboj glede na Ct vrednosti, ki smo jih določili s specifično analizo. V testu smo uporabili vodno kontrolo reakcije PCR v realnem času, ki je služila kot negativna kontrola.

Preglednica 15: Vzorci testnih rastlin, analiziranih na ToMV.

Prikazujemo vrednosti Ct in končni rezultat, kajti v tem primeru smo opravili kvalitativno analizo. List 1 je imel MANJ, list 2 pa BOLJ izražena bolezenska znamenja (rumenenje listov).

Table 15: Test plants, analyzed for the presence of ToMV. A qualitative analysis was performed and therefore Ct values are presented along with the end result. Leaf 1 was less symptomatic than leaf 2.

Vzorec	Vrednost Ct	Rezultat
List 1 – osnovni	27,19	+
List 1 – 10× redčen	31,76	+
List 2 – osnovni	22,71	+
List 2 – 10× redčen	27,58	+

Pokazali smo, da so bili ToMV delci iz elucijske frakcije infektivni in da so povzročili pojav bolezenskih znamenj na testnih rastlinah. Če smo medsebojno primerjali vzorca 1 in 2, kjer je imel slednji bolj izražena bolezenska znamenja (rumenenje mehansko inokuliranih listov), vidimo, da so vrednosti Ct nižje, iz česar bi lahko sklepali na večjo koncentracijo RNA ToMV virusov.

V nadaljevanju poskusa smo z DAS-ELISA analizirali dva inokulirana lista, od katerih je eden kazal pojav kloroz, drugi pa je imel na robu manjšo nekrotično lezijo. Kot kontrolo smo analizirali tudi en zgornji list, ki ni kazal bolezenskih znamenj. Odčitki po 2 h inkubacije niso presegli dvakratne vrednosti OD pufrske kontrole (0,348). Odčitki OD pri klorotičnem listu so znašali 0,122, pri listu z nekrotično lezijo pa 0,109. Vrednost OD za zgornji, nesimptomatični list, je znašala 0,131 in tudi ni presegla dvakratne vrednosti pufrske kontrole.

Sklepali smo, da v inokuliranem, simptomatičnem listu, ki je kazal znamenja kloroz z DAS-ELISA, nismo zaznali prisotnosti ToMV zato, ker je morda metoda manj občutljiva. Metodi smo direktno primerjali v nadaljevanju, rezultati pa so prikazani v točki 4.1.6. V primeru inokuliranih testnih rastlin pa smo v ponovnem PCR v realnem času analizirali inokuliran list, ki je kazal znamenja kloroz in smo ga predhodno analizirali z DAS-ELISA, nov, inokuliran klorotični list in en zgornji list, ki ni kazal pojava bolezenskih znamenj. V tem primeru smo izvedli qPCR analizo, standard so predstavljali ToMV delci, ki smo jih redčili v 10-krat redčeni RNA, ki smo jo izolirali iz sejanca *N. glutinosa*. Rezultati qPCR so prikazani v prilogi E. Koncentracija ToMV v inokuliranem, simptomatičnem listu, ki smo ga predhodno analizirali z DAS-ELISA, je znašala $1,6 \times 10^{-8}$ mg/ml, medtem, ko je bila za red velikosti višja v drugem, inokuliranem in prav tako simptomatičnem listu ($2,4 \times 10^{-7}$ mg/ml). Zgornji, nesimptomatični in neinokulirani listi, so imeli koncentracijo ToMV na meji detekcije – $3,0 \times 10^{-9}$ mg/ml.

4.1.5.2 Infektivnost ToMV v vzorcih namakalne vode

Po preverjanju celovitosti ToMV v elucijski frakciji in ko smo pokazali, da je z mehansko inokulacijo uspel prenos ToMV na testne rastline *N. glutinosa*, smo ugotavljali pojav bolezenskih znamenj v testnih rastlinah *N. clevelandii* in poskušali oceniti koncentracijo ToMV.



Slika 9 (LEVO): Slika bolezenskih znamenj na *N. clevelandii* po dvotedenskem zalivanju z namakalno vodo iz gramoznice Ivanci

Slika 10 (DESNO): Slika bolezenskih znamenj na *N. clevelandii* po dvotedenskem zalivanju z razredčeno elucijsko frakcijo namakalne vode iz gramoznice Ivanci

Figure 9 (left): Disease symptoms on *N. clevelandii* after two weeks of watering with irrigation water from gravel pit Ivanci

Figure 10 (right): Disease symptoms on *N. clevelandii* after two weeks of watering with diluted elution fraction of irrigation water from gravel pit Ivanci



Slika 11: Rastlina *N. clevelandii*, ki smo jo dva tedna zalivali z navadno vodovodno vodo, ki ne kaže nobenih bolezenskih znamenj

Figure 11: *N. clevelandii*, showing no symptoms after two weeks of watering with regular tap water

Po dveh tednih zalivanja z dokazano ToMV pozitivnima vzorcema vode (originalna namakalna voda iz gramoznice Ivanci in redčena elucijska frakcija istega vzorca namakalne vode), smo opazili pojav bolezenskih znamenj (sliki 9 in 10). Poskus zalivanja je zajemal tudi rastline *N. clevelandii*, ki smo jih zalivali z navadno vodovodno vodo. Po dveh tednih se pri rastlinah niso razvila tipična bolezenska znamenja (slika 11), ki se kažejo na slikah 9 in 10. Bolezenska znamenja se med zalivanimi rastlinami razlikujejo. Tiste, ki smo jih zalivali z originalno namakalno vodo (slika 9), kažejo bolj izrazito rumenjenje, vendar brez rahle kodravosti mladih lističev, prisotne pri rastlinah, ki smo jih zalivali z razredčeno elucijsko frakcijo (slika 10).

Opisane rastline smo analizirali s qPCR (priloga F). Pri tem smo upoštevali LOD za ToMV, ki smo ga upoštevali že prej – torej redčitev $4,2 \times 10^{-10}$ mg/ml. Umeritveno krivuljo smo pripravili tako, da smo očištene virusne delce redčili, tako kot je bilo že opisano, le da jih nismo redčili v 20 mM NA pufru, temveč v redčeni RNA, ki smo jo izolirali iz 1 teden starih sejancev rastlin *N. clevelandii*. Razlika je bila le v mediju, v katerem smo redčili očištene viruse, vse ostalo je bilo nespremenjeno. Ko smo določili vrednosti Ct po qPCR reakciji za vzorce rastlin tobakov, ki smo jih imeli v poskusu zalivanja, smo ugotovili, da je bila koncentracija ToMV največja v rastlinah, ki smo jih zalivali z razredčeno elucijsko frakcijo. Količino ToMV v tem vzorcu smo ocenili na $4,0 \times 10^{-9}$ mg/ml. Pri vzorcih, ki smo jih zalivali z originalno namakalno vodo iz gramoznice Ivanci, smo kljub bolj izrazitim bolezenskim znamenjem opazili, da so bile Ct vrednosti na meji s tistimi, ki so predstavljale našo LOD in nam zato niso dopuščale, da bi lahko ocenili količino ToMV v rastlini. Vse kontrolne rastline so imele Ct vrednosti pod tistimi, ki so ustrezale LOD.

4.1.6 Primerjava qPCR in DAS-ELISA za kvantifikacijo ToMV

Primerjali smo postopek kvantifikacije ToMV s qPCR, ki je za nas predstavljal kvantitativno metodo ter DAS-ELISO, ki je predstavljal serološko semikvantitativno metodo. Po analizi vzorcev smo ugotovili, da smo s qPCR določili ToMV do koncentracije $4,2 \times 10^{-8}$ mg/ml, z DAS-ELISO pa le do $3,1 \times 10^{-5}$ mg/ml (preglednica 16). V prilogi G so prikazani odčitki OD vrednosti štirih poskusov in pripadajoče umeritvene krivulje, ki smo jih uporabili za izračun koncentracij ToMV v vzorcih.

Preglednica 16: Primerjava qPCR in semikvantitativne DAS-ELISA.

(LOQ – meja kvantifikacije, LOD – meja detekcije, ■ – ToMV smo določili in kvantificirali v vzorcu, ○ – ToMV smo določili v vzorcu, NZ – kvantifikacija ToMV v vzorcu ni zanesljiva)

Table 16: A comparison of qPCR and semiquantitative DAS-ELISA. (LOQ – limit of quantification, LOD – limit of detection, ■ – ToMV was determined and quantified in the sample, ○ – ToMV was determined in the sample, NZ – quantification of ToMV was not reliable)

Metoda	Koncentracija ToMV (mg/ml)	Parametri	
		LOQ	LOD
qPCR	$4,2 \times 10^{-3}$	■	○
	$4,2 \times 10^{-4}$	■	○
	$4,2 \times 10^{-5}$	■	○
	$4,2 \times 10^{-6}$	■	○
	$4,2 \times 10^{-7}$	■	○
	$4,2 \times 10^{-8}$	■	○
	$4,2 \times 10^{-9}$	NZ	○
	$4,2 \times 10^{-10}$	NZ	○
	$4,2 \times 10^{-11}$	negativno	negativno
DAS-ELISA	$0,28 \times 10^{-3}$	■	○
	$0,93 \times 10^{-4}$	■	○
	$3,1 \times 10^{-5}$	■	○
	$3,4 \times 10^{-6}$	negativno	negativno

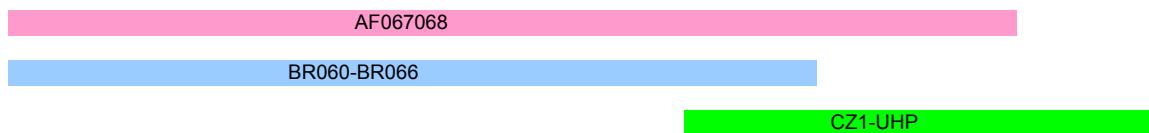
Molekularna metoda je bila za 3 redne velikosti bolj občutljiva od serološke, če smo primerjali LOQ, ob primerjavi LOD pa je bila za 5 redov velikosti bolj občutljiva.

V primeru, ko smo redčitveno vrsto pripravili v namakalni vodi, se je znižala občutljivost qPCR, pri DAS-ELISA testu pa je ostala nespremenjena. Tako smo s qPCR določili in kvantificirali ToMV do koncentracije $4,2 \times 10^{-5}$ mg/ml, z DAS ELISA pa do $3,1 \times 10^{-5}$ mg/ml. Ob nadalnjem redčenju vzorcev v 20 mM NA pufru, se je občutljivost qPCR povečala za 3 redne velikosti (na 10^{-8} mg/ml). Občutljivost DAS-ELISA se je povečala za 1 red velikosti in tako ni kazala tolikšnih razlik kot molekularna metoda.

4.2 RAZVOJ DETEKCIJE CSNV S PCR V REALNEM ČASU

4.2.1 Določanje nukleotidnega zaporedja CSNV izolata iz gerber

Nukleotidno zaporedje CSNV virusa na vzorcu gerbere smo določili tako, da smo izbrali začetne oligonukleotide, ki teoretično prekrijejo celotno zaporedje za virusni gen N (slika 12).



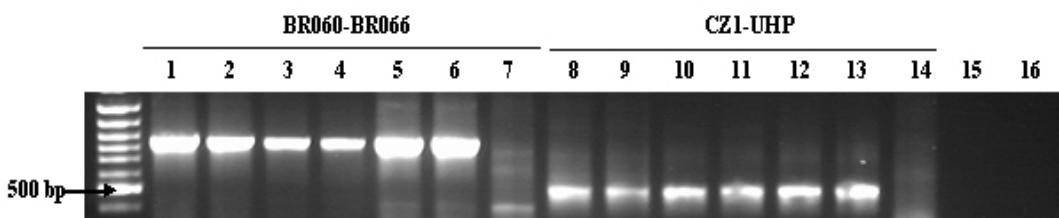
Slika 12: Shema naleganja uporabljenih parov začetnih oligonukleotidov (BR060-BR066 in CZ1-UHP) na objavljeno nukleotidno zaporedje za CSNV virusni gen N (AF067068)

Figure 12: A scheme of used primer-pairs (BR060-BR066 and CZ1-UHP) aligning to the published nucleotide sequence for CSNV N gene (AF067068)

Objavljeni nukleotidno zaporedje je dolgo 1053 bp. BR060-BR066 in CZ1-UHP produkta PCR se prekrivata v 140 bp in združena tvorita 1210 bp dolgo zaporedje (Bezzera in sod., 1999).

4.2.1.1 Rezultati PCR

RNA, ki smo jo izolirali iz vzorca gerbere, smo pomnožili z dvema paroma začetnih oligonukleotidov: BR060-BR066 in CZ1-UHP. Pomnožili smo tudi pozitivno kontrolo: RNA iz testne rastline *N. benthamiana*, okuženo s CSNV. Negativno kontrolo je predstavljala RNA iz zdrave krizanteme, vodo pa smo namesto RNA dodali v reakcijsko mešanico, kar nam je predstavljalo negativno kontrolo PCR (slika 13).



Slika 13: Rezultati PCR reakcije z BR060-BR066 in CZ1-UHP paroma začetnih oligonukleotidov.

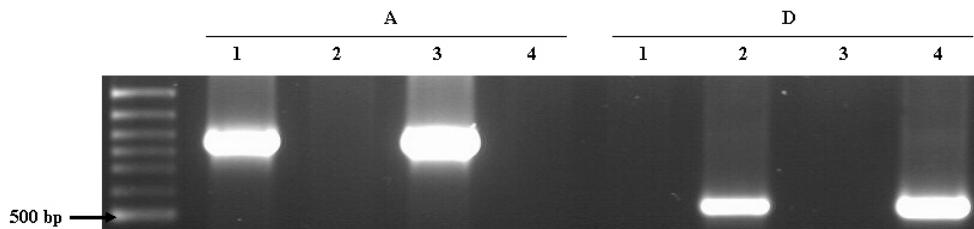
1, 2, 8 in 9 – 1:10 redčena RNA iz gerbere; 3, 4, 10 in 11 – 1:100 redčena RNA iz gerbere; 5, 6, 12 in 13 – RNA iz *N. benthamiana*; 7 in 14 – RNA iz zdrave krizanteme; 15 in 16 – vodna kontrola.

Figure 13: The results of PCR reaction using BR060-BR066 and CZ1-UHP primer-pairs. 1, 2, 8, and 9 – gerbera RNA diluted 1:10; 3, 4, 10, and 11 – gerbera RNA, diluted 1:100; 5, 6, 12, and 13 – *N. benthamiana* RNA; 7 and 14 – RNA from healthy chrysanthemum; 15 and 16 – water control.

Glede na pozitivne rezultate pri vzorcu gerbere (850 bp dolg BR0660-BR066 in 500 bp dolg CZ1-UHP produkt PCR) in ustreznost vseh kontrol (slika 13), smo se odločili, da bomo iz agaroznega gela izrezali produkte, kjer smo pomnoževali 1:10 redčeno RNA.

4.2.1.2 Preverjanje prisotnosti vstavljenega produkta PCR v transformiranih bakterijah

Po transformaciji kompetentnih celic *E. coli* DH5 α smo preverili prisotnost vstavljenih produktov PCR (slika 14).



Slika 14: PCR iz bakterijskih kolonij z vstavljenimi plazmidi.

A – bakterije so bile transformirane s plazmidom, ki naj bi vseboval BR-060-BR066 produkt PCR (850 bp); D - bakterije so bile transformirane s plazmidom, ki naj bi vseboval CZ1-UHP produkt PCR (500 bp).

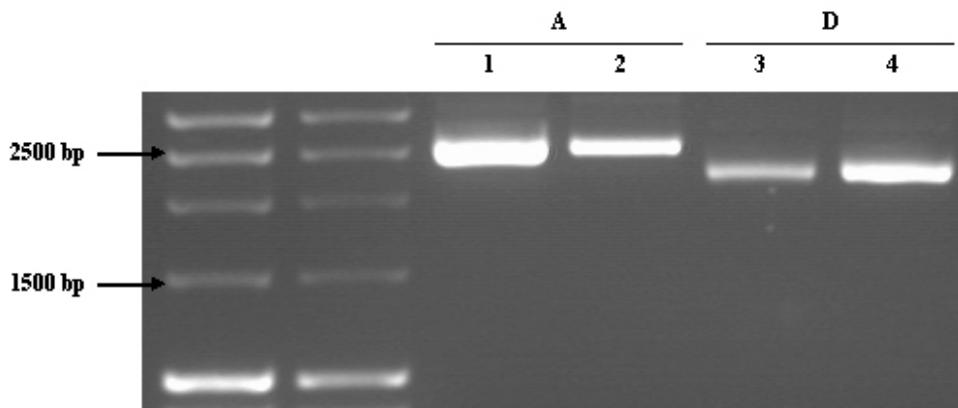
Figure 14: A colony PCR of colonies containing the plasmid. A – colonies transformed with plasmid, containing BR-060-BR066 PCR product (850 bp); D – colonies, transformed with plasmid, containing CZ1-UHP PCR product PCR (500 bp).

Po PCR reakciji smo pozitivne rezultate dobili pri kolonijah 1 in 3 v primeru vstavljenega BR060-BR066 produkta PCR in pri kolonijah 2 in 4 v primeru vstavljenega CZ1-UHP produkta PCR.

V naslednjem koraku smo se zaradi večje jakosti PCR produktov (slika 14) odločili za izolacijo plazmidne DNA iz kolonij A3 in D4.

4.2.1.3 Izolacija plazmidne DNA

Izolacijo smo naredili v dveh ponovitvah in preverili izolirane plazmide na agaroznem gelu (slika 15).



Slika 15: Izolirana plazmidna DNA.

A – plazmidi, ki vsebujejo daljši produkt PCR (850 bp); D – plazmidi, ki vsebujejo krajši produkt PCR (500 bp).

Figure 15: Isolated plasmid DNA. A – plasmids, containing a 850 bp PCR product; D – plasmids, containing a 500 bp PCR product.

Iz obeh kolonij smo uspešno izolirali plazmidno DNA. Do razlike v velikosti plazmida z vstavljenim enim oziroma drugim produkтом PCR je prišlo zaradi velikost samih vstavljenih produktov PCR.

V sekvenčni reakciji, ki je sledila, smo uporabili DNA iz plazmidov A1 in D4, katerih koncentracija je bila večja kot pri A2 in D1 (slika 15).

4.2.1.4 Nukleotidno zaporedje CSNV z gerbere

Po sekvenčni reakciji smo dobili 637 bp dolgo nukleotidno zaporedje CSNV z gerbere. Če smo naredili BLAST (»Basic Local Alignment Search Tool«) analizo, je bilo ujemanje z že objavljenim nukleotidnim zaporedjem 98%. Nanj nalega 636 nukleotidov, ki se začne na 203. nukleotidu in konča na 838. nukleotidu (priloga B). Do razlik med primerjanimi odseki prihaja v 10 nukleotidih.

4.2.2 Razvoj za CSNV specifičnega kvalitativnega PCR v realnem času

S pomočjo računalniškega programa smo načrtovali začetne oligonukleotide in MGB sondu. Upoštevali smo kriterije, naštete v točki 3.1.5.2.

Smiseln začetni oligonukleotid nalega na 215. bp, protismiseln na 284. bp, sonda pa na 241. bp objavljenega zaporedja gena N AF067068. Protismiseln začetni oligonukleotid je načrtovan tako, da nalega na protismiseln verigi virusne cDNA (slika 16).



Slika 16: 70 bp dolg amplikon za specifično določanje CSNV.

Označene so pozicije začetnih oligonukleotidov in MGB sonde.

Figure 16: CSNV specific amplicon of 70 bp. The positions of both primers and the MGB probe are marked.

4.2.3 Določanje CSNV in TSWV v rastlinskih vzorcih

Rastline, za katere je obstajal sum na okužbo s Tospovirusi, smo testirali na prisotnost CSNV in TSWV (preglednica 17). Sum smo določili na podlagi izraženih bolezenskih znamenj in znanih gostiteljskih rastlin. Pri krizantemah, kjer smo viruse določali v različnih delih rastlin, smo imeli na razpolago celo rastlino v lončku. Pri ostalih vzorcih smo analizirali le liste.

Uspešnost predhodne izolacije RNA iz vzorcev smo preverili s PCR v realnem času, specifičnim za COX, ki predstavlja rastlinsko notranjo kontrolo. Ekstrakcija je bila uspešna, če so bile Ct vrednosti za COX v intervalu, ki je opisan v točki 3.2.6.2.1 (priloga C).

Preglednica 17: Seznam analiziranih rastlin, v katerih smo določali prisotnost CSNV in TSWV z rezultati.

Povprečne vrednosti Ct so prikazane le za krizantemi 1001 in 645, kjer smo primerjali različne dele rastline.

Table 17: A list of plants, analysed for the presence of CSNV and TSWV. Average Ct values are shown only for chrysanthemums 1001 and 645 in which the results for different plant parts were compared.

Vzorec	Analizirani del rastline	CSNV rezultat (Ct) in <SD>	TSWV rezultat (Ct) in <SD>
krizantema 1000 - TSWV kontrola	listi	-	+
krizantema 800 - CSNV kontrola	listi	+	-
negativna krizantema – negativna kontrola	listi	-	-
paprika 1	listi	-	-
paprika 2	listi	-	-
paprika 3	listi	-	-
negativna paprika	listi	-	+
krizantema 1001	listi	+ (24,8) <0,13>	+ (28,1) <0,19>
krizantema 1001	steblo	+ (27,8) <0,19>	+ (28,0) <0,22>
krizantema 1001	korenine	- (/)</>	+ (24,8) <0,09>
gerbera	listi	+	-
negativna gerbera	listi	-	-
krizantema 645	listi	+ (27,0) <0,66>	+ (30,5) <0,93>
krizantema 645	steblo	+ (30,5) <0,57>	+ (33,2) <1,35>
krizantema 645	korenine	- (/)</>	+ (35,8) <1,38>
paradižnik 1	listi	-	+
paradižnik 2	listi	-	+
negativni paradižnik	listi	-	-
krizantema A	listi	-	+
krizantema B	listi	-	-
krizantema C	listi	-	+
krizantema D	listi	-	+
krizantema E	listi	-	+
verbena 1	listi	-	-
vrebena 2	listi	-	-
Tobak - <i>N. tabacum</i> WB - okužen z gerbero	listi	+	-
Tobak - <i>N. benthamiana</i> - CSNV kontrola	listi	+	-

Rezultati so pokazali, da lahko s PCR v realnem času v listih in steblu krizantem 1001 in 645 določimo CSNV in TSWV. Pozitivne kontrole so pričakovano delovale in niso navzkrižno reagirale. Edina kontrola, ki ni delovala v skladu s pričakovanimi rezultati, je bila negativna kontrola paprike. Ta je bila po PCR v realnem času pozitivna na TSWV. Pri analizi listov krizanteme 1001 na CSNV smo v primerjavi s stebлом opazili nižje Ct vrednosti. Analize na prisotnost TSWV pa so pokazale najnižje Ct vrednosti pri koreninah in približno enake vrednosti v listih in v steblu. Pri krizantemi 645 smo v listih pri analizi na prisotnost CSNV zasledili nižje Ct vrednosti kot pri analizi vzorcev steba, v koreninah pa prisotnosti virusa nismo zaznali. Pri testiranju krizanteme 645 na prisotnost TSWV je bilo le-tega največ v listih (najnižje vrednosti Ct) in najmanj v koreninah (najvišje vrednosti Ct) (preglednica 17).

V nadaljevanju smo želeli pokazati, da je metoda PCR v realnem času, ki smo jo razvili za ugotavljanje prisotnosti CSNV v vzorcih, res specifična in ne reagira s sorodnimi Tospovirusi.

4.2.3.1 Specifičnost PCR v realnem času za določanje CSNV

Za določanje specifičnosti CSNV smo analizirali testne rastline, predhodno mehansko inokulirane z različnimi Tospovirusi. Izbrali smo si testne rastline, okužene s CSNV, TSWV in INSV (preglednica 18).

Preglednica 18: Določanje specifičnosti za CSNV specifičnega PCR v realnem času

Table 18: Determination of specificity of real-time PCR for CSNV

Vzorec	CSNV rezultat	TSWV rezultat
<i>N. benthamiana</i> - CSNV kontrola	+	-
<i>N. rustica</i> - TSWV kontrola	-	+
<i>N. benthamiana</i> - INSV kontrola	-	-

Rezultati niso pokazali nobene navzkrižne reaktivnosti načrtovanega PCR v realnem času za določanje CSNV in privzetega (Boonham in sod., 2002) PCR v realnem času za določanje TSWV.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.2 Nizke koncentracije rastlinskih virusov in njihovo določanje

V rastlinski virologiji za diagnostiko uporabljajo različne metode, ki se med seboj razlikujejo v zanesljivosti, zahtevnosti in dolgotrajnosti. Občutljivost in specifičnost metode sta ključna dejavnika, ki vplivata na zanesljivost metode. Ravno tako pa je pri diagnostiki rastlinskih virusov ključnega pomena čas, ki je potreben za dosego rezultata.

Kadar so rastlinski virusi, ki jih določamo v vzorcih, v nizkih koncentracijah ali pa so metode, ki so v splošni uporabi, nezanesljive (na primer navzkrižna reaktivnost protiteles) za določanje novih virusov, je ključen razvoj novih, občutljivih in zanesljivih metod.

V obeh delih naloge, tako pri kvantitativnem določanju ToMV kot pri kvalitativnem določanju CSNV, smo za določanje virusov uporabili molekularno metodo PCR v realnem času. Primerjali smo jo z (DAS)-ELISA, najbolj uporabljano diagnostično metodo v rastlinski virologiji. Razlog za primerjavo je bil v razvoju metode, ki ne temelji na seroloških značilnostih virusa in ki je morda tudi bolj občutljiva in bolj zanesljiva.

Zaradi narave molekularno-bioloških metod, pri katerih določanje temelji na lastnostih nukleinskih kislin, velja, da so te večinoma kratkotrajnejše od seroloških. Za diagnostiko patogenih mikrobov je ključnega pomena tudi hitrost same analize oziroma pot od vzorca do rezultata.

Rezultati prvega dela naloge kažejo na uspešnost metode PCR v realnem času za določanje prisotnosti in koncentracije rastlinskih virusov, ki so v vzorcih prisotni v zelo nizkih titrih (ToMV v namakalni vodi – preglednica 14). Rezultati drugega dela pa uspešno razlikujejo med serološko zelo podobnima CSNV in TSWV (preglednica 17).

Problem nizkih titrov virusnih delcev v vzorcih so različni avtorji reševali z različnimi načini koncentriranja osnovnih vzorcev oziroma z razvojem občutljivejših metod. Pri razvoju kvantitativnega PCR v realnem času (qPCR) smo uvedli dodatne metode (koncentriranje vzorca in priprava vzorca na analizo), ki smo jih prilagodili za vzorce namakalnih voda iz okolja. Pri razvoju PCR v realnem času za specifično določanje CSNV je bile pomembna predvsem specifičnost testa, zato smo analizirali različne gostiteljske rastline ter preizkušali navzkrižne reaktivnosti s sorodnimi virusi.

5.1.3 Kvantitativno določanje ToMV

5.1.3.1 Razvoj kvantitativne metode

Ugotovili smo, da je nukleotidno zaporedje za plaščni protein (CP) ToMV virusa v našem primeru precej heterogeno, kar pomeni, da z računalniškim programom PrimerExpress™ ni bilo mogoče načrtovati oligonukleotidnih začetnikov in sond, ki bi omogočale detekcijo različnih izolatov ToMV pri standardnih pogojih za potek reakcije PCR v realnem času. Zato smo zaradi večje homologije med primerjanimi nukleotidnimi zaporedji za gibalni protein (MP) ToMV virusa tam določili specifične začetene oligonukleotide in MGB sondno. Tovrstna sonda vsebuje na 5' koncu verige molekulo, imenovano »minor-groove binder«, s strukturo, ki ji omogoča vezavo z veliko afiniteto na mali graben verige DNA in tako preko Van der Waalsovih sil ter hidrofobnih in elektrostatičnih interakcij tvori stabilne duplekse z enoverižno DNA. Vezava take sonde na tarčno zaporedje je bolj točna in temperatura tališča (T_m) za nastali dupleks je višja (12 – 18 bp dolga sonda ima T_m med 65 °C in 70 °C) kot pri DNA, ki ni modificirana. Zaradi teh lastnosti so lahko pomnoževani odseki tarčnega nukleotidnega zaporedja (amplikoni) krajši, s čemer se poveča specifičnost načrtovanega testa (Afonina in sod., 1997; Kutyavin in sod., 2000). Vezava MGB sond na tarčno zaporedje je po navedbah Whiley in Sloots (2006) lahko odvisna od variabilnosti tarčnega zaporedja. Poročata o spremembri v jakosti fluorescence poročevalske molekule pri PCR v realnem času za določanje Respiratornega sincicijskega virusa (RSV – *Respiratory syncytial virus*) virusa, kar naj bi bilo koristno pri določanju neujemanj v nukleotidnem zaporedju, nekoristno pa v primeru diagnostike virusov, kjer želimo razlikovati med različnimi sevi istega virusa (Whiley in Sloots, 2006).

Po načrtovanju začetnih oligonukleotidov in sonde smo določili način priprave standarda za nadaljnje analize. Priprava standarda je bila ključna, saj smo kasneje v vzorcih žeeli določati tudi koncentracijo ToMV, zato smo morali določiti količino ToMV v standardu.

Mumford in sod. (2004) so primerjali serološko metodo ELISA in PCR v realnem času. Zanimal jih je le kvalitativni rezultat: koliko vzorcev je pozitivnih z eno ali z drugo metodo. V našem primeru smo žeeli določiti koncentracijo ToMV v vzorcu, zato nam izražanje rezultatov glede na količino RNA ni ustrezalo, kajti serološka in molekularno-biološka metoda temeljita na različnih principih detekcije. Medtem ko se qPCR za ToMV osredotoča na detekcijo virusne RNA, je DAS-ELISA usmerjena v določanje virusnega CP. Tako smo se odločili za drugačno izražanje količine ToMV v standardu, ki je temeljilo tudi na drugačnem principu izolacije RNA.

Virusne delce smo temperaturno denaturirali in tako sprostili virusno RNA. O podobnem načinu sproščanja virusne RNA so poročali že La Notte in sod. (1997), ki so s topotopno denaturacijo (pri 95 °C 10 min) rastlinskega soka iz floema sproščali RNA različnih virusov vinske trte. Koncentracijo v standardu smo preračunali glede na osnovno koncentracijo virusnih delcev, ki smo jo spektrofotometrično določili po postopku čiščenja virusnih delcev iz rastlinskega materiala. Podoben postopek temperaturne denaturacije virusnih delcev omenjajo tudi Suehiro in sod. (2005), ki so na tak način sprostili RNA iz Virus zelene lisavosti in mozaika kumar (CGMMV - *Cucumber green mottle mosaic virus*) virusnih delcev. Za ToMV delce velja (Huttinga in Rast, 1985), da pride do

denaturacije delcev, kadar so ti izpostavljeni temperaturi 90 °C za 10 min, zato smo mi uporabili tak postopek sproščanja virusne RNA. Koncentracijo virusnih delcev v različnih redčitvah standarda smo izračunali glede na znano osnovno koncentracijo ToMV delcev (0,42 mg/ml).

V naslednjem koraku optimizacije metode smo preverjali učinkovitost pomnoževanja v qPCR reakciji, kadar RNA redčimo pred postopkom obratnega prepisovanja in kadar redčimo cDNA po obratnem prepisovanju. Stahlberg in sod. (2004) so namreč ugotovili, da je v qPCR reakciji večja učinkovitost pomnoževanja, kadar je vzorec RNA razdeljen pred RT reakcijo. Kadar so razdelili cDNA po RT reakciji, je bila učinkovitost manjša. Do enakih zaključkov smo prišli z našim poskusom tudi mi, saj je iz preglednice 10 razvidno, da je tudi pri nas učinkovitost pomnoževanja večja (92,5 %), ko redčimo RNA pred RT reakcijo.

Do te faze smo ugotovili:

- da lahko izoliramo RNA iz standarda (vzorca) na dva različna načina: s kompletom za izolacijo in s temperaturno denaturacijo,
- da lahko v enem od teh primerov govorimo le o koncentraciji RNA v vzorcu, medtem ko jo lahko v drugem primeru izražamo kot mg ToMV / ml pufra,
- da je izražanje v mg/ml bolj primerno, kadar želimo primerjati metode, ki temeljijo na različnih principih detekcije,
- da je v qPCR reakciji pomnoževanje učinkovitejše, kadar redčimo RNA pred RT reakcijo.

V naslednji stopnji smo določili optimalno koncentracijo začetnih oligonukleotidov in MGB sonde v qPCR reakciji. Po principu, ki so ga navedli tudi Boonham in sod. (2002), smo ugotovili, da je za začetne oligonukleotide optimalna koncentracija v reakciji 600 nM, za MGB sondjo pa 200 nM. S takimi koncentracijami smo kasneje določili učinkovitost pomnoževanja v qPCR reakciji, kadar smo imeli izolirano RNA s kompletom ali pa s temperaturno denaturacijo. Vrednost R^2 (kvadratni koeficient linearne regresije) je bila ključni kriterij za določanje optimalnega načina izolacije RNA. Koeficient pove, kako dobro se vrednosti opravljenih meritev prilegajo krivulji linearne regresije. $R^2 = 1$ pomeni 100 % prileganje (Motulsky, 1995). R^2 koeficient je bil v našem primeru večji, kadar smo RNA izolirali s temperaturno denaturacijo. Poleg tega je bil ta postopek časovno manj zahteven in je omogočal bolj primerljivo izražanje količine ToMV v vzorcu z ostalimi metodami, zato smo se odločili, da bomo v vseh nadaljnjih analizah RNA iz vzorcev izolirali na omenjeni način.

Pripravili smo serijo 10-kratnih redčitev ToMV standarda v 20 mM NA pufru (pH 5,5) in vsako redčitev temperaturno denaturirali po zgoraj opisanem postopku. Takoj po sproščanju RNA iz virusnih delcev je sledilo obratno prepisovanje RNA v cDNA. Kuznetsov in sod. (2005) omenjajo, da prihaja pri Virusu mozaika tobaka (TMV - *Tobacco mosaic virus*), ki tudi spada v rod *Tobamovirus*, do tvorbe sekundarnih struktur virusne RNA. Pri inkubaciji njihovih vzorcev pri 65 °C za 15-30 min so opazili le enoverižne molekule RNA. Korak temperaturne denaturacije delcev standarda pri 90 °C 10 min je bil

zato za nas tudi korak, v katerem smo se želeli znebiti takih struktur in tako omogočiti čim bolj učinkovito obratno prepisovanje.

Ob primerjavi 5 ločenih qPCR poskusov smo določili mejo detekcije (LOD) in mejo kvantifikacije (LOQ). Zgledovali smo se po načinu, ki so ga opisali Burns in sod. (2004), kjer sta standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (CV) izračunana glede na koncentracijo analita (v našem primeru ToMV virusnih delcev) v vzorcu. Vzorec oziroma redčitev, pri kateri je CV še bila pod vrednostjo 30 % ali pa je bila njej enaka, je za nas predstavljala LOQ ($4,2 \times 10^{-8}$ mg/ml), LOD pa je predstavljala tisto koncentracijo ToMV, kjer CV ni presegel vrednosti 50 % in smo hkrati pri več kot polovici ločenih poskusov zaznali prisotnost ToMV ($4,2 \times 10^{-10}$ mg/ml) (preglednica 11 in priloga D).

Glede na rezultat, prikazan na sliki 7, smo pokazali, da je načrtovani kvantitativni test za določanje ToMV specifičen. Na poliakrilamidnem gelu smo opazili 250 bp velik nespecifični produkt qPCR reakcije, ki pa se je pojavil le v primeru, ko v qPCR reakcijo nismo dodali specifične sonde. Kadar je bila sonda prisotna, tega fragmenta nismo opazili. Zaradi naravnosti testa, kjer gre za spremljanje signala fluorescence molekule poročevalca in ne za določanje prisotnosti dvooverižnih fragmentov DNA, je omogočeno specifično določanje ToMV. Naš rezultat namreč kaže tudi na to, da se sonda ne veže na 250 bp velik produkt, kajti kjer koli je bila sonda vključena v qPCR reakcijo, nespecifičnega produkta ni bilo. Molekula poročevalca tako ni oddajala nespecifičnega signala.

5.1.3.2 Priprava vzorcev za analizo

Po ustreznih pripravah standarda in zanesljivo določenih mejah detekcije in kvantifikacije za kvantitativno določanje ToMV s qPCR, smo optimizirali pripravo vzorcev. Naši vzorci so bili vzorci namakalne vode iz okolja, kadar pa smo v postopek določanja ToMV vključili še korak koncentriranja, so naš drugi tip vzorcev predstavljale kromatografske frakcije.

Rafikova in sod. (2003) omenjajo, da prihaja pri ToMV virusih do agregacije pličnega proteina virusnih delcev. Ta je bila izrazito prisotna pri pH 5,6 pri sobni temperaturi, drugače pa velja, da so pri pH vrednostih, ki so manjše ali enake 6,0, prisotni dolgi, virusom podobni agregati, ki so jih poimenovali »ponovno polimeriziran protein«. Omenjajo, da je s spremembami temperature možno nadzirati stopnjo polimerizacije, zato smo v naš poskus uvedli dodaten korak temperaturne denaturacije. Za vzorce namakalne vode iz okolja je nemogoče ugotoviti, v kakšnih pogojih so se nahajali (kakšnemu terenu so bile izpostavljene, kolikšna je bila količina padavin, katere primesi vsebuje voda), zato smo sklepali na možno agregacijo virusnih delcev. Vzorec smo pred redčenjem denaturirali pri 90 °C 10 min s čimer smo zmanjšali napako pri redčenju, ki smo ga opravljali v naslednjem koraku. Priftakis in sod. (2003), ki so določali prisotnost Virusu BK (BKV – BK virus) v vzorcih urina, so svoje vzorce redčili in jih nato analizirali s PCR v realnem času, da bi izključili lažno negativne rezultate zaradi pojava inhibicije. Inhibiciji reakcije, ki smo jo opazili v primeru, da smo redčitveno vrsto virusa pripravili v namakalani vodi, smo se želeli izogniti, zato smo vse vzorce namakalne vode redčili v 20 mM NA pufru.

Uvodni korak denaturacije smo vpeljali tudi za analizo kromatografskih frakcij, kajti tudi tam se virusni delci nahajajo v pufru s pH 5,5, ki je po podatkih, ki jih navajajo Rafikova in sod. (2003), ugoden za agregacijo CP.

Prisotnost NaCl v elucijski frakciji otežuje nadaljnjo detekcijo ToMV, saj je eden izmed zaviralcov (inhibitorjev) PCR reakcije (Rossen in sod., 1992). Zaviralni vpliv smo žeeli odpraviti z razsoljevanjem elucijske frakcije. Odstranjevanje soli iz kromatografskih frakcij je zlasti pogosto pri izolacijah različnih proteinov. Tako na primer Tantipaiboonwong in sod. (2005) poročajo o uporabi PD-10 kromatografskih kolon za odstranjevanje soli iz vzorcev urina. Enake kolone smo v našem poskusu uporabili tudi mi ter primerjali postopek razsoljevanja z gelsko filtracijo z etanolnim obarjanjem.

Od razsoljevalnih metod, se je v našem primeru, ko smo primerjali razsoljevanje z etanolnim obarjanjem in z gelsko filtracijo, izkazalo slednje kot boljše (preglednica 14). Morda je razlog v slabši učinkovitosti razsoljevanja z etanolnim obarjanjem v tem, da je v mešanici za obarjanje poleg etanola prisoten tudi naterijev acetat s pH 5,5. Carbon (2005) namreč poroča, da prihaja do obarjanja soli iz morske vode, kadar so ji dodali HF kislino. V našem primeru bi tako lahko prišlo do nepopolnega razsoljevanja, kar lahko vpliva na analizo vzorca s PCR v realnem času.

V primerjalnem poskusu različnih načinov razsoljevanja, ki so našteti v preglednici 12, smo ugotovili, da dobimo najvišji R^2 koeficient v primeru, ko elucijsko frakcijo, kjer so prisotni virusni delci, le redčimo v pufru, ki ne vsebuje NaCl. Ugotovili smo tudi, da so na splošno rezultati bolj zanesljivi (R^2 vrednosti so višje), kadar vzorce redčimo pred postopkom razsoljevanja.

V nadaljevanju smo uporabili najpreprostejši način: le z redčenjem, saj je najbolj učinkovit in najkrajši.

Ugotovili smo, da moramo vzorce za analizo najprej temperaturno denaturirati, da razbijemo virusne aggregate, za katere sklepamo, da so nastali. Zaviralni vpliv NaCl, prisotnega v elucijskih kromatografskih frakcijah, na PCR reakcijo, najlažje in najučinkoviteje odstranimo tako, da vzorce redčimo v pufru, ki ne vsebuje soli (v našem primeru 20 mM NA pufer s pH 5,5). Pred izvedbo analize vzorce redčimo v pufru, da se izognemo kasnejšim lažno negativnim rezultatom.

5.1.3.3 Analiza vzorcev

Pred analizo vzorcev namakalne vode smo žeeli ugotoviti, kako prisotnost vode iz okolja vpliva na potek reakcije PCR v realnem času. Že v predhodnih poskusih smo pokazali, da je pred analizo treba izvesti temperaturno denaturacijo, s katero smo razbili nastale virusne aggregate.

V poskusu, kjer smo očiščene ToMV delce redčili v namakalni vodi iz reke Vipave (točka 4.1.4.1), smo ugotovili, da sta se znižali tako LOD (iz $4,2 \times 10^{-10}$ mg/ml na $4,2 \times 10^{-5}$ mg/ml) kot LOQ (iz $4,2 \times 10^{-8}$ mg/ml na $4,2 \times 10^{-4}$ mg/ml). Učinkovitost pomnoževanja v

qPCR reakciji je bila nižja in je v povprečju znašala 0,64 (64 %), R^2 koeficient, pa je v povprečju znašal 0,835.

Zaradi slabših parametrov pri analizi vzorcev, pri katerih ToMV določamo direktno v originalnem vzorcu namakalne vode, smo se odločili, da bomo v nadalnjih poskusih vse vzorce redčili v 20 mM NA pufru s pH 5,5, kajti v takem primeru se učinkovitosti pomnoževanja dvignejo, spustita pa se LOD in LOQ vrednosti (preglednica 11).

Izvedene analize so pokazale prisotnost ToMV v treh od šestih originalnih vzorcev namakalne vode (preglednica 14). Tako Branović in sod. (2003) kot Kramberger in sod. (2004) so poročali o učinkovitosti CIM® monolitnih kromatografskih nosilcev pri koncentriranju razredčenih vzorcev humanih ali rastlinskih patogenov. Za njihovo uporabo smo se odločili v tistih primerih, kjer ToMV nismo uspeli določiti v originalnem vzorcu namakalne vode.

Dosedaj izvedene raziskave, kjer je šlo za uporabo PCR v realnem času za določanje virusov v vodah, so se osredotočale predvsem na določanje humanih virusov (Monpoeho in sod., 2000; Beuret, 2004). Določanje rastlinskih virusov v namakalnih vodah so z RT-PCR metodo na MNSV izvedli Gosalves in sod. (2003), Kramberger in sod. (2004) pa so z uporabo DAS-ELISA ugotavljali prisotnost ToMV v namakalnih vodah. V našem delu smo prvič uporabili občutljivo metodo qPCR za določanje rastlinskih virusov v namakalnih vodah, kar je pomemben prispevek k izboljšavi detekcijskih metod za rastlinske viruse, kjer bi s pravočasno izvedeno diagnozo lahko preprečili pojav bolezenskih znamenj pri rastlinah in v končni fazi zmanjšali izgube pridelka.

5.1.3.3.1 Uporaba CIM kromatografskih nosilcev za koncentriranje vzorcev namakalne vode

Kramberger in sod. (2004) so pokazali uspešnost koncentriranja vzorcev vodovodne vode za 4 rede velikosti, kjer se je ToMV nahajal v koncentraciji, ki je bila pod mejo detekcije za serološko metodo ELISA. Branović in sod. (2003) pa so z njimi za 1 red velikosti povišali koncentracijo vzorcev virusov mumpsa in ošpic.

Preverili smo, če je v našem primeru uporabe vzorcev namakalne vode iz okolja primerna uporaba CIM kromatografskih nosilcev in kaj to pomeni za njihovo učinkovitost. Za razliko od Kramberger in sod. (2004), ki so redčili ToMV v vodovodni vodi, smo mi redčili ToMV v namakalni vodi iz reke Gradaščice. Iz preglednice 13 je razvidno, da so bili CIM kromatografski nosilci učinkoviti pri koncentriranju vzorcev namakalne vode iz okolja, in da so koncentracijo ToMV povečali za 2 reda velikosti.

Po preverjanju učinkovitosti CIM monolitnih kromatografskih nosilcev smo nadaljevali z analizo vzorcev namakalne vode, kjer v originalnih vzorcih nismo zaznali prisotnosti ToMV. Izkazalo se je, da smo dve leti zapored po koncentriranju s CIM zaznali prisotnost ToMV v vzorcu namakalne vode iz reke Krke. Na ta način smo dokazali ToMV v 5 od 6 vzorcih (preglednica 14) in le v reki Gradaščici nam ni uspelo določiti prisotnosti in koncentracije ToMV. Koncentracije ToMV so se v naših vzorcih s pomočjo CIM povečale od 2 do 6 redov velikosti, kar je v skladu z rezultati, ki so jih dobili Kramberger in sod.

(2004), ki so osnovni vzorec uspeli skoncentrirati za 4 rede velikosti. Občutljivost metode detekcije za virusa mumpsa in ošpic se je po navedbah Branović in sod. (2003) po koncentriranju s CIM povečala za štirikrat oziroma za en red velikosti: pri vzorcu virusa mumpsa s 1600 delcev/ml na 400 delcev/ml in pri vzorcu s 400 na 100 delcev/ml. Na učinkovitost CIM za koncentriranje vzorcev verjetno vpliva vrsta virusa, ki ga določamo, ravno tako pa vpliva nanjo medij, v katerem se virusi nahajajo pred koncentriranjem. To se da sklepati tudi iz naših rezultatov, saj je učinkovitost CIM pri nas odvisna od vzorca namakalne vode. V primeru reke Krke, ki smo jo analizirali v dveh zaporednih letih, se njihova učinkovitost ni spremenila.

Poleg CIM monolitnih kromatografskih nosilcev avtorji v primeru koncentriranja vzorcev za določanje prisotnosti različnih virusov opisujejo različne metode. Pri vseh gre za enak princip določanja virusov v končnem vzorcu: koncentriranje vzorca in analiza. Detekcijo norovirusov v tretiranih odplakah so s pomočjo dvofazne, ločevalne, koncentracijske metode uporabili Van den Berg in sod. (2005). Viruse so po koncentracijskem postopku, ki je trajal dva dni in ekstrakciji RNA iz skoncentriranega vzorca, določili z RT-PCR. Enako metodo za analizo so v primeru virusa *Hepatitis A* in rotavirusov uporabili Brassard in sod. (2005). Določali so jih po koncentriranju, kjer so virusne delce adsorbirali na pozitivno nabite filtre, jih od tam eluirali in eluat ponovno skoncentrirali. Iz koncentrata so s spremenjeno metodo izolirali RNA in analizirali vzorec.

Glavna razlika med metodami je v času, ki preteče od vzorčenja do končnega rezultata analize. Zgoraj opisana postopka (določanje norovirusov ter Hepatitis A in rotavirusov) sta večdnevna in vključujeta veliko korakov, medtem ko je postopek, ki smo ga uporabili mi, časovno manj zahteven. Vzorce namakalne vode lahko s pomočjo CIM monolitnih kromatografskih nosilcev skoncentriramo in elucijske frakcije analiziramo v enem dnevu s qPCR, pri čemer ne izvajamo posebej postopka ekstrakcije RNA.

5.1.3.3.2 Infektivnost ToMV v vzorcih in v elucijski frakciji

Pomen določanja virusov v namakalnih vodah se kaže v dejstvu, da so ToMV delci, ki se nahajajo v namakalni vodi, sposobni okužiti tako testne kot propagacijske rastline. Namakalno vodo iz gramoznice Ivanci smo koncentrirali s CIM kromatografskimi nosilci. Tudi po tem postopku so virusni delci ostali nepoškodovani (slika 8) in so po mehanski inokulaciji testnih rastlin povzročili pojav bolezenskih znamenj. Jakost izraženih bolezenskih znamenj je bila odvisna od Ct vrednosti glede na rezultate qPCR analize (preglednica 15), kar je povezano s koncentracijo ToMV v vzorcu. Lahko rečemo, da je bilo v listih, ki so bili bolj klorotični, relativno več ToMV kot v listih, ki so kazali manjši pojav klorotičnosti. Podobno so pokazali tudi Salmon in sod. (2002), ki so določali ACLSV v rastlinskih vzorcih, ki so pokazali odvisnost vrednosti Ct od jakosti produkta RT-PCR. Ta je odvisna od koncentracije virusov v vzorcu. Jakosti razvitih bolezenskih znamenj pri analiziranih rastlinah avtorji niso omenjali.

Ob zalianju propagacijskih testnih rastlin z originalno namakalno vodo iz gramoznice Ivanci smo ugotovili, da se po dveh tednih pojavijo rahla bolezenska znamenja (slika 9). Nadaljnja analiza vzorcev s qPCR je pokazala, da so koncentracije ToMV v tem vzorcu ravno na meji detekcije (priloga E). Pri rastlinah, ki smo jih zalivali z razredčeno elucijsko

frakcijo, smo koncentracijo ToMV ocenili na $4,2 \times 10^{-9}$ mg/ml. Zanimivo je, da je koncentracija ToMV v teh rastlinah večja v primerjavi s tistimi, ki smo jih zalivali z originalno namakalno vodo. Bolezenska znamenja se med zalivanimi rastlinami razlikujejo: tiste, ki smo jih zalivali z originalno namakalno vodo (slika 9), kažejo bolj izrazito rumenenje, vendar brez rahle kodravosti mladih lističev, ki je prisotna pri rastlinah, zalivanih z razredčeno elucijsko frakcijo (slika 10). Kljub temu, da smo v originalni namakalni vodi iz gramoznice Ivanci dokazali prisotnost ToMV (preglednica 14), prenos na testne rastline ni potekal tako hitro ali tako učinkovito, kot se je to dogajalo v primeru razredčene elucijske frakcije. Snovi, prisotne v originalni namakalni vodi, lahko vplivajo na morebitno agregacijo virusnih delcev, ki so jo opisovali Rafikova in sod. (2003). Te snovi med postopkom koncentriranja s CIM® monolitnimi kromatografskimi nosilci odstranimo, saj viruse speremo z nosilca z elucijskim pufrom. V primeru, da se ToMV nahajajo v originalni namakalni vodi v obliki virusnih aggregatov, je lahko tudi zalivanje s tako vodo neenakomerno in je zato potrebno več »zalivalnega« časa, da se virusi namnožijo do enake mere, kot so se v primeru zalivanja z razredčeno elucijsko frakcijo.

Rezultati se skladajo z ugotovitvijo Kramberger in sod. (2004), da ToMV v koncentracijah pod mejo detekcije za ELISA povzročajo pojav bolezenskih znamenj na testnih rastlinah. Razlika med poskusi je v tem, da so oni uporabljali vodovodno vodo kot medij, v katerem so se nahajali ToMV delci in s katero so zalivali testne rastline, mi pa smo uporabljali namakalno vodo iz okolja, ki lahko vsebuje različne primesi, ki bi teoretično lahko vplivale na obstojnost virusnih delcev in tako na njihovo sposobnost okužbe testnih rastlin.

5.1.3.4 Primerjava DAS-ELISA in qPCR za kvantifikacijo ToMV

Rezultati primerjave dveh metod za določanje koncentracije ToMV v vzorcu (DAS-ELISA in qPCR) so pokazali (preglednica 16), da je ob primerjavi LOQ qPCR metoda za 3 velikostne rede, ob primerjavi LOD pa za 5 velikostnih redov bolj občutljiva od DAS-ELISA. Koncentracijo ToMV lahko torej s qPCR določimo do $4,2 \times 10^{-8}$ mg/ml (oz. 42 pg/ml), s serološko metodo pa do $3,1 \times 10^{-5}$ mg/ml (oz. 31 ng/ml). Mumford in sod. (2004) tudi govorijo o 1000-krat večji občutljivosti qPCR metode v primerjavi z ELISA testom na primeru kvalitativnega določanja Virusa rumenega mozaika ječmena (BYMV – *Barley yellow mosaic virus*) in Virusa blagega mozaika ječmena (BMMV – *Barley mild mosaic virus*), medtem ko so Boonham in sod. (2000) določili 100 do 10000-krat večjo občutljivosti qPCR pri določanju različnih virusov krompirja. Jacobi in sod. (1998), ki so razvili IC-RT-PCR metodo za hkratno določanje Virusa mozaika tobaka (TMV – *Tobacco mosaic virus*), in ToMV, poročajo o 10^4 do 10^5 -krat večji občutljivosti molekularne metode v primerjavi s serološko. Z njo je možno določiti oba virusa do koncentracij 10-100 fg/ml, kar je enaka občutljivost kot pri Virusu rumene pritlikavosti ječmena (BYDV – *Barley yellow dwarf virus*) (11 fg), ki so jo določili Canning in sod. (1996) za RT-PCR metodo.

Občutljivost PCR v realnem času so avtorji primerjali tudi z drugimi metodami, kot ELISA. Meyer in sod. (2003) so v primeru kvantifikacije *nor-1* gena v biosintetski poti aflatoksina pri *Aspergillus flavus* primerjali PCR v realnem času z metodo, kjer določajo cfu (število enot, ki tvorijo kolonije) omenjenega mikroorganizma. Ugotovili so, da je molekularna metoda bolj občutljiva, saj temelji na drugačnem principu določanja. Rezultat PCR v realnem času je odvisen od števila spor v vzorcu, medtem ko je vrednost cfu

povezana s številom kolonij, ki zrastejo iz delcev micelija. Alonso in sod. (2004) so primerjali občutljivosti PCR v realnem času in hibridizacije s črtovnim nanosom (ang. »slot-blot«). Ugotovili so, da je bilo 30 % vzorcev 500 do 1500 let starih človeških ostankov, ki so bili s hibridizacijo negativni na prisotnost mtDNA, pozitivnih po analizi s PCR v realnem času.

5.1.3.5 Predlagani protokol za analizo namakalnih voda

Zdravstveno stanje voda v okolju je čedalje bolj pomembno tudi na področju rastlinske patologije. Naša študija spremljanja prisotnosti ToMV v namakalnih vodah z uporabo občutljive in specifične metode qPCR je pokazala, da je smiselno nadzirati zdravstveno stanje voda glede prisotnosti rastlinskih virusov, ki lahko tudi v zelo nizkih koncentracijah povzročijo pojav bolezenskih znamenj na gostiteljskih rastlinah. Z uporabo razvite metode za določanje ToMV lahko hitro in učinkovito zaznamo prisotnost živih, nepoškodovanih rastlinskih virusov v vodi, ki se uporablja za namakanje kmetijskih površin. Metodo bi lahko prilagodili za določanje tudi ostalih: humanih in živalskih patogenih virusov.

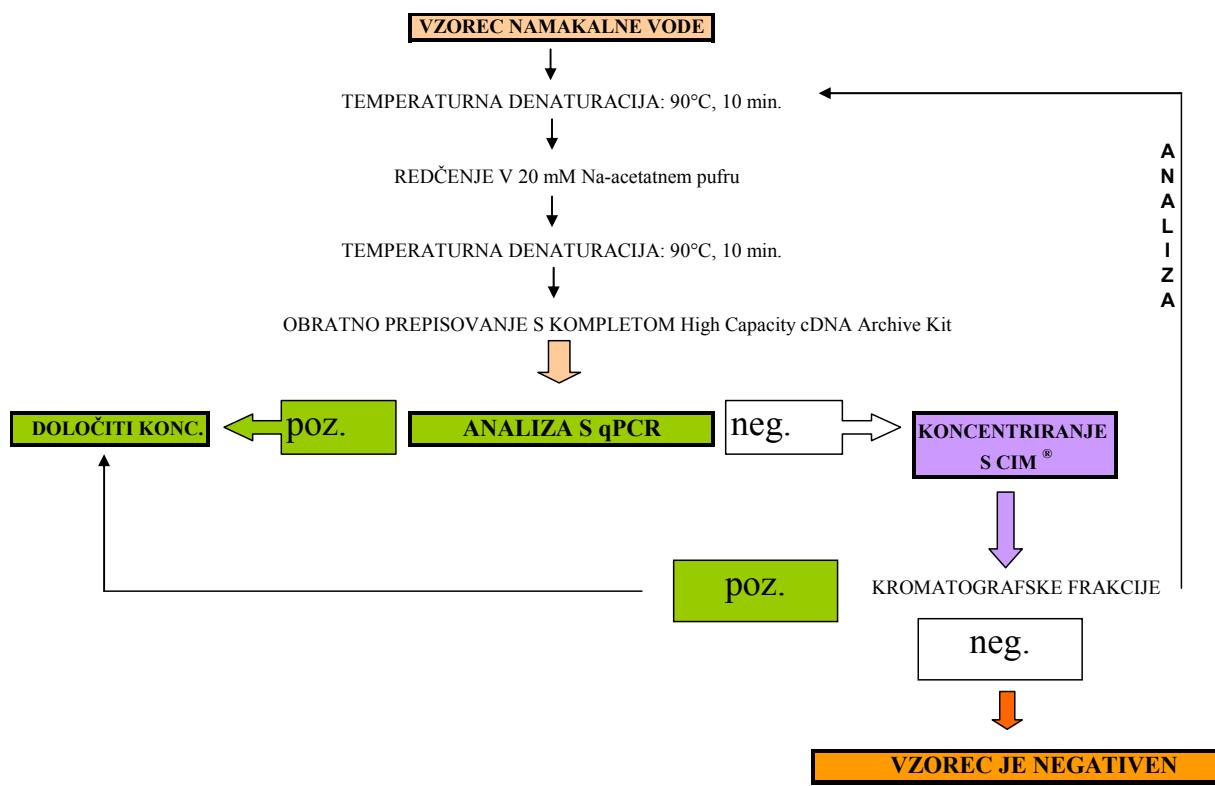
Po vseh korakih, ki smo jih izvedli pri optimizaciji diagnostičnega protokola, smo na koncu razvili preprosto diagnostično shemo, s katero lahko na učinkovit in hiter način (v enem dnevnu) ugotovimo prisotnost ToMV v namakalni vodi. Protokol sestavlja naslednji koraki, ki so povzeti na sliki 17:

- denaturacija osnovnega vzorca namakalne vode (razbitje morebitnih agregatov virusnih delcev)
- redčenje v 20 mM NA pufru pH 5,5
- ponovna temperaturna denaturacija za sprostitev virusne RNA in za porušitev morebitnih sekundarnih struktur RNA molekul
- obratno prepisovanje
- qPCR

V primeru, ko dobimo pozitiven rezultat, lahko s pomočjo umeritvene krivulje, izdelane iz standarda, ki so ga predstavljale redčine očiščenih virusnih delcev ToMV, določimo koncentracijo ToMV v vzorcu.

Če dobimo negativen rezultat, osnovni vzorec namakalne vode (1-5 l) koncentriramo s pomočjo CIM® monolitnih kromatografskih nosilcev. Nadaljujemo z analizo kromatografskih frakcij na enak način, kot je opisano zgoraj.

V primeru negativnega rezultata tudi po koncentriranju vzorca namakalne vode analizo zaključimo, saj z uporabljenou metodo v analiziranem vzorcu ne moremo določiti prisotnosti ToMV in zato sklepamo, da je vzorec negativen.



Slika 17: Shema predlaganega protokola za analizo namakalnih voda

Figure 17: Scheme of the proposed protocol for analysis of irrigation waters

5.1.4 Določanje Virusa nekroze stebel krizantem (CSNV)

5.1.4.1 Določanje nukleotidnega zaporedja CSNV

Ravnikar in sod. (2003) so poročali, da je v letu 2001 v Sloveniji prišlo do prvega suma na okužbo rastlin z Virusom nekroze stebel krizantem (CSNV – *Chrysanthemum stem necrosis virus*). Ugotovili so navzkrižno reaktivnost CSNV s protitelesi proti Virusu pegavosti in uvelosti paradižnika (TSWV – *Tomato spotted wilt virus*) in zato sklepali, da je to eden od možnih razlogov za malo število potrjenih okužb s CSNV v Evropi. Leschert in sod. (2002) so poročali o serološki navzkrižni reaktivnosti pri določanju tobamovirusov. Diagnostiko so olajšali z razvojem molekularno-biološke metode RT-PCR, ki je uspešno razlikovala med tobamovirusi, ki so uvrščeni v podskupino 1 (TMV, ToMV, Virus blage lisavosti paprik (PMMV – *Pepper mild mottle virus*), Virus blagega zelenega mozaika tobaka (TMGMV – *Tobacco mild green mosaic virus*), Virus obročkaste pegavosti orhidej (ORSV – *Odontoglossum ringspot virus*)). V primeru diagnostike tospovirusov Pirc (2003) poroča o uspešni uporabi RT-PCR metode za specifično določanje CSNV, ki ne kaže navzkrižne reaktivnosti z vzorci, okuženimi s TSWV. Pokazala je, da so CSNV prisotni v vzorcih krizantem in da se nahajajo v različnih delih rastline. Okuda in Hanada (2001) pa poročata o razvoju RT-PCR, ki temelji na uporabi degeneriranih začetnih oligonukleotidov in s katerim lahko določajo 5 različnih tospovirusov (Virus nekrotične pegavosti vodenke (INSV – *Impatiens necrotic spot virus*), TSWV, Virus rumene pegavosti melon (MYSV – *Melon yellow spot virus*), Virus srebrne lisavosti lubenic (WSMoV – *Watermelon silver mottle virus*) in Virus rumene pegavosti irisa (IYSV – *Iris yellow spot virus*)).

Nadaljevali smo z razvojem diagnostike CSNV virusa. Vzorcu, ki je bil med testiranjem na prisotnost tospovirusov na Nacionalnem inštitutu za biologijo, CSNV pozitiven, smo določili nukleotidno zaporedje, saj smo žeeli ugotoviti sorodnost z že objavljenim nukleotidnim zaporedjem (Bezerra in sod., 1999). Pri določanju nukleotidnega zaporedja smo uporabili enake oligonukleotidne začetnike, s katerimi so Bezerra in sod. (1999) določili nukleotidno zaporedje za nukleokapsidni gen (N gen) CSNV, ki so ga izolirali iz krizantem. Po sekveniranju so dobljeno zaporedje objavili pod številko AF067068. Za N gen pri TSWV, ravno tako virusu iz rodu tospovirusov, so Heinze in sod. (2001) dokazali, da je med različnimi izolati dokaj dobro ohranjen in je zato primeren v diagnostiki. Silva in sod. (2001) so primerjali tako nukleokapsidni gen kot gen za gibalni protein pri različnih tospovirusih. Pokazali so veliko ohranjenost zaporedij za N gen in na njihovi podlagi predvideli dve skupini tospovirusov: ameriško in evrazijsko.

Za določanje nukleotidnega zaporedja N gena pri CSNV virusu, ki smo ga predhodno določili na gerberi, smo uporabili začetne oligonukleotide, ki so jih uporabili že Bezerra in sod. (1999) in ki na njihovo objavljeno nukleotidno zaporedje nalegajo tako, kot je prikazano na sliki 12. Dobili smo 637 bp dolgo nukleotidno zaporedje za N gen (priloga B), ki smo ga primerjali z objavljenim – AF067068 in ugotovili, da je homologija med njima 98 %. Odstotek homologije je tak, kot ga opisujejo tudi Pappu in sod. (2000), ki so, za razliko od nas, primerjali sorodnost nukleotidnih zaporedij medgenskih regij na S, oziroma M RNA različnih tospovirusov. Poročajo o 79 do 99 % homologiji medgenske regije pri S RNA različnih izolatov istega virusa. S RNA nosi tudi zapis za N gen (De Haan in sod., 1990), ki smo ga določali mi.

Tako visoka homologija z brazilskim izolatom CSNV virusa lahko pomeni, da je izvor tega virusa najverjetneje s sadilnim materialom. Verhoeven in sod. (1996) so namreč poročali o najdbi CSNV na Nizozemskem, za katerega so sklepali, da je k njim prispel iz Brazilije z matičnimi rastlinami, ki so služile za nadaljnje razmnoževanje rastlin. O enakem izvoru so pri najdbi CSNV v Veliki Britaniji sklepali Mumford in sod. (2003).

5.1.4.2 Razvoj PCR v realnem času za določanje CSNV

Roberts in sod. (2000) so prvi poročali o razvoju metode PCR v realnem času za določanje tospovirusov – konkretno TSWV in omenili 10-krat večjo občutljivost v primerjavi s klasično RT-PCR metodo, kateri je sledilo opazovanje pomnoženih produktov na agaroznem gelu. Prej so že Letschert in sod. (2002) poročali, da je v primeru tobamovirusov RT-PCR oziroma RT-PCR-RFLP metoda primerna za razlikovanje serološko podobnih virusov (na primer TMV in ToMV). Zaradi serološke podobnosti CSNV s TSWV (Ravnikar in sod., 2003) smo se odločili, da bomo razvili PCR v realnem času za specifično določanje CSNV.

V diagnostičnem testu smo želeli uporabiti tudi metodo PCR v realnem času, s katero bi določili TSWV, torej virus, kateremu je CSNV serološko dokaj podoben. Uporabili smo začetne oligonukleotide, ki so jih za določanje TSWV v resarjih (ang. »thrips«) uporabili Boonham in sod. (2002). Slednji so, za razliko od Roberts in sod. (2000), preverili specifičnost delovanja načrtovanih začetnih oligonukleotidov in sonde tudi na ostalih tospovirusih (INSV, CSNV) in se niso omejili le na različne izolate TSWV. Na objavljenem nukleotidnem zaporedju za CSNV N gen smo načrtovali začetne oligonukleotide in MGB sondu. Z njimi smo lahko pomnožili 70 bp dolgo zaporedje (slika 16), ki je po BLAST analizi pokazalo specifičnost za CSNV. MGB sonda smo načrtovali zaradi prednosti, ki jih navajajo Afonina in sod. (1997): mala dolžina takih sond je ključna za njihovo večjo specifičnost.

CSNV se nahaja na različnih gostiteljskih rastlinah: na krizantemah (Bezerra in sod., 1993), paradižnikih (Nagata in sod., 1998) in v mešanih okužbah s TSWV, Virusom klorotične pegavosti paradižnika (TCSV – *Tomato chlorotic spot virus*) in/ali Virusom obročkaste pegavosti arašidov (GRSV – *Groundnut ringspot virus*) na različnih okrasnih rastlinah (Alexandre in sod., 1999). Pri preizkušanju delovanja načrtovanih specifičnih začetnih oligonukleotidov in sonde za CSNV smo zato testirali več različnih gostiteljskih rastlin, ki so pri rutinskem serološkem testiranju na Nacionalnem inštitutu za biologijo pokazale sum na prisotnost CSNV. Prisotnost CSNV smo zaznali v listih in steblu krizantem 1001 in 645, v listih krizanteme 800, ki smo jo uporabili tudi kot pozitivno kontrolo za CSNV, ter v listih gerbere. Z vzporedno analizo istih vzorcev na prisotnost TSWV smo ugotovili, da se ta nahaja v vseh analiziranih delih krizantem 1001 in 645, v listih paradižnika ter v listih še 4 dodatnih vzorcev krizantem (preglednica 17).

Pri vzorcih krizantem z laboratorijskima številkama 1001 in 645 smo v preglednici 17 navedli še vrednosti Ct pri analizah na CSNV in TSWV za različne analizirane dele rastline. V primeru krizanteme 1001 ugotavljamo, da se, tako kot so to omenjali Salmon in sod. (2002), vrednosti Ct ujemajo z jakostjo RT-PCR na agaroznem gelu, ki jo je v svojem diplomskem delu omenjala Pirc (2003). Z RT-PCR, specifičnim za CSNV, je na

agaroznem gelu določila največjo jakost analiziranega produkta pri listih, manj v steblu, korenine pa so bile negativne. Enako smo mi s PCR v realnem času za CSNV določili najnižji Ct pri listih, višjega pri steblu, korenine pa so bile tudi v našem primeru negativne. Analiza na TSWV je pokazala enako korelacijo: Pirc (2003) je pokazala največjo jakost analiziranega produkta na agaroznem gelu pri koreninah, medtem ko se jakost ni bistveno razlikovala med listi in stebлом. Ct vrednosti pri TSWV specifičnem PCR v realnem času so bile v našem primeru najnižje pri koreninah in tudi mi nismo zaznali občutne razlike v Ct vrednostih med listi in stebлом.

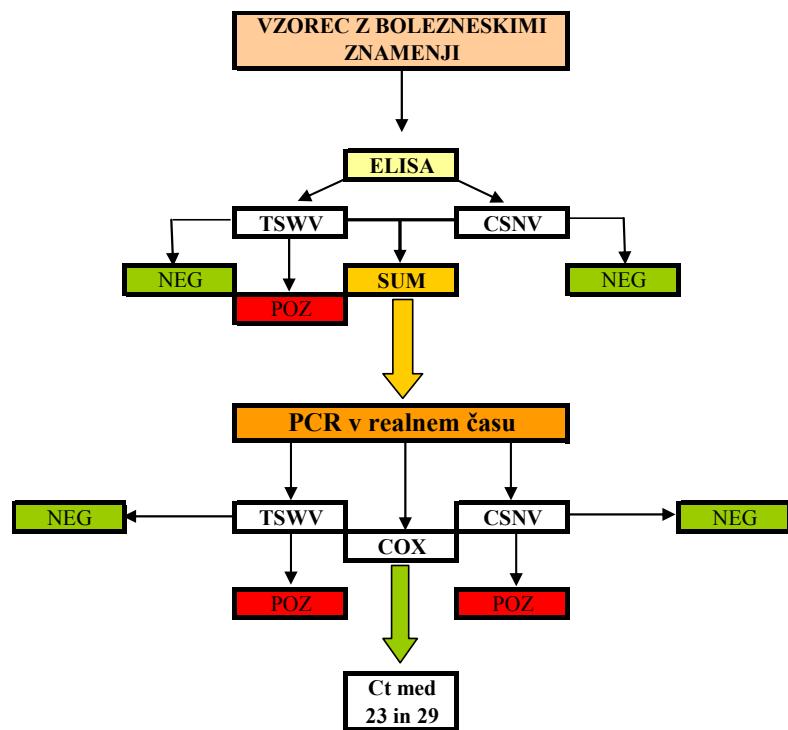
Preverili smo tudi specifičnost načrtovanega specifičnega testa za CSNV. Podobno kot Boonham in sod. (2002) smo preverili delovanje za TSWV specifičnega PCR v realnem času na različnih tospovirusih. Pokazali smo (preglednica 18), da načrtovani PCR v realnem času za CSNV res deluje specifično in da ni prisotne nobene navzkrižne reaktivnosti s TSWV in INSV tospovirusoma.

5.1.4.3 Predlagani protokol za analizo rastlinskih vzorcev na CSNV

Zaradi ekonomske pomembnosti tospovirusov (Nagata in sod., 1998), ki lahko povzročijo veliko škodo na pridelku, je nujna uporaba čim bolj specifičnih in občutljivih diagnostičnih metod. V primeru CSNV prihaja do serološke navzkrižne reaktivnosti s TSWV (Ravnikar in sod., 2003), zato testi, ki temeljijo na takem principu, niso zanesljivi za razlikovanje med njima. ELISA, ki spada med serološke teste, je primerna v prvi fazi analiz za pregled rastlin, ki kažejo znake okužbe s tospovirusi. Alexandre in sod. (1996) so namreč uspešno uporabili ELISA test za ocenitev okuženosti krizantem s tospovirusi.

Kadar pri ELISA testu rezultata nismo mogli točno opredeliti kot negativnega ali pozitivnega na prisotnost določenega virusa, smo rezultat opredelili kot sum (v tem primeru TSWV ali CSNV). Do suma prihaja takrat, kadar so vrednosti OD, ki jih odčitavamo pri ELISA testu po inkubaciji s substratom, povišane, vendar ne presegajo praga. Problem nastane tudi pri serološki navzkrižni reaktivnosti, saj lahko zaradi tega pojava dobimo lažno pozitivne rezultate. Zato v naslednjem koraku uporabimo občutljivo in specifično metodo, PCR v realnem času.

Iz rastlinskega vzorca moramo predhodno izolirati RNA. V reakciji PCR v realnem času preverimo uspešnost ekstrakcije tako, da pomnožimo del nukleotidnega zaporedja za rastlinski gen citokrom oksidazo (cox). Če Ct vrednosti ustrezajo intervalu med 23 in 29, smatramo, da je bila ekstrakcija uspešna. Preverimo rezultate specifičnih analiz na prisotnost TSWV ali CSNV in določimo, kateri vzorec je bil pozitiven in kateri negativen. Rezultati uporabljenih pozitivnih kontrol morajo biti seveda ustrezni, kot tudi rezultati negativnih kontrol in vodne kontrole. Predlagani protokol za analizo rastlinskih vzorcev na prisotnost CSNV in TSWV prikazuje slika 18.



Slika 18: Shema predlaganega protokola za analizo rastlinskih vzorcev na prisotnost CSNV in TSWV

Figure 18: A scheme of proposed protocol for the analysis of plant samples for the presence of CSNV and TSWV

5.2 SKLEPI

V prvem delu doktorske naloge smo uvajali sistem za detekcijo rastlinskih virusov v namakalni vodi, kjer so virusi prisotni v nizkih koncentracijah. Razvili smo kvantitativno metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) v realnem času, kjer smo natančno definirali postopek z vzorci namakalne vode, ki jih želimo analizirati. Določili smo tudi postopek za pripravo virusnega standarda in njegovo uporabo pri kvantifikaciji ToMV v vzorcu. Prišli smo do ugotovitev, kot sledi:

- Standard moramo redčiti v seriji 10-kratnih redčin, da lahko z njimi pripravimo standardno umeritveno krivuljo.
- Virusno RNA najuspešnejše sprostimo iz virusnih delcev s temperaturno denaturacijo.
- Učinkovitost pomnoževanja v qPCR reakciji je večja, kadar redčimo RNA pred RT reakcijo in manjša, kadar redčimo cDNA po RT reakciji.
- Optimalna koncentracija začetnih oligonukleotidov v qPCR reakciji je 600 nM, MGB sonde pa 200 nM.
- Vzorce namakalne vode in kromatografskih frakcij moramo najprej temperaturno denaturirati, da razbijemo morebitne aggregate virusnih delcev.
- Po temperaturni denaturaciji moramo vzorce namakalne vode in kromatografskih frakcij redčiti v 20 mM NA pufru, da odstranimo inhibitorje PCR reakcije.
- Iz elucijske kromatografske frakcije najlažje zmanjšamo inhibitorni vpliv NaCl na PCR reakcijo z redčenjem v pufru, ki ne vsebuje soli.
- Uvedba koncentriranja vzorcev namakalne vode s CIM® monolitnimi kromatografskimi nosilci še dodatno poveča občutljivost testa.
- Koncentriranje vzorcev namakalne vode s CIM® monolitnimi kromatografskimi nosilci poveča koncentracijo osnovnega vzorca od 1 do 6 velikostnih redov.
- qPCR metoda je 1000-krat bolj občutljiva od DAS-ELISA metode.
- ToMV virusni delci so v originalni namakalni vodi infektivni. Preživijo postopek koncentriranja s CIM, pri čemer ostanejo nepoškodovani in so tudi kasneje sposobni povzročiti pojav bolezenskih znamenj na testnih rastlinah.

V drugem delu doktorske naloge smo reševali problem detekcije serološko navzkrižno reaktivnih virusov in dokazovali sorodnost v Sloveniji najdenega CSNV (na gerberi) z že objavljenim nukleotidnim zaporedjem za CSNV. Razvili smo metodo PCR v realnem času, s katero lahko zanesljivo in nedvoumno določimo prisotnost CSNV v vzorcu. Ugotovili smo naslednje:

- Izolat CSNV iz gerbere je pokazal 98 % podobnost v nukleotidnem zaporedju nukleokapsidnega gena z že objavljenim AF067068 izolatom iz Brazilije.
- PCR v realnem času, ki smo ga razvili za določanje CSNV, ki navzkrižno reagira s protitelesi proti TSWV, učinkovito ločuje CSNV od drugih, sorodnih tospovirusov (TSWV in INSV).
- Pri izvedbi kvalitativne analize rastlinskega materiala na prisotnost CSNV ali TSWV je treba vključiti tudi kontrolno ekstrakcije RNA. Pomnožujemo rastlinski gen citokrom oksidazo (cox).
- CSNV in TSWV se v različnih delih rastline pojavlja v različnih koncentracijah.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Okužbe rastlin z virusi lahko občutno zmanjšajo pridelek in tako povzročijo veliko gospodarsko škodo. Zato mora biti metoda za diagnostiko rastlinskih virusov specifična, čim bolj zanesljiva in občutljiva ter čim hitrejša. Čas, ki je potreben za analizo vzorcev, je velikokrat ključnega pomena, odvisen pa je od vrste uporabljenih metode in od tipa vzorca, ki ga je treba analizirati.

Virusi lahko okužijo gostiteljske rastline na različne načine. Tako se okužba lahko širi z žuželčjimi prenašalci, preko poškodb bolnih in kasnejšega dotikanja z zdravimi rastlinami, s samim stikom med rastlinami, s semenom, z zemljo ali pa z namakalno vodo. V slednji so virusi prisotni v zelo nizkih koncentracijah in kar nekaj avtorjev je opisalo različne načine za koncentriranje razredčenih vzorcev. Namakalna voda je tako sicer lahko vir okužbe, vendar le kot posrednik, saj lahko virusni delci z okuženih rastlin preko koreninskega sistema prehajajo vanjo, z njeno pomočjo pa se razširijo na ostale rastline v okolini.

Virusi istih rodov so si včasih lahko med seboj podobni glede na strukturo proteinov, ki jih obdajajo (plaščni ali nukleokapsidni proteini). Metode, ki temeljijo na določanju strukture teh proteinov, so lahko nezanesljive. Mednje spadajo serološke metode (na primer ELISA in hibridizacija z imunskim pivnikom), pri katerih detekcija temelji na prepoznavanju virusnih proteinov s protitelesi. Kadar protitelesa ne prepozna samo točno določenih virusov, pač pa so sposobna prepoznati še sorodne, govorimo o navzkrižni reakciji protiteles. Za izboljšanje diagnostike takih virusov je treba razviti metode, ki temeljijo na drugačnem principu detekcije.

V preteklem desetletju je v rastlinski virologiji prišlo do čedalje pogosteje uporabe molekularno-bioloških metod (RT-PCR, PCR, IC-RT-PCR in RT-PCR-RFLP). Te temeljijo na določanju virusne RNA ali DNA. V ospredju so zlasti zato, ker so v večini primerov mnogo bolj občutljive od še vedno pogosto uporabljenih seroloških metod, po drugi strani pa so podvržene inhibitorjem PCR reakcije, ki se v rastlinskem materialu nahajajo mnogo bolj pogosto kot pri drugih organizmih. V zadnjem času prihaja v ospredje še veliko bolj občutljiva molekularno-biološka metoda PCR v realnem času. Ta se uporablja tako v kvalitativne kot v kvantitativne (qPCR) namene.

V prvem delu smo razvijali metodo qPCR, s katero bi lahko kvantificirali rastlinski virus ToMV v vzorcih namakalne vode iz okolja. Razvoj metode smo začeli z načrtovanjem začetnih oligonukleotidov in MGB sonde. Slednja je krajsa od običajnih TaqMan® sond, ki so na obeh koncih označene s fluorescentnimi barvili (poročevalska molekula in dušilec) in zato omogoča ozko specifično določanje ToMV. Načrtovali smo jo na virusnem genu za gibalni protein s pomočjo računalniškega programa PrimerExpress™. Za gibalni protein (MP) smo se odločili zato, ker so bila nukleotidna zaporedja različnih sevov ToMV mnogo bolj homogena, kot v primeru nukleotidnih zaporedij za virusni plaščni protein (CP). Za postopek kvantifikacije smo najprej želeli dobiti standard, v katerem bo znana količina

ToMV in s pomočjo katerega bi lahko določili koncentracijo ToMV v vzorcih. Iz propagacijskih rastlin *N. clevelandii* smo očistili virusne delce, katerim smo na koncu določili koncentracijo. To smo imeli kot osnovo za preračunavanje količine ToMV v standardu za kvantitativni PCR v realnem času (qPCR). Preizkusili smo različne načine izolacije virusne RNA in ugotovili, da je temperaturna denaturacija virusnih delcev učinkovita za njeno sproščanje. V primeru, ko smo za izolacijo uporabili komplet RNeasy Plant Mini Kit, smo po preverjanju izkoristka izolacije ugotovili, da je ta 75 %. Kljub temu, da se učinkovitosti pomnoževanja nista bistveno razlikovali med različnima načinoma izolacije, smo se odločili, da bomo v nadalnjih postopkih uporabljali časovno manj zahteven postopek s temperaturno denaturacijo. Slednji nam omogoča tudi, da lahko koncentracijo ToMV v vzorcih preračunamo iz osnovne koncentracije standarda. V tem primeru jo torej izražamo v mg ToMV / ml, kar je primerljivo izražanje v primeru, ko uporabljamo za detekcijo metode, ki temelji na določanju različnih delov virusnih delcev (RNA ali proteini). Potem ko smo določili primeren način izolacije virusne RNA, smo ugotavljali najprimernejši način priprave vzorcev na analizo. Primerjalno smo v qPCR izračunali učinkovitost, če smo RNA redčili pred RT ali če smo redčili cDNA po RT reakciji. Ugotovili smo, da je učinkovitost pomnoževanja v qPCR reakciji boljša, kadar je vzorec razdeljen pred RT reakcijo. Optimalno količino začetnih oligonukleotidov in MGB sonde smo določili v dveh zaporednih qPCR reakcijah. Najprej smo preizkusili različne koncentracije začetnih oligonukleotidov in ugotovili, da je njihova optimalna koncentracija 600 nM. Pri tej vrednosti je bila ΔR_n vrednost (relativna fluorescencija) še nad 0,8, Ct vrednost pa najnižja. Enake kriterije smo imeli tudi v naslednji reakciji, kjer smo določili optimalno koncentracijo MGB sonde, ki znaša 200 nM. S primerjavo 5 ločenih qPCR reakcij je sledilo določanje LOD in LOQ za ToMV. Pri vsaki qPCR reakciji smo izrisali formulo umeritvene krivulje, ko smo v odvisnosti od logaritma koncentracije ToMV v ustrezni redčitvi standarda, narisali pripadajoče Ct vrednosti. S pomočjo formule smo ponovno preračunali koncentracijo ToMV v vzorcu in tako med 5 qPCR reakcijami izračunali koeficient variacije. Redčitev, pri kateri je presegel vrednost 30 % ($4,2 \times 10^{-8}$ mg/ml), je predstavljalna našo LOQ, medtem ko je redčitev, pri kateri je vrednost presegla 50 % ($4,2 \times 10^{-10}$ mg/ml), predstavljalna LOD. V naslednjem koraku smo določili način analize vzorcev namakalne vode. V poskusu, kjer smo redčili ToMV delce v namakalni vodi iz reke Vipave, v kateri v začetku ni bilo prisotnih ToMV delcev, smo ugotovili, da je voda iz okolja neprimerna za redčenje, saj zniža občutljivost same metode. V nadaljevanju smo vzorce namakalne vode iz okolja redčili v 20 mM NA pufru s pH 5,5. Redčenje je sledilo temperaturni denaturaciji, ki smo jo uvedli zato, da bi razbili potencialne aggregate virusnih delcev, ki bi se lahko tvorili zaradi neugodnih razmer v okolju. Analizirali smo različne vzorce vode iz različnih virov in ugotovili, da ne moremo v vseh določiti ToMV. Zato smo uvedli v postopek detekcije ToMV korak koncentriranja vzorca namakalne vode s CIM® monolitnimi kromatografskimi nosilci, ki so se v preteklosti že izkazali kot uspešni v primeru koncentriranja razredčenih vzorcev, v katerih se nahajajo virusi. Prilagodili smo postopek analize kromatografske frakcije, ki je vsebovala NaCl – znani inhibitor PCR reakcij. Primerjali smo različne načine razsoljevanja (etanolnoobarjanje in gelsko filtracijo), kjer smo vzorec redčili v pufru brez NaCl pred oziroma po razsoljevanju. Ugotovili smo, da je učinkovitost pomnoževanja najboljša, če vzorec elucijske frakcije samo redčimo v pufru brez soli in ne uporabljamo nobenih drugih metod razsoljevanja. Od ostalih dveh metod se je kot boljša izkazala razsoljevanje z gelsko filtracijo, kjer smo uporabili PD-10 kolone, ki se glede na literaturo, pogosto v uporabi v ta namen. Ko smo določili način detekcije ToMV v elucijskih frakcijah, smo preizkusili učinkovitost CIM za

koncentriranje vzorcev in ugotovili, da skoncentrirajo vzorec za 2 velikostna reda. Ugotovili smo, da je njihova učinkovitost pri koncentriranju odvisna od samega vzorca. Analiza različnih namakalnih vod po koncentriranju je pokazala za 1 do 6 velikostnih redov večje koncentracije. Pri pregledu elucijske frakcije z elektronskim mikroskopom smo ugotovili, da so virusni delci v njej celi in nepoškodovani. To pomeni, da so bili taki tudi v originalnem vzorcu namakalne vode. Testi infektivnosti, kjer smo testne rastline mehansko inokulirali z elucijsko frakcijo, ali pa propagacijske rastline zalivali s ToMV pozitivno vodo in z razredčeno elucijsko frakcijo, so pokazale pojav bolezenskih znamenj.

Primerjali smo tudi občutljivost qPCR in DAS-ELISA in ugotovili, da je prva metoda 1000-krat (3 velikostne rede) bolj občutljiva od slednje in je zato mnogo bolj primerena za kvantifikacijo ToMV v namakalnih vodah, še zlasti če vzorca predhodno ne koncentriramo.

Na podlagi vseh rezultatov smo predlagali protokol za analizo namakalnih voda.

Razvili smo tudi kvalitativno metodo PCR v realnem času, s katero lahko zanesljivo določimo CSNV v rastlinskih vzorcih. Lastnost tega virusa je namreč, da v ELISA testu navzkrižno reagira s protitelesi, ki so v uporabi za določanje TSWV. Kot smo že prej omenili, je za diagnostične metode ključnega pomena njihova zanesljivost, kar pa ELISA ni v primeru določanja CSNV. Tako smo na podlagi že objavljenega nukleotidnega zaporedja za nukleokapsidni gen načrtovali specifične začetne oligonukleotide in MGB sondno. Ponovno smo želeli imeti čim krajsi amplikon, saj nam tak zagotavlja večjo verjetnost za specifičnost testa. Poleg CSNV testa, ki smo ga načrtovali sami, smo rastlinske vzorce analizirali tudi z že prej objavljenimi za TSWV specifičnimi začetnimi oligonukleotidi in sondno, uvedli pa smo tudi analizo na cox (rastlinski gen za citokrom oksidazo), ki smo ga uporabili za preverjanje ekstrakcije RNA. Ugotovili smo, da je načrtovani test za CSNV specifičen in da nobeden od kontrolnih vzorcev za TSWV in INSV ni navzkrižno reagiral z njimi. Prisotnost CSNV smo potrdili v dveh krizantemah (1001 in 645) ter v gerberi. Predlagali smo shemo analiz rastlin, za katere se sumi, da so okužene s tospovirusi.

Slovenskemu izolatu CSNV iz gerbere smo želeli preveriti ujemanje njegovega nukleotidnega zaporedja z že znanim in objavljenim. RT-PCR produkte smo klonirali v plazmide, s katerimi smo transformirali bakterije in iz njih nato izolirali plazmidno DNA, ki je vsebovala vstavljenе produkte PCR. Določili smo njihovo nukleotidno zaporedje in ugotovili, da je v 98 % podobno že objavljenemu. Na Nizozemskem (Verhoeven in sod., 1996) in v Veliki Britaniji (Mumford in sod., 2003), kjer so dosedaj poročali o najdbah CSNV, so mnenja, da je ta k njim prišel s sadilnim materialom iz Brazilije.

Razviti metodi sta uporabni za različne raziskave in aplikacije v rastlinski virologiji, saj sta učinkovit, natančen, zanesljiv, hiter in lahko izvedljiv način za določanje količine rastlinskih virusov v močno razredčenih vzorcih ali pa za reševanje problema serološko podobnih virusov. Predvsem prva metoda določanja nizkih koncentracij rastlinskih virusov bi se lahko prilagodila tudi za detekcijo in kvantifikacijo humanih in živalskih patogenov.

6.2 SUMMARY

Plant viruses may cause great economic damage, if they infect plants and lead to crop loss. Diagnostics of plant viruses must therefore be efficient, which means that the methods used for the detection of viruses must be specific, reliable, and sensitive. Sometimes it is of great importance that we quickly obtain the results of the analysis. Therefore, these methods should not be time-consuming. The time needed for the analysis depends on the method used for the analysis of the sample and on the type of the sample itself.

There are different ways in which plants get infected with viruses. Infections can spread with the help of insect vectors, by lesions of the infected plant material and contact with healthy plants, with seed, with soil, and even irrigation water. In the latter case, viruses are present in very low concentrations and quite a few authors describe different methods used for concentrating diluted samples. Irrigation water can present a source of infection. It can also mediate infection: viruses can be released from infected plants through the root system, enter the water and spread to healthy plants.

Plant viruses, belonging to the same genus, can have a similar structure of coat or envelope proteins. Methods, such as ELISA or western-blot hybridization, that are based on the structure of such proteins can be unreliable. When antibodies, used in such methods, recognize not only the specific viral target, but also proteins of related viruses, they are said to be cross-reactive. In order to improve the diagnostic procedure of cross-reacting viruses, different methods must be developed that are based on a different principle of viral target detection.

In the past decade, molecular methods (RT-PCR, PCR, IC-RT-PCR, RT-PCR-RFLP) have gained on importance in plant virology. They are based on the detection of viral RNA or DNA and are in most cases more sensitive than the serological methods. Lately, real-time PCR has been more widely used for viral diagnostics in general. It is based on measuring the fluorescence signal of the reporter molecule, located on a fluorescent probe that is pathogen-specific and is included in a qPCR or qualitative real-time PCR.

In the first part, we developed a qPCR method for detection and quantification of ToMV in irrigation waters. We started by developing ToMV specific primers and the MGB probe that is shorter and therefore more likely to be specific for a specific pathogen. The primers and the MGB probe were constructed using PrimerExpress™ software. The template for their construction was a viral movement protein sequence that showed greater homology between different ToMV strains than the sequence for the viral coat protein. For the development of a quantitative test we needed to prepare a viral standard with known concentration of ToMV. It would be used for later determination of ToMV concentrations in samples of irrigation water. A classical protocol was used to purify ToMV viral particles and in the end their concentration was determined. Different ways of RNA isolation were compared, where release of viral RNA by temperature denaturation was compared to isolation with RNeasy Plant Mini Kit. 75 % efficiency of isolation procedure using RNeasy Plant Mini Kit was determined. There was no significant difference in the efficiency of amplification in qPCR reaction between the RNA extraction procedures. Temperature denaturation for the release of RNA was less time-consuming and was used in further

experiments. The concentration of ToMV in the standard can be presented as mg of ToMV particles per ml of buffer/water. This is useful when different detection methods are compared designed to detect different properties of viral particles (RNA or proteins). After a suitable procedure for RNA extraction was determined, we optimised the preparation of irrigation water samples for later analysis. Efficiencies of amplification in qPCR reaction were calculated and compared when RNA was diluted before the RT step and when cDNA was diluted after the RT step. According to our findings, the amplification was better when the sample of RNA was diluted before the RT step. Optimal concentrations of primers and the MGB probe were determined in two subsequent qPCR reactions. First, the optimal concentration of primers was determined at 600 nM, and in the next reaction the optimal concentration of the MGB probe was set to 200 nM. Those were the lowest concentrations where ΔR_n values (relative fluorescence signal) were still above 0.8, and Ct values were the lowest.

By comparing five independent qPCR runs, LOD and LOQ for ToMV amplification were determined. Each qPCR run resulted in a calibration curve with an appropriate equation after Ct values were plotted against a log of a ToMV concentration in the standard. Using the equation, concentrations of ToMV in the samples were re-calculated and between five qPCR runs coefficient of variation was determined. The dilution where CV was not above 30 % ($4,2 \times 10^{-8}$ mg/ml) presented our LOQ, whereas the dilution where CV was not above 50 % ($4,2 \times 10^{-10}$ mg/ml) presented our LOD. In the next step, the procedure for the analysis of the irrigation water was set. In the experiment, where purified ToMV particles were diluted in irrigation water from the river Vipava that was ToMV negative we concluded that natural irrigation water is not suitable for diluting the sample since the method loses its sensitivity. That is why 20 mM NA buffer with pH 5.5 was used as a diluent in all further experiments. Dilution of the sample was performed after the temperature denaturation step which was included in the testing scheme to break down possible aggregates of viral particles that could form due to the conditions in the water and its environment. Irrigation water from different sources was analysed and ToMV was not directly detected in all of them. That is why a concentration procedure using CIM® monolith chromatographic supports was included in the testing of irrigation waters. They would concentrate water samples in cases where detection of ToMV is not possible by direct analysis of the sample. Due to the presence of NaCl in the elution chromatographic fraction (a known inhibitor of PCR reaction) the testing procedure was adapted. Different de-salting procedures were compared (ethanol precipitation and gel filtration) where samples were diluted in buffer without NaCl before or after de-salting. According to our results, amplification efficiency is best when samples are only diluted in the buffer without NaCl and no other de-salting procedure is performed. Of the other two desalting procedures gel filtration using PD-10 desalting columns proved to be more effective than the ethanol precipitation. In the next experiment the efficiency of CIM to concentrate irrigation water samples was determined. They were able to concentrate the samples by 2 orders of magnitude. We also concluded that their efficiency depends on the sample itself. The analysis of different samples revealed that CIM produce samples, where ToMV concentration increases from 1 to 6 orders of magnitude. Virus particles in the elution fraction did not lose their structure, since the visualisation of elution fraction samples under electron microscope showed presence of whole particles. Different infectivity tests also showed that such particles remain infective after the concentrating procedure, and that

the test plants show disease symptoms when they are watered with ToMV positive irrigation water.

The sensitivity of qPCR was compared to DAS-ELISA. It was shown to be 1,000-times more sensitive (3 orders of magnitude) and therefore much more suitable for the quantification of ToMV in irrigation water samples.

Based on all results we proposed a protocol for testing the irrigation water for the presence of plant pathogenic viruses that can also be adapted for testing the human or animal viruses.

In the second part, we focused on the development of a qualitative real-time PCR method for reliable determination of CSNV in plant samples. It was shown that this virus cross-reacts in ELISA with antibodies specific for TSWV. The reliability of a detection method is of crucial importance, which in this case ELISA is not. We used the CSNV N gene sequence which was already published to construct specific primers and the MGB probe. Different plant samples were tested with CSNV-specific, constructed and developed test as well as with already published TSWV and COX (cytochrome oxidase) primers and probe. The latter was used to check the RNA extraction procedure. We concluded that the developed CSNV-specific assay is specific and that it efficiently discriminates between related tospoviruses TSWV and INSV. The primers and the MGB probe do not cross react with other viruses. The presence of CSNV was shown in two *Chrysanthemum* plants (1001 and 645) and in gerbera. Figure 18 summarizes the proposed scheme for testing of plants for the presence of tospoviruses.

CSNV found on gerbera plant presented a new isolate in Slovenia and we wanted to check the homology of its N gene nucleotide sequence with already published AF067068. RT-PCR products were cloned into plasmid vectors and competent bacterial cells were transformed. Plasmid DNA was isolated from the cells that contained plasmids with inserted RT-PCR fragments. Nucleotide sequence of CSNV was determined and showed 98 % homology with AF067068. This means that the source of CSNV is most likely imported plant material. In Great Britain (Mumford in sod., 2003) and in The Netherlands (Verhoeven in sod., 1996) there is also an agreement that CSNV findings in their countries are most likely a consequence of import of plant material used for propagation from Brasil.

Both developed methods are of great use in plant virology since they present an effective, accurate, quick and easy way for determining and quantifying plant viruses in highly diluted samples. They are also able to solve the problem of detection of serologically cross-reacting viruses. Especially the first method could be adapted for testing of human or animal viruses.

7 VIRI

- Afonina I., Zivarts M., Kutyavin I., Lukhatanov E., Gamper H., Meyer R.B. 1997. Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Research*, 13, 25:2657-2660
- Alexandre M.A.V., Rivas E.B., Duarte L.M., Okuyama M.H. 1996. Serological survey of tospovirus on *Chrysanthemum* sp. Crops in São Paulo state, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, 1, 21:80-84
- Alexandre M.A.V., Duarte L.M.L., Rivas E.B., Chagas C.M. 1999. Mixed infection by Tospovirus species in ornamental crops in São Paulo state, Brazil. *Summa Phytopathologica*, 25:353-356
- Ali M.A., Al-Herrawy A.Z., El-Hawaary S.E. 2004. Detection of enteric viruses, *Giardia* and *Cryptosporidium* in two different types of drinking water treatment facilities. *Water Research*, 38:3931-3939
- Alonso A., Martín P., Albarrán C., García P., García O., Fernández de Simón L., García-Hirschfeld J., Sancho M., de la Rúa C., Fernández-Piqueras J. 2004. Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. *Forensic Science International*, 139:141-149
- van den Berg H., Lodder W., van der Poel W., Vennema H., de Roda Husman A.M. 2005. Genetic diversity of noroviruses in raw and treated sewage water. *Research in Microbiology*, 156:532-540
- Beuret C. 2004. Simultaneous detection of enteric viruses by multiplex real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 115:1-8
- Bezerra I.C., Resende R. de O., Pozzer L., Nagata T., Kormelink R., De Ávila A.C. 1999. Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from chrysanthemum and one from zucchini. *Phytopathology*, 89:823-830
- Boonham N., Walsh K., Mumford R.A., Barker I. 2000. Use of multiplex real-time PCR (TaqMan) for the detection of potato viruses. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Bulletin, 30:427-430
- Boonham N., Smith P., Walsh K., Tame J., Morris J., Spence N., Bennison J., Barker I. 2002. The detection of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) in individual thrips using

- real time fluorescent RT-PCR (TaqMan). Journal of Virological Methods, 101:37-48
- Boonham N., Walsh K., Smith P., Madagan K., Graham I., Barker I. 2003a. Detection of potato viruses using microarray technology: towards a generic method for plant viral disease diagnosis. Journal of Virological Methods, 2, 108:181-187
- Boonham N. 2003b. »COX primers and probe«. Central Science Laboratory, York, Velika Britanija. n.boonham@csl.gov.uk (osebni vir, 3. jun. 2003)
- Boonham N., González Pérez L., Mendez M.S. Lilia Peralta E., Blockley A., Walsh K., Barker I., Mumford R.A. 2004. Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of Potato spindle tuber viroid. Journal of Virological Methods, 116:139-146
- Branović 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
- Brassard J., Seyer K., Houde A., Simard C., Trottier Y.-L. 2005. Concentration and detection of hepatitis A virus and rotavirus in spring water samples by reverse transcription-PCR. Journal of Virological Methods, 123:163-169
- Brunt A.A. 1995. Impatiens necrotic spot *tospovirus*. V: Plant Viruses Online: Descriptions and lists from the VIDE (Virus identification data exchange) database. Brunt A., Crabtree K., Dallwitz M., Gibbs A., Watson L., Zurcher E. (eds.). Wallingford, CAB International. (Version 20th August, 1996) Canberra, Australian National University, Research School of Biological Sciences, <http://image.fs.uidaho.edu/vide/descr413.htm> (december 2005): 3 str.
- Burns M.J., Valdivia H., Harris N. 2004. Analysis and interpretation of data from real-time PCR trace detection methods using quantitation of GM soya as a model system. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 378:1616-1623
- Bustin S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reactin assays. Journal of Molecular Endocrinology, 25:169-193
- Candresse T., Hammond R. W., Hadidi A. 1998. Detection and identification of plant viruses and viroids using polymerase chain reaction (PCR). V: Plant virus disease control. Hadidi A., Khetarpal R.K., Koganezawa H. (eds). St. Paul, APS Press: 409-410
- Cankar K., Ravnikar M., Žel J., Toplak N., Gruden K. 2005. Real-time PCR for detection of *Cauliflower mosaic virus* to complement the 35S screening assay for genetically modified organisms. Journal of AOAC International, 3, 88:814-822

- Canning E.S.G., Penrose M.J., Barker I., Coates D. 1996. Improved detection of barley yellow dwarf virus in single aphids using RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 56:191-197
- Carbon J.Y. 2005. Improvement of direct determination of Cu and Mn in seawater by GFAAS and total elimination of the saline matrix with the use of hydrofluoric acid. *Talanta*, 65:402-407
- Caspar D.L.D. 1963. Assembly and stability of Tobacco mosaic virus particle. *Advances in Protein Chemistry*, 18:37-121
- Castello J.D., Rogers S.O., Starmer W.T., Catrains C.M., Ma L., Bachand G.D., Zhao Y., Smith J.E. 1999. Detection of tomato mosaic tobamovirus RNA in ancient glacial ice. *Polar Biology*, 22:207-212
- De Haan P., Wagemakers P., Peters D., Goldbach R.W. 1990. The S RNA segment of tomato spotted wilt virus has an ambisense character. *Journal of General Virology*, 71:1001-1007
- Eiras, M., Resende R.O., Missiaggia A.A., De Ávila A.C. 2001. RT-PCR and dot blot hybridization methods for a universal detection of tospoviruses. *Fitopatología Brasileira*, 2, 26:170-175
- Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. (eds.) 2005. Virus Taxonomy, eighth report of the International committee on taxonomy of viruses. New York, Elsevier Academic Press: 1259 str.
- Fijan S., Poljšak-Prijatelj M., Steyer A., Koren S., Cencic A., Šostar-Turk S. 2006. Rotaviral RNA found in wastewaters from hospital laundry. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 1, 209:97-102
- Fontaine M., Guillot E. 2002. Development of a TaqMan quantitative PCR assay specific for *Cryptosporidium parvum*. *FEMS Microbiology Letters*, 214:13-17.
- Fontaine M., Guillot E. 2003. An immunomagnetic separation-real-time PCR method for quantification of *Cryptosporidium parvum* in water samples. *Journal of Microbiological Methods*, 54:29-36
- Forminga-Cruz, M., Hundesa A., Clemente-Casares P., Albiñana-Gimenez N., Allard A., Girones R. 2005. Nested multiplex PCR assay for detection of human enteric viruses in shellfish and sewage. *Journal of Virological Methods*, 125:111-118
- Freeman W.M., Walker S.J., Vrana K.E. 1999. Quantitative Rt-PCR: pitfalls and potential. *BioTechniques*, 1, 26:112-125
- Gibbs A.J. 1990. Tomato spotted wilt *tospovirus*. V: Plant Viruses Online: Descriptions and lists from the VIDE (Virus identification data exchange) database. Brunt A., Crabtree K., Dallwitz M., Gibbs A., Watson L., Zurcher E. (eds.). Wallingford,

- CAB International. (Version 20th August, 1996) Canberra, Australian National University, Research School of Biological Sciences, <http://image.fs.uidaho.edu/vide/descr837.htm> (december 2005): 9 str.
- Ginzinger D.G. 2002. gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30:503-512
- Giulietti A., Overbergh L., Valckx D., Decallonne B., Bouillon R., Mathieu C. 2001. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 25:356-401
- Gosalvez B., Navarro J.A., Lorca A., Botella F., Sánchez-Pina M.A., Pallas V. 2003. Detection of Melon necrotic spot virus in water samples and melon plants by molecular methods. *Journal of Virological Methods*, 113:87-93
- Heinze C., Letschert B., Hristova D., Yankulova M., Kauadjouor O., Willingmann P., Atanassov A., Adam G. 2001. Variability of the N-protein and the intergenic region of the S RNA of Tomato spotted wilt tospovirus (TSWV). *Microbiologica*, 24:175-187
- High capacity cDNA archive kit. Product Bulletin. 2001. Foster City, Applied Biosystems: 19 str.
- Horváth J., Pocsai E., Kazinczi G. 1999. Plant virus contamination of natural waters in Hungary. V: Zbornik predavanj in referatov. 4. Slovensko posvetovanje o varstvu rastlin, Portorož, 3-4 mar. 1999. Maček J. (ed.). Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 353-356
- Huttinga H., Rast A.Th.B. 1985. Tomato mosaic *tobamovirus*. V: Plant Viruses Online: Descriptions and lists from the VIDE (Virus identification data exchange) database. Brunt A., Crabtree K., Dallwitz M., Gibbs A., Watson L., Zurcher E. (eds.). Wallingford, CAB International. (Version 20th August, 1996) <http://image.fs.uidaho.edu/vide/descr832.htm> (Canberra, Australian National University, Research School of Biological Sciences) (marec 2004): 5 str.
- Jacobi V., Bachand G.D., Hamelin R.C., Castello J.D. 1998. Development of a multiplex immunocapture RT-PCR assay for detection and differentiation of tomato and tobacco mosaic tobamoviruses. *Journal of Virological Methods*, 74:167-178
- Katayama H., Shimasaki A., Ohgaki S. 2002. Development of a virus concentration method and its application to detection of Enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, 3, 68:1033-1039
- Katoch M., Abdin M.Z., Ram R., Zaidi A.A. 2003. An overview of diagnostics for viruses infecting gladiolus. *Crop Science*, 22:153-156
- Klein D. 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *TRENDS in Molecular Medicine*, 6, 8:257-260

- de Koeijer K.J., van der Werf W. 1999. Effects of beet yellows virus and beet yellowing virus on leaf dynamics of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Field Crops Research*, 61:163-177
- Koenig R. 1986. Plant viruses in rivers and lakes. *Advances in Virus Research*, 31:321-333
- Kramberger P., Petrovič N., Štrancar A., Ravnikar M. 2004. Concentration of plant viruses using monolithic chromatographic supports. *Journal of Virological Methods*, 120:51-57
- Kutyavin I.V., Afonina I.A., Mills A., Gorn V.V., Lukhantov E.A., Belousov E.S., Singer M.J., Walburger D.K., Lokhov S.G., Gall A.A., Dempcy R., Reed M.W., Meyer R.B., Hedgpeth J. 2000. 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperature. *Nucleic Acids Research*, 2, 28:655-661
- Kuznetsov Y.G., Daijogo S., Zhou J., Semler B.L., McPherson A. 2005. Atomic force microscopy analysis of icosahedral virus RNA. *Journal of Molecular Biology*, 347:41-52
- La Notte P., Minafra A., Saldarelli P. 1997. A spot-PCR technique for the detection of phloem-limited grapevine viruses. *Journal of Virological Methods*, 66:103-108
- Latham L.J., Jones R.A.C. 2004. Carrot virus Y: symptoms, losses, incidence, epidemiology and control. *Virus Research*, 100:89-99
- Le Cann P., Ranarijaona S., Monpoeho S., Le Guyader F., Ferré V. 2004. Quantification of human astroviruses in sewage using real-time RT-PCR. *Research in Microbiology*, 155:11-15
- Letschert B., Adam G., Lesseman D.-E., Willingmann P., Heinze C. 2002. Detection and differentiation of serologically cross-reacting tobamoviruses of economical importance by RT-PCR and RT-PCR-RFLP. *Journal of Virological Methods*, 106:1-10
- Longo M.C., Berninger M.S., Hartley J.L. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*, 93:125-128
- Mackay I.M., Arden K.E., Nitsche A. 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*, 6, 30:1292-1305
- Mayer Z., Bagnara A., Färber P., Geisen R. 2003. Quantification of the copy number of *nor-1*, a gene of the aflatoxin biosynthetic pathway by real-time PCR, and its correlation to the cfu of *Aspergillus flavus* in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 82:143-151

- McDaniels A.E., Wymer L., Rankin C., Haugland R. 2005. Evaluation of quantitative real time PCR for the measurement of *Helicobacter pylori* at low concentrations in drinking water. Water Research, 39:4808-4816
- Mehle N., Kovač M., Petrovič N., Pompe Novak M., Baebler Š., Krečič Stres H., Gruden K., Ravnikar M. 2004. Spread of potato virus Y^{NTN} in potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) with different levels of sensitivity. Physiological and Molecular Plant Pathology, 64:293-300
- Menzel W., Jelkmann W., Maiss E. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. Journal of Virological Methods, 99:81-92
- Monpoeho S., Dehéé A., Mignotte B., Schwartzbrod L., Marechal V., Nicolas J.-C., Billaudel S., Férré V. 2000. Quantification of enterovirus RNA in sludge samples using single tube real-time RT-PCR. BioTechniques, 1, 29:88-93
- Morrison L.E. 1999. Homogenous detection of specific DNA sequences by fluorescence quenching and energy transfer. Journal of Fluorescence, 3, 9:187-196
- Motulsky H. 1995. Intuitive biostatistics. New York, Oxford University Press: 386 str.
- Mumford R.A., Barker I., Wood K.R. 1996. The biology of tospoviruses. Annals of Applied Biology, 128:159-183
- Mumford R.A., Jarvis B., Morris J., Blockley A. 2003. The first report of Chrysanthemum stem necrosis virus in United Kingdom. New Disease Reports, 7:feb.2003-jul.2003, <http://www.bspp.org.uk/ndr/july2003/2003-06.asp> (dec. 2005)
- Mumford R., Skelton A., Metcalfe E., Walsh K., Boonham N. 2004. The reliable detection of Barley yellow and mild mosaic viruses using real-time PCR (TaqMan[®]). Journal of Virological Methods, 117:153-159
- Nagata T., Resende R.de O., Kitajima E.W., Costa H., Inoue-Nagata A.K., de Avila A.C. 1998. First report of natural occurrence of Zucchini lethal chlorosis tospovirus on cucumber and *Chrysanthemum stem necrosis tospovirus* on tomato in Brazil. Plant Disease, 82:1403
- Niesters H.G.M. 2002. Clinical virology in real time. Journal of Clinical Virology, 25:S3-S12
- Okuda M., Hanada K. 2001. RT-PCR for detecting five distinct Tospovirus species using degenerate primers and dsRNA template. Journal of Virological Methods, 96:149-156
- Pappu S.S., Bhat A.I., Pappu H.R., Deom C.M., Culbreath A.K. 2000. Phylogenetic studies of tospoviruses (familij: *Bunyaviridae*) based on intergenic region sequences of small and medium genomic RNAs. Archives of Virology, 145:1035-1045

- Parshionikar S.U., Cashdollar J., Fout G.S. 2004. Development of homologous viral internal controls for use in RT-PCR assays of waterborne enteric viruses. *Journal of Virological Methods*, 121:39-48
- Peters I.R., Helps C.R., Hall E.J., Day M.J. 2004. Real-time RT-PCR: consideration for efficient and sensitive assay design. *Journal of Immunological Methods*, 286:203-217
- Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for realitive quantification in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 9, 29:2002-2007
- Piazzolla P., Castellano M.A., De Stradis A. 1986. Presence of plant viruses in some rivers of southern Italy. *Journal of Phytopathology*, 116:244-246
- Pirc M. 2003. Uvedba molekularne detekcije tospovirusov na okrasnih rastlinah. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 48 str.
- Pompe Novak M. 2002. Razlike v izražanju genov med zdravimi in s krompirjevim virusom Y^{NTN} okuženimi rastlinami krompirja (*Solanum tuberosum* L.). Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 240 str.
- Pompe Novak M., Gruden K., Baebler Š., Krečič Stres H., Kovač M., Jongsma M., Ravnikar M. 2006. Potato virus Y induced changes in the gene expression of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v tisku
- Priftakis P., Bogdanovic G., Kokhaei P., Mellstedt H., Dalianis T. 2003, BK virus (BKV) quantification in urine samples of bone marrow transplanted patients is helpful for diagnosis of hemorrhagic cystitis, although wide individual variations exist. *Journal of Clinical Virology*, 26:71-77
- Pusch D., Oh D.-Y., Wolf S., Dumke R., Schröter-Bobsin U., Höhne M., Röske I., Schreier E. 2005. Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. *Archives of Virology*, 5, 150:929-947
- Rafikova E.R., Kurganov B.I., Arutyunyan A.M., Kust S.V., Drachev V.A., Dobrov E.N. 2003. A mechanism of macroscopic (amorphous) aggregation of the tobacco mosaic virus coat protein. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35:1452-1460
- Ravnikar M., Vozelj N., Boben J., Švigelj S.D., Mavrič I., Zupančič M., Petrovič N. 2003. Identifikacija virusa stebelnih nekroz krizantem – CSNV v Sloveniji. V: 6. Slovensko posvetovanje o varstvu rastlin, Zreče, 4-6 mar. 2003. Maček P. (ed.). Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 75

- Roberts C.A., Dietzgen R.G., Heelan L.A., Maclean D.J. 2000. Real-time RT-PCR fluorescent detection of tomato spotted wilt virus. *Journal of Virological Methods*, 88:1-8
- Rodríguez-Lázaro D., D'Agostino M., Herrewegh A., Pla M., Cook N., Ikonomopoulos J. 2005. Real-time PCR-based methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in water and milk. *International Journal of Food Microbiology*, 101:93-104
- Rossen L., Norskov P., Holmstrom K., Rasmussen O.F. 1992. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology*, 17:37-45
- Rzezutka A., Cook N. 2004. Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMS Microbiology Reviews*, 28:441-453
- Ryu K.H., Park W.M. 1995. Rapid detection and identification of odontoglossum ringspot virus by polymerase chain reaction amplification. *FEMS Microbiology Letters*, 133:265-269
- Salmon M.A., Vendrame M., Kummert J., Lepoivre P. 2002. Detection of *apple chlorotic leaf spot* virus using a 5' nuclease assay with a fluorescent 3' minor groove binder-DNA probe. *Journal of Virological Methods*, 104:99-106
- Sánchez-Navarro J.A., Cañizares M.C., Cano E.A., Pallás V. 1999. Simultaneous detection of five carnation viruses by non-isotopic molecular hybridization. *Journal of Virological Methods*, 82:167-175
- Sano D., Fukushi K., Yoshida Y., Omura T. 2003. Detection of enteric viruses in municipal sewage sludge by a combination of the enzymatic virus elution method and RT-PCR. *Water Research*, 37:3490-3498
- Schvoerer E., Bonnet F., Dubois V., Cazaux G., Serceau R., Fleury H.J.A., Lafon M.-E. 2000. PCR detection of human enteric viruses in bathing areas, waste waters and human stools in southwestern France. *Research in Microbiology*, 151:693-701
- Silva M.S., Martins C.R.F., Bezerra I.C., Nagata T., de Avila A.C., Resende R.O. 2001. Sequence diversity of NS_M movement protein of tospoviruses. *Archives in Virology*, 146:1267-1281
- Shamloul A.M., Hadidi A. 1999. Sensitive detection of potato spindle tuber and temperate fruit tree viroids by reverse transcription-polymerase chain reaction-probe capture hybridization. *Journal of Virological Methods*, 80:145-155
- Ståhlberg A., Håkansson J., Xian X., Semb H., Kubista M. 2004. Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clinical Chemistry*, 50, 3:509-515

- Stapleton J.J., Summers C.G. 2002. Reflective mulches for management of aphids and aphid-borne virus diseases in late-season cantaloupe (*Cucumis melo* L. var. *Cantalupensis*). *Crop Protection*, 21:891-898
- Stopar D., Černe A., Žigman M., Poljšak-Prijatelj M., Turk V. 2004. Viral abundance and high proportion of lysogens suggest that viruses are important members of the microbial community in the Gulf of Trieste. *Microbial Ecology*, 1, 47:1-8
- Suehiro N., Matsuda K., Okuda S., Natsuaki T. 2005. A simplified method for obtaining plant viral RNA for RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 125:67-73
- Svanvik N., Ståhlberg A., Sehlstedt U., Sjöback R., Kubista M. 2000. Detection of PCR products in real time using light-up probes. *Analytical Biochemistry*, 287:179-182
- Tan S.W.-L., Wong S.-M., Kini R.M. 2000. Rapid simultaneous detection of two orchid viruses using LC- and/or MALDI-mass spectrometry. *Journal of Virological Methods*, 85:93-99
- Tantipaiboonwong P., Sinchaikul S., Sriyam S., Phutrakul S., Chen S.-T. 2005. Different techniques for urinary protein analysis of normal and lung cancer patients. *Proteomics*, 4, 5:1140-1149
- Thackray D.J., Jones R.A.C., Bwye A.M., Coutts B.A. 2000. Further studies on the effect of insecticides on aphid vector numbers and spread of cucumber mosaic virus in narrow-leaved lupins (*Lupinus angustifolius*). *Crop Protection*, 19:121-139
- Thompson J.R., Wetzel S., Klerks M.M., Vašková D., Schoen C.D., Špak J., Jelkmann W. 2003. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control. *Journal of Virological Methods*, 111:85-93
- Toplak N., Okršlar V., Stanič-Racman D., Gruden K., Žel J. 2004. A high throughput method for quantifying transgene expression in transformed plants using real-time PCR analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 3, 22:237-250
- Vandesompele J., De Paepe A., Spelman F. 2002. Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using two-step SYBR Green I real-time RT-PCR. *Analytical Biochemistry*, 1, 303:95-98
- Verma N., Sharma A., Ram R., Hallan V., Zaidi A.A., Garg I.D. 2003. Detection, identification and incidence of *Chrysanthemum B carlavirus* in chrysanthemum in India. *Crop Protection*, 22:425-429
- Verhoeven J.Th.J., Roenhorst J.W., Cortes I., Peters D. 1996. Detection of a novel tospovirus in Chrysanthemum. *Acta Horticulturae*, 432:44-51
- Vivier J.C., Ehlers M.M., Grabow W.O.K. 2004. Detection of enteroviruses in treated drinking water. *Water Research*, 38:2699-2705

Walker N. J. 2002. A technique whose time has come. *Science*, 296:557-559

Weller S.A., Elphinstone J.G., Smith N.C., Boonham N., Stead, D.E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 7, 66:2853-2858

Wetz J.J., Lipp E.K., Griffin D.W., Lukasik J., Wait D., Sobsey M.D., Scott T.M., Rose J.B. 2004. Presence, infectivity, and stability of enteric viruses in seawater: relationship to marine water quality in the Florida Keys. *Marine Pollution Bulletin*, 48:698-704

Whiley D.M., Sloots T.P. 2006. Sequence variation can affect the performance of minor groove binder TaqMan probes in viral diagnostic assays. *Journal of Clinical Virology*, 35:81-83

ZAHVALA

Za financiranje usposabljanja do doktorata se zahvaljujem Agenciji za raziskovalno dejavnost Ministrstva za visoko šolstvo, znanost in tehnologijo.

Mentorici, prof. dr. Maji Ravnikar hvala za izjemno strokovno pomoč, nasvete in za odkritje sveta rastlinske virologije. Dr. Nataši Petrovič pa za vse podrobnosti viroloških metod in razkritje ozadij za njimi.

Članoma komisije za tehten pregled doktorske disertacije in za nasvete.

Dr. Petri Kramberger, dr. Matjažu Peterki in doc. dr.. Alešu Štrancarju z BIA Separations d.o.o. gredo zahvale za koncentriranje vzorcev namakalne vode s CIM® kromatografskimi nosilci ter vse nasvete in ideje, ki so se porajale na področju koncentriranja virusov v sklopu skupnega projekta z Oddelkom za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo na NIB.

Manci Pirc, s katero sva orali ledino pri določanju nukleotidnega zaporedja za CSNV najlepša hvala za vse ideje in zamisllice.

Mag. Magdi Tušek-Žnidarič za elektronsko mikroskopijo vzorcev in za slike virusnih delcev.

Dr. Renee-ju van der Vlught-u iz Plant Research International (Nizozemska) za liofiliziran rastlinski material, okužen s ToMV-D in za protokol za izolacijo virusnih delcev. Dr. Neilu Boonhamu se zahvaljujem za koristne diskusije na področju določanja rastlinskih virusov.

Katji Cankar in dr. Nataši Toplak hvala za vpeljavo na področje PCR v realnem času, doc. dr. Kristini Gruden pa za nasvete pri prikazu podatkov.

Vsem fitoplazmarjem: Jerneju, Nataši, Matjažu, Poloni in Jani za zabavanje ob »sezonskem delu«.

Cimram iz študentske sobe, s katerimi smo zaključile v fotofinišu.

Dr. Maji Kovač, ki je odstopila ure svojih predavanj za zagovor ob »človeški uri«.

Vsem drugim zaposlenim na Oddelku za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo Nacionalnega inštituta za biologijo hvala za: pomoč, vzpodbudo, smeh, družabne trenutke in za prenašanje moje malenkosti. Seveda hvala tudi Organizacijskemu odboru d. o. o., ki se je trudil čim bolj razvedriti zaposlene ob posebnih priložnostih.

Dariji za podroben pregled teksta in izboljšanje njegove kvalitete.

Še posebej pa hvala staršem za vso vzpodbudo, ki so mi jo nudili celo življenje in za vse pozitivne misli, ki so jih oddajali, kadar sem to najbolj potrebovala. Hvala vsem prijateljem, predvsem: Kitki, Ani, Jeri, Tatjani in Dušku. In hvala Roku.

PRILOGE

Priloga A: Sestava pufrov za test DAS-ELISA

PUFER ZA NANOS PRIMARNIH PROTITELES (COATING PUFER) (pH 9,6; za 1000 ml)

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g

EKSTRAKCIJSKI PUFER (pH 7,4; za 1000 ml)

Tris	2,4 g
NaCl	8,0 g
PVP (polivinilpirolidon) 24000	20,0 g
KCl	0,2 g
Tween 20	0,5 ml

10 × PBS PUFER (za 1000 ml)

NaCl	80,0 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
Na ₂ HPO ₄	11,5 g
KCl	2,0 g

PUFER ZA SPIRANJE (pH 7,4; za 1000 ml)

10 × PBS pufer	100 ml
Tween 20	0,5 ml

Z dH₂O dopolnimo do končnega volumna.

KONJUGATNI PUFER (pH 7,4; za 1000 ml)

Tris	2,4 g
NaCl	8,0 g
PVP 24000	20,0 g
Tween 20	0,5 ml
BSA (goveji serumski albumin)	2,0 g
MgCl ₂ × 6H ₂ O	0,2 g
KCl	0,2 g

SUBSTRATNI PUFER (pH 9,8; za 1000 ml)

Dietanolamin	97 ml
NaN ₃	0,2 g

Z dH₂O dopolnimo do končnega volumna.

Priloga B: Poravnava CSNV nukleotidnega zaporedja z gerbere in AF067068

Priloga C: Ct in SD vrednosti za COX

Vzorec	COX rezultat (povprečna vrednost Ct)	Standardna deviacija (SD) Ct vrednosti
krizantema 1000 - TSWV kontrola	24,89	0,27
krizantema 800 - CSNV kontrola	22,15	0,32
negativna krizantema	27,99	0,09
paprika 1	20,40	0,14
paprika 2	21,40	0,05
paprika 3	22,99	0,12
negativna paprika	22,89	0,03
krizantema 1001 - listi	26,96	0,04
krizantema 1001 - steblo	28,18	0,07
krizantema 1001 - korenine	27,33	0,08
gerbera	25,49	0,04
nagativna gerbera	27,42	0,05
krizantema 645 - listi	25,61	0,10
krizantema 645 - steblo	24,57	0,03
krizantema 645 - korenine	24,59	0,05
paradižnik 1	25,63	0,14
paradižnik 2	28,48	0,02
negativni paradižnik	27,17	0,19
krizantema A	22,27	0,19
krizantema B	23,22	0,09
krizantema C	22,45	0,11
krizantema D	26,87	0,09
krizantema E	26,43	0,30
verbena 1	24,70	0,21
vrebena 2	27,09	0,39
tobak - <i>N. tabacum</i> WB - okužen z gerbero	25,85	0,10
tobak - <i>N. benthamiana</i> - CSNV kontrola	25,72	0,14
tobak - <i>N. rustica</i> - TSWV kontrola	25,52	0,13
tobak <i>N. benthamiana</i> - INSV kontrola	26,06	0,19

Priloga D: Primerjava qPCR reakcij za določanje ToMV z vmesnimi izračuni koncentracij in standardnih deviacij (SD) ter pripadajočimi koeficienti variacije (CV)

Hipotetična koncentracija ToMV (mg/ml)	Tip analize							
	Znotraj ene reakcije (intra-assay)				Med različnimi reakcijami (inter-assay)			
	Število pozitivnih reakcij (pozitivni / skupno število ponovitev) *	Povpr. izrač. vrednosti konc.	SD izrač. vrednosti konc.	CV izrač. vrednosti konc. (%)	Število pozitivnih reakcij (pozitivni / skupno število ponovitev) **	Povpr. izrač. vrednos ti konc.	SD izrač. vrednos ti konc.	CV izrač. vrednos ti konc. (%)
$4,2 \times 10^{-3}$	3 od 3	0,0041	0,0004	10,9	5 od 5	0,0054	0,0010	17,7
$4,2 \times 10^{-4}$	3 od 3	0,0005	$2,76 \times 10^{-5}$	5,1	5 od 5	0,0005	$6,33 \times 10^{-5}$	13,1
$4,2 \times 10^{-5}$	3 od 3	$4,31 \times 10^{-5}$	$4,62 \times 10^{-6}$	10,7	5 od 5	$3,75 \times 10^{-5}$	$7,26 \times 10^{-6}$	19,3
$4,2 \times 10^{-6}$	3 od 3	$3,27 \times 10^{-6}$	$2,94 \times 10^{-7}$	9,0	5 od 5	$2,96 \times 10^{-6}$	$5,52 \times 10^{-7}$	18,6
$4,2 \times 10^{-7}$	3 od 3	$3,96 \times 10^{-7}$	$6,33 \times 10^{-8}$	16,0	5 od 5	$3,85 \times 10^{-7}$	$5,29 \times 10^{-8}$	13,7
$4,2 \times 10^{-8}$	3 od 3	$3,82 \times 10^{-8}$	$3,56 \times 10^{-9}$	9,3	5 od 5	$3,38 \times 10^{-8}$	$9,03 \times 10^{-9}$	26,8
$4,2 \times 10^{-9}$	3 od 3	$3,98 \times 10^{-9}$	$1,12 \times 10^{-9}$	28,1	5 od 5	$5,20 \times 10^{-9}$	$3,98 \times 10^{-9}$	76,5
$4,2 \times 10^{-10}$	3 od 3	$5,55 \times 10^{-10}$	$8,09 \times 10^{-11}$	14,6	3 od 5	$6,09 \times 10^{-10a}$	$2,81 \times 10^{-10a}$	46,2 ^a
$4,2 \times 10^{-11}$	1 od 3	/	/	/	0 od 5	/	/	/
0 (vodna kontrola)	0 od 3	/	/	/	0 od 5	/	/	/

Priloga E: Rezultati qPCR za ugotavljanje prisotnosti ToMV v mehansko inokuliranih testnih rastlinah *N. glutinosa*

Podatki za umeritveno krivuljo:

vzorec	koncentracija ToMV v vzorcu (mg/ml)	Ct	povprečni Ct
negativna RNA 10-2	0,0042	14,04	
negativna RNA 10-2	0,0042	Ni določen	
negativna RNA 10-2	0,0042	Ni določen	
negativna RNA 10-3	0,00042	17,33	
negativna RNA 10-3	0,00042	17,46	
negativna RNA 10-3	0,00042	17,49	
negativna RNA 10-4	0,000042	20,38	
negativna RNA 10-4	0,000042	20,57	
negativna RNA 10-4	0,000042	19,92	
negativna RNA 10-5	0,0000042	24,01	
negativna RNA 10-5	0,0000042	23,34	
negativna RNA 10-5	0,0000042	23,60	
negativna RNA 10-6	0,00000042	Ni določen	
negativna RNA 10-6	0,00000042	27,90	
negativna RNA 10-6	0,00000042	27,17	
negativna RNA 10-7	0,000000042	30,79	
negativna RNA 10-7	0,000000042	30,73	
negativna RNA 10-7	0,000000042	30,20	
negativna RNA 10-8	4,2E-09	36,51	
negativna RNA 10-8	4,2E-09	34,97	
negativna RNA 10-8	4,2E-09	35,50	
negativna RNA 10-9	4,2E-10	36,28	
negativna RNA 10-9	4,2E-10	37,18	
negativna RNA 10-9	4,2E-10	35,91	
negativna RNA 10-10	4,2E-11	34,20	
negativna RNA 10-10	4,2E-11	33,66	
negativna RNA 10-10	4,2E-11	38,18	

OPOMBA: Označene so tiste vrednosti Ct, kjer je bila vrednost Ct večja od Ct=40.

Formula umeritvene krivulje:

$$y = -3,5982x + 4,7166$$

Korelacijski koeficient:

$$R^2 = 0,9896$$

vzorec	Ct	povprečni Ct	log konc. po formuli	koncentracija v vzorcu (mg/ml)
simpt. list, analiziran z ELISA	Ni določen			
simpt. list, analiziran z ELISA	32,091503	32,81	-7,786065538	1,64E-08
simpt. list, analiziran z ELISA	33,52861			
simpt. list	28,690628			
simpt. list	Ni določen			
simpt. list	28,502766	28,60	-6,627391675	2,36E-07
zgornji list brez simptomov	35,580563			
zgornji list brez simptomov	35,38629			
zgornji list brez simptomov	36,03543	35,48	-8,521242288	3,01E-09

OPOMBA: Označene so tiste vrednosti Ct, ki so presegale vrednost Ct=35,66, ki ustreza vrednosti LOD.

Priloga F: Rezultati qPCR za ugotavljanje prisotnosti ToMV v propagacijskih rastlinah *N. clevelandii*, ki smo jih zalivali s ToMV okuženo vodo in vodovodno vodo

Podatki za umeritveno krivuljo:

vzorec	konzentracija ToMV v vzorcu (mg/ml)	Ct	povprečni Ct
negativna RNA 10-2	0,0042	13,96	
negativna RNA 10-2	0,0042	13,72	
negativna RNA 10-2	0,0042	13,59	
negativna RNA 10-3	0,00042	16,88	16,84
negativna RNA 10-3	0,00042	16,98	
negativna RNA 10-3	0,00042	16,66	
negativna RNA 10-4	0,000042	20,39	20,27
negativna RNA 10-4	0,000042	20,20	
negativna RNA 10-4	0,000042	20,21	
negativna RNA 10-5	0,0000042	23,56	23,59
negativna RNA 10-5	0,0000042	23,61	
negativna RNA 10-5	0,0000042	23,60	
negativna RNA 10-6	0,00000042	26,66	26,65
negativna RNA 10-6	0,00000042	26,79	
negativna RNA 10-6	0,00000042	26,50	
negativna RNA 10-7	0,000000042	30,03	30,09
negativna RNA 10-7	0,000000042	30,05	
negativna RNA 10-7	0,000000042	30,19	
negativna RNA 10-8	4,2E-09	33,46	33,60
negativna RNA 10-8	4,2E-09	33,55	
negativna RNA 10-8	4,2E-09	33,78	
negativna RNA 10-9	4,2E-10	36,80	36,96
negativna RNA 10-9	4,2E-10	37,04	
negativna RNA 10-9	4,2E-10	37,05	
negativna RNA 10-10	4,2E-11	41,11	
negativna RNA 10-10	4,2E-11	39,16	
negativna RNA 10-10	4,2E-11	39,28	

OPOMBA: Označena je tista vrednost Ct, ki je bila večja od Ct=40

Formula umeritvene krivulje:
 $y = -3,3188x + 5,7152$

Korelacijski koeficient:
 $R^2 = 0,9995$

vzorec	Ct	povprečni Ct	log konc. po formuli	konzentracija v vzorcu (mg/ml)	konzentracija v vzorcu z upoštevanjem faktorja redčitve (mg/ml)	povprečna koncentracija vzorca (mg/ml)
tobak, originalna voda Ivanci	39,69					
tobak, originalna voda Ivanci	38,90					
tobak, originalna voda Ivanci	38,54					
tobak 10× redč., originalna voda Ivanci	Ni določen					
tobak 10× redč., originalna voda Ivanci	Ni določen					
tobak 10× redč., originalna voda Ivanci	Ni določen					
tobak, elucijska frakcija Ivanci	34,03	34,11	-8,55473181	2,79E-09		
tobak, elucijska frakcija Ivanci	34,20					
tobak, elucijska frakcija Ivanci	34,09					
tobak 10 × redč., elucijska frakcija Ivanci	37,54	36,50	-9,274694588	5,31E-10	5,31E-09	4,05E-09
tobak 10 × redč., elucijska frakcija Ivanci	36,53					
tobak 10 × redč., elucijska frakcija Ivanci	36,47					
tobak, vodovodna voda	Ni določen					
tobak, vodovodna voda	38,07					
tobak 10 × redč., vodovodna voda	Ni določen					
tobak 10 × redč., vodovodna voda	Ni določen					

OPOMBA: Označene so tiste vrednosti Ct, ki so presegale vrednost 36,96, ki ustreza vrednosti LOD.

Priloga G: Rezultati štirih poskusov DAS-ELISA

Primerjava OD vrednosti pri vzorcih z različno koncentracijo ToMV in pripadajočih umeritvenih krivulj med štirimi ločenimi poskusi.

red črtov	c ToMV (ng/ml)	OD	OD		OD
			preko praga	preko praga	
15000	28	preko praga			preko praga
20000	21	preko praga			preko praga
45000	9,3	2,708	2,615	2,562	2,738
60000	7	2,178	2,141	2,076	2,243
135000	3,1	1,005	1,046	0,975	1,165
180000	2,3	0,914	0,855	0,807	0,986
405000	1,04	0,501	0,536	0,533	0,573
540000	0,8	0,704	0,402	0,458	0,495
1215000	0,34	0,509	0,317	0,343	0,356
1620000	0,26	0,583	0,226	0,239	0,260
neg. kontrola	0	0,267	0,127	0,187	0,157
Formula umeritvene krivulje:		$y = 1,0219\ln(x) + 0,1982$	$y = 0,8795\ln(x) + 0,3926$	$y = 0,6636\ln(x) + 0,6451$	$y = 0,7223\ln(x) + 0,7186$
R2 koeficient:		0,996	0,997	0,998	0,997

OPOMBA: Označene so tiste vrednosti, ki smo jih uporabili za izris umeritvene krivulje. Spodnjo mejo so predstavljale tiste vrednosti, ki so najprej presegle dvakratno vrednost OD negativne kontrole.