

Diagnostyka¹ Diagnostic

Beet necrotic yellow vein virus (benyvirus)

Zakres

Standard opisuje protokół diagnostyczny dla *Beet necrotic yellow vein virus (benyvirus)* (wirus nekrotycznego żółknięcia nerwów buraka- przyp. tłum).

Zatwierdzenie i nowelizacja

Standard ten został opracowany w ramach projektu UE DIAGPRO (SMT 4-CT98-2252) przy współpracy laboratoriów i w oparciu o wzajemne porównanie wyników uzyskanych przez laboratoria w krajach europejskich. Zatwierdzony jako standard EPPO we wrześniu 2003. Zrewidowany 2006-09.

Wprowadzenie

Rizomania jest chorobą buraka cukrowego i po raz pierwszy została odnotowana we Włoszech (Canova, 1959). Od tego czasu obecność choroby odnotowano w ponad 25 krajach. Choroba powoduje straty ekonomiczne w uprawie buraka cukrowego (*Beta vulgaris* var. *saccharifera*) poprzez redukcję plonów. Rizomania powodowana jest przez *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV), który to przenoszony jest przez bytującego w glebie pierwotniaka *Polymyxa betae* (rodzina *Plasmodiophoraceae*). Wirus potrafi przetrwać w sorusach *P. betae* przez okres ponad 15 lat. Objawy rizomanii, znane również jako „szaleństwo korzeni”, obejmują powstanie brody korzeniowej, zahamowanie wzrostu, chlorozę liści, żółte unerwienie oraz nekrozę żyłek liściowych. Wirus rozprzestrzeniany jest poprzez ruch gleby, głównie za sprawą urządzeń mechanicznych, wraz z korzeniami buraków cukrowych, wysadkami, z korzeniami innych roślin uprawnych, takich jak ziemniaki, a także wraz z kompostem i ziemią. Woda jest istotnym czynnikiem w rozprzestrzenianiu się grzybowego wektora; woda drenażowa, rowy oraz nawadnianie wodą mającą styczność z zainfekowanymi uprawami może sprzyjać chorobie. W obecności dużej ilości wody wysoka temperatura może stymulować rozwój *P. betae*. Działania kontrolne obejmują: oczyszczanie maszyn

¹ Ryciny w niniejszym standardzie oznaczone „Web Ryc.” zostały opublikowane na stronie internetowej EPPO www.eppo.org.

rolniczych z ziemi po zbiorze buraków, co pozwala uniknąć ponownego wprowadzenia do gospodarstwa produkcyjnego produktów ubocznych, staranne usuwanie pozostałości po obróbce materiału siewnego, importowanie sadzeniaków ziemniaka z obszarów wolnych od rizomanii. Na obszarach dotkniętych chorobą powszechnie uprawiane są odmiany buraka cukrowego tolerancyjne na chorobę.

BNYVV jest organizmem regulowanym w obrębie Unii Europejskiej w strefach chronionych (UE, 2000), obecnie w Bretanii (FR), Finlandii, Irlandii, Azorach (PT), oraz w Irlandii Północnej (GB).

Tożsamość

Nazwa: *Beet necrotic yellow vein virus*

Akronim: BNYVV

Stanowisko taksonomiczne: Wirusy, *Benyvirus*

Komputerowy kod EPPO: BNYVV0

Kategoria fitosanitarna: EPPO -lista A2, nr 160; UE – Załącznik I/B.

Wykrywanie

Choroba dotyka wszystkie podgatunki *Beta vulgaris*, wliczając buraka cukrowego (*Beta vulgaris* subsp. *maritima*), buraka pastewnego (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*), buraka ćwikłowego (*Beta vulgaris* subsp. *cicla*), mangold (*Beta vulgaris* subsp. *Vulgaris*), kapustę morską (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*), boćwina (*Beta vulgaris* subsp. *cicla*), a także szpinak (*Spinacea oleracea*).

Objawy rizomanii

Liście

Objawy często można wyraźnie zaobserwować na zdjęciach lotniczych jak również na tych wykonanych z ziemi. Widoczne są na nich wyraźne, żółte place (Web Ryc. 1). Podczas inspekcji na miejscu da się zauważyć co następuje:

- słabo wybarwione listowie o kolorze od jasnozielonej barwy sałaty do cytrynowożółtego
- żółtaczka nerwów postępująca od głównej żyły liścia (Web Ryc. 2)
- pionowo wydłużone liście z wydłużonymi ogonkami i zwężonymi blaszkami liściowymi (Web Ryc. 3)
- rośliny karłowate i/lub zwiędłe (możliwie bez objawów liściowych).

Korzenie

- ciemnobrązowe brodate korzenie (może to być niewielki i/lub pojedynczy korzeń boczny z rozrośniętym systemem korzeni włóknikowych w pobliżu wierzchołka) (Web Ryc. 4)
- zwężenie korzeni

- jasnożółte do brązowego odbarwienie naczyń na przekroju poprzecznym
- guzki (małe tumorowate narośla wzdłuż korzenia głównego).

Powyższe objawy rzadko można zaobserwować jednocześnie na pojedynczej roślinie. Odmiany tolerancyjne na rizomanię mogą wykazywać typowe objawy tylko w przypadku wysokiego poziomu infekcji wirusowej.

Identyfikacja

Pobieranie próbek

Próbki powinny być pobrane z określonych żółtych miejsc w uprawach buraków (zidentyfikowanych dzięki zdjęciom lotniczym, itp.). W celu wykopania korzeni należy użyć wideł lub szpadla (szczególnie w suchej, twardej, zapieczonej ziemi). Należy zadbać by podważyć buraka w całości ponieważ wierzchołek korzenia oraz korzenie boczne ze 'szczurzymi ogonkami' w łatwy sposób mogą się odłamać i pozostać w ziemi. Każda próbka powinna składać się z niższej trzeciej części korzenia głównego z 5 lub 6 roślin wykazujących objawy. Każda próbka powinna być oddzielnie oznakowana i umieszczona w opisanej, plastikowej torebce².

Przygotowanie próbki

Do badań laboratoryjnych próbki buraka cukrowego powinny być dokładnie opłukane w zimnej wodzie w celu usunięcia luźnej gleby z korzeni i osuszone na chłonnym papierze. Próbki do dalszej obróbki powinny zostać umieszczone w oznakowanych torebkach foliowych.

Próbki do testów pułpkowych

Próbki gleby pochodzące z pola mogą być przebadane w kierunku obecności rizomanii poprzez wysadzenie w owej glebie buraków podatnych (test pułpkowy), w szklarni lub w komorach fitotronowych. Łącznie należy pobrać 2,5 kg ziemi z miejsca, przemieszczając się na kształt litery W w obrębie każdego z obszarów pobierania próbek. Każda próbka powinna być odrębnie oznakowana i umieszczona w opisanej, plastikowej torebce.

Przygotowanie próbki do testu płytkowego

Patrz Załącznik 6.

Badania przesiewowe

ELISA jest najlepszym oraz najbardziej opłacalnym ogólnym badaniem przesiewowym (Załącznik 1).

²

W Polsce (Jeżewska & Piszczek, 2001) do rutynowych badań buraka cukrowego testem ELISA w kierunku BNYVV pobierane są liście. Generalnie przydatność tej metody nie została oceniona w regionie EPPO i może być zależna od czynników, takich jak koncentracja wirusa oraz lokalne warunki środowiskowe.

Izolacja

Mechaniczna inokulacja wirusa na rośliny testowe

Zainokulowane liście *Beta vulgaris* (buraka cukrowego) zazwyczaj wykazują chlorotyczne zmiany po upływie 6–8 dni. Sporadycznie jasnożółte, chlorotyczne zmiany można zaobserwować w nerwach liściowych. Zakażenie rzadko ma charakter systemiczny. *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium amaranticolor*, *Tetragonia expansa*: chlorotyczne lub nekrotyczne zmiany rozwijają się po 5 – 7 dniach. *Nicotiana tabacum*, *Lycopersicon esculentum* oraz *Phaseolus vulgaris* są niepodatne i mogą być pomocne w odróżnieniu BNYVV od innych wirusów o pałeczkowatym kształcie, np. *Tobacco rattle virus*, *Tobacco mosaic virus*, *Pea early browning virus*. Dla pełnego opisu zakresu gospodarzy, roślin podatnych i niepodatnych, patrz Tamada & Baba (1973). Dla nowych gospodarzy, patrz Horváth (1994).

Powinno się zastosować przynajmniej dwie rośliny wskaźnikowe i dwie, które nie są podatne. Korzenie boczne buraka cukrowego są myte i rozcierane w moździerzu z dodatkiem małej łyżeczki pełnej celitu i taką ilością wody destylowanej, by powstała luźna pasta. Roślina wskaźnikowa, np. *Chenopodium quinoa*, inokulowana jest w stadium sześciu lub więcej w pełni wykształconych liści, poprzez delikatne pokrycie liści zawieszoną korzeń/celitem, palcem pokrytym jednorazową rękawiczką. Po upływie 5 min, rośliny spłukiwane są wodą kranową w celu usunięcia pozostałości ścierniwa i pozostawiane na noc pod przykryciem, by osłonić je od światła. Następnego dnia, przykrycie jest usuwane, a rośliny uprawia się przez 6 –10 dni w 18 – 20 °C, nawadniając codziennie w miarę potrzeb. Rośliny testowe zakażone BNYVV wytwarzają charakterystyczne, chlorotyczne zmiany (Web Ryc. 5). Objawy nie powinny się pojawić na roślinach żywicielskich, które są niepodatne. Ponieważ mechaniczna inokulacja nie zawsze jest skuteczna, mogą wystąpić fałszywie negatywne wyniki.

Polymyxa betae

Obecność *Polymyxa betae*, pierwotniaka będącego wektorem BNYVV w korzeniach, może ułatwić postawienie wstępnej diagnozy w kierunku BNYVV, ale jego nieobecność nie oznacza wcale, że korzenie nie są zainfekowane. Podejrzone korzonki płukane są w zimnej wodzie i suszone na chłonnym papierze. Wybrana próbka, delikatnie umieszczona w wodzie, na mikroskopowym szkiełku podstawowym, przykryta szkiełkiem nakrywkowym, badana jest w kierunku obecności charakterystycznych sorusów w komórkach korzeni, w mikroskopie świetlnym, pod powiększeniem $\times 10$. Powiększenie $\times 40$ może być użyte w celu bliższej analizy (Web Ryc. 6). Dostrzec można również inne stadia rozwojowe *P. betae*, takie jak zarodnie i plazmodia.

Badanie(nia) potwierdzające

Test ELISA

Próbka 0,5 – 1 g przepłukanych korzeni bocznych lub głównych podlega obróbce zgodnie z procedurą zawartą w Załączniku 1. Wartość odczytu próbki w teście ELISA powinna wynieść więcej niż 2-3 krotność kontroli negatywnej. Patrz szczegółowe instrukcje dołączone do surowic.

Badanie RT-PCR

Procedura postępowania z próbką przepłukanych korzeni bocznych lub głównych (które można było przechowywać w formie zamrożonej) opisana jest w Załączniku 2³.

Immunocapture PCR

Próbka przepłukanych korzeni bocznych lub głównych (które można było przechowywać w formie zamrożonej) podlega obróbce zgodnie z procedurą zawartą w Załączniku 3.

TaqMan® RT-PCR

Próbka przepłukanych korzeni głównych lub bocznych (które można było przechowywać w formie zamrożonej lub zliofilizowanej) podlega obróbce zgodnie z procedurą zawartą w Załączniku 4.

Badania z zastosowaniem mikroskopii elektronowej

Próbka przepłukanych korzeni głównych lub bocznych badana jest zgodnie z procedurami EM, IEM lub znakowania złotem (Załącznik 5).

Badania gleby

Gleba z pól podejrzanych o porażenie rizomanią może być przebadana za pomocą testu pułapkowego, z wykorzystaniem siewek buraka cukrowego (Załącznik 7), które następnie poddawane są badaniu testem ELISA (Załącznik 1). Optymalny czas dla przeprowadzenia testu pułapkowego to 6 tygodni dla testu angielskiego (Henry i wsp., 1992; Tuitert & Bochen, 1993) lub 3 – 4 tygodnie dla testu francuskiego (LNPV Fleury method). Jeśli wymagana jest szybsza metoda, może być wykonany RT-PCR (Załącznik 2) lub TaqMan® RT-PCR (Załącznik 4) po upływie 3 tygodni dla testu angielskiego (Henry i wsp., 1995). *Beet soil-borne virus (pomovirus)* jest innym wirusem o pałeczkowatym kształcie zakażającym buraki, który również jest przenoszony przez *Polymyxa betae*. *Beet soil-borne mosaic virus (benyvirus)* jest również blisko spokrewniony, ale serologicznie odmienny. Testy diagnostyczne poddane badaniom międzylaboratoryjnym zalecane w tym protokole są specyficzne względem BNYVV i nie wykryją żadnych innych wirusów. Należy postępować zgodnie z procedurami wykrywania i identyfikacji opisanymi w tym protokole oraz zgodnie ze schematem decyzyjnym przedstawionym na Ryc. 1 lub 2. Pozytywna identyfikacja BNYVV (w pierwotnej roślinie lub w roślinie wskaźnikowej) powinna być przeprowadzona przy użyciu testu ELISA i/lub metod PCR (patrz Załączniki). Może być wymagane potwierdzenie obecności wirusa, z użyciem metody odmiennej aniżeli pierwotnie użyta (np. jeśli jako pierwszej użyto metody serologicznej, w celu potwierdzenia używa się metody molekularnej). Patrz Ryciny 1 i 2 oraz Załączniki. Jakikolwiek pierwsze wykrycie powinno być potwierdzone przez inne badanie.

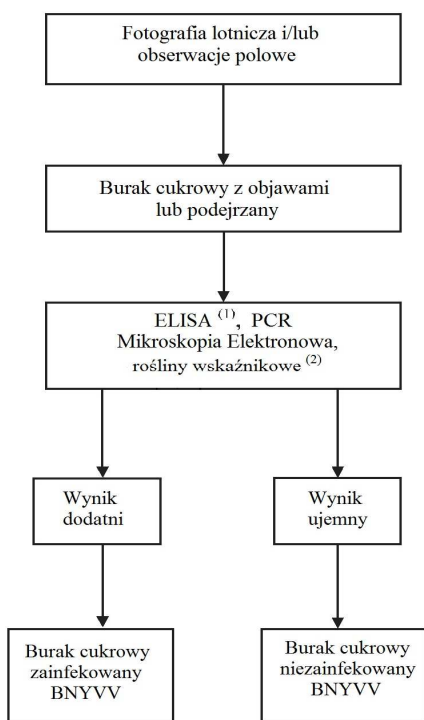
Inne testy stosowane do wykrywania BNYVV głównie w celach badawczych

Profilowanie białek

³ Opracowano multiplex PCR, dzięki któremu można wykryć BNYVV, BSBV, wirusa Q buraka oraz *Polymyxa betae* (Meunier i wsp., 2003). Był on sprawdzany i porównywany (Université Catholique de Louvain-la Neuve) (UCL) przez autorów w porównaniu z protokołem PCR DIAGPRO.

Ekstrakty z całych komórek można zdenaturować i rozdzielić przy pomocy SDS– PAGE. Białko płaszczka BNYVV ma wielkość Mr 21 kDa. Można przeprowadzić również Western blotting (Torrance *i wsp.*, 1988).

Ryc. 1 Schemat wykrywania i identyfikacji *Beet necrotic yellow vein benyvirus* w buraku cukrowym.



(1) Najwłaściwszym i najszybszym testem przesiewowym zdaje się być ELISA (Załącznik 1), którą należy powtórzyć jeśli uzyskany wynik jest niejasny. Testy płytkowe (Załącznik 6) mogą być stosowane w polu i w przypadku małej ilości próbek laboratoryjnych.

(2) Badanie testem ELISA jest zazwyczaj wystarczające do diagnozy ale jeśli nastąpi taka konieczność istnieje możliwość wykonania testów alternatywnych: PCR (Załącznik 2) i TaqMan® PCR (Załącznik 4). Dodatkowe testy obejmują mechaniczną inokulację roślin wskaźnikowych oraz mikroskopię elektronową (Załącznik 5).

Oznaczanie ilościowe *Polymyxa betae* w próbkach gleby porażonych rizomanią

Możliwe jest oszacowanie ilości infekcyjnych jednostek *P. betae* przenoszących wirusa w zakażonej glebie poprzez wykonanie serii rozcieńczeń gleby, metodą najbardziej prawdopodobnej liczby (metoda MPN, z ang. *most probable number*- przyp. tłum.) i test pułapkowy (Ciafardini, 1991).

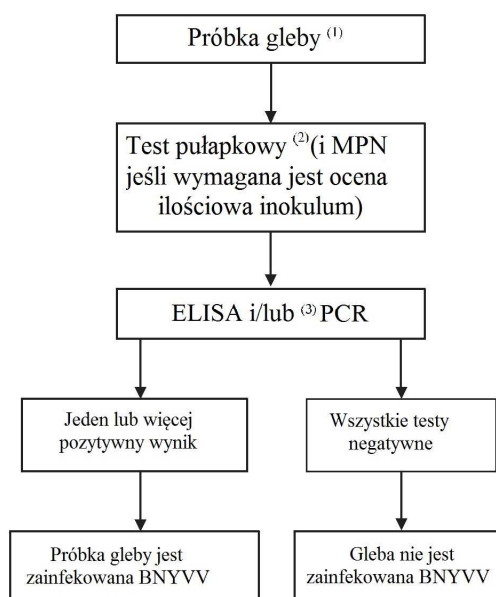
Tissue print-immunoblotting korzeni

Istnieje możliwość wskazania, poprzez immunoblotting na przekroju podłużnym korzenia buraka cukrowego, gdzie w danej roślinie dochodzi do koncentracji wirusa. Sposób ten był używany bardziej w dziedzinie badań i rozwoju techniki, aniżeli w ogólnej diagnozie (Kaufmann *i wsp.*, 1992).

Patotypy A, B & P

Różne patotypy BNYVV, określane jako A oraz B, po raz pierwszy zostały zidentyfikowane przez Koenig *i wsp.* (1994). Zostały one zaklasyfikowane do odpowiednich grup w oparciu o szereg cech molekularnych.

Fig. 2 Schemat wykrywania i identyfikacji *Beet necrotic yellow vein benyvirus* w próbkach gleby.



⁽¹⁾ Standardowa wielkość próbki gleby to 0,5–2,5 kg. Jednak procedura może być stosowana dla mniejszych próbek.

⁽²⁾ Testy pułapkowe: (Załącznik 7).

⁽³⁾ Badanie testem ELISA (Załącznik 1) jest normalnym sposobem wykonania badania dużej ilości próbek w kierunku BNYVV i może być stosowane jako jedyny test przesiewowy, pod warunkiem zastosowania przeciwciał o wysokiej specyficzności. Test jest w stanie wykryć koncentracje wirusa do 10^{-3} , do tego jest tani i szybki. Jeśli wymagane jest dodatkowe badanie potwierdzające powinno być ono oparte raczej na odmiennych biologicznie zasadach.

PCR (Załącznik 2) jest około 800 razy bardziej czuły niż standardowy test TAS ELISA, próg wykrywalności to 10^{-6} dla ekstraktów z korzeni. TaqMan® PCR (Załącznik 4) jest w przybliżeniu 10 000 razy bardziej czuły niż konwencjonalny PCR. Ponieważ podczas przygotowywania wymagana jest skrajna ostrożność w celu uniknięcia kontaminacji i fałszywie pozytywnych wyników, potrzebni są wykwalifikowani operatorzy.

Różnice w sekwencji pomiędzy typami A & B są subtelne, duży procent sekwencji jest taki sam. Obecnie niezawodnym sposobem na wykrycie różnic pomiędzy szczepami jest sekwencjonowanie. W celu dostarczenia metody różnicowania europejskich typów A, B oraz P wirusa BNYVV, bardziej wiarygodnej aniżeli użycie analiz RFLP oraz SSCP (Koenig i wsp., 1995), Koenig & Lenne (2000) użyli sekwencjonowania. Genomy izolatów BNYVV okazały się być niezwykle stabilne.

Powszechnie występujące izolaty BNYVV zawierają RNA 1– 4. Typ A rozprzestrzeniony jest na terenie większości europejskich krajów (Kruse i wsp., 1994), USA, Chin oraz Japonii. Typ B jest nieco bardziej ograniczony, generalnie do terytorium Niemiec, Francji oraz UK. Mogą zdarzyć się mieszanki tych szczepów. Izolaty A i B mogą być rozróżnione również przy użyciu PCR (Ratti i wsp., 2005). Izolaty BNYVV zawierające dodatkowe, genomowe RNA (RNA 5) zostały odnalezione w Japonii i Chinach (Tamada i wsp., 1989; Miyaniishi i wsp., 1999). Występowanie tych izolatów, które zostały opisane jako patotyp P, odnotowano również w Europie, w pobliżu Pithiviers (FR) (Koenig i wsp., 1997), oraz w pobliżu Norwich (GB) (Harju i wsp., 2002). Podobne szczepy BNYVV zawierające RNA 5 zostały odnalezione w Kazachstanie (Koenig & Lennefors, 2000). Istnieją pewne dowody sugerujące, że izolaty zawierające RNA 5 są bardziej wirulentne aniżeli innych patotypów (Tamada i wsp., 1996) oraz, że odmiany buraka cukrowego posiadające zróżnicowany poziom odporności różnią się stopniem odpowiedzi na różne patotypy BNYVV. Izolaty typu B wydają się być mniej szkodliwe aniżeli typu A lub P. Wydaje się, że izolaty typu P powodują wyższą zawartość wirusa, aniżeli typu A lub B (Heijbroek i wsp., 1999). Japoński test PCR dla RNA 5 opublikowany został przez Kiguchi i wsp. (1996), a do detekcji RNA 5 w UK zastosowany został TaqMan® PCR (Harju i wsp., 2002) oraz (Harju i wsp., 2005) (patrz Załącznik 4).

Rozwój diagnostyki w przyszłości

Ostatnio opublikowane prace opisują zastosowanie nowego typu produkcji przeciwciał ze specyficznych względem BNYVV jednołańcuchowych fragmentów zmiennych przeciwciał (ang. single chain variable fragments) (scFvs) (Griep i wsp., 1999; Uhde i wsp., 2000). Ci ostatni autorzy osiągnęli dobre rezultaty badając składowane korzenie buraka cukrowego z zastosowaniem przeciwciał wytworzonych z fragmentów scFvs. Specyficzność tych nowych przeciwciał w teście ELISA może w przyszłości mieć znaczenie dla ich zastosowania jako odczynnika w czułych diagnostycznych analizach. Został opracowany test ELISA do wykrywania *Polymyxa betae* z zastosowaniem zrekombinowanych przeciwciał (Kingsnorth i wsp. 2003). Zaobserwowano bliską korelację pomiędzy ilością zoospor *P. betae* w seryjnie rozcieńczonych zawiesinach, a wartościami absorbancji w badaniu testem ELISA.

W Stanach Zjednoczonych, do badań nad rizomanią, został przetestowany system teledetekcji używający hiperspektralnego odbicia od liścia oraz multispektralnego odbicia na poziomie pokrywy roślinnej (Steddom i wsp., 2003). Zaobserwowano, że całkowity azot liścia był znacząco niższy w przypadku roślin buraka wykazujących objawy, aniżeli w przypadku zdrowych buraków. U roślin z objawami zredukowany był również poziom chlorofilu oraz karotenoidów. Ten sposób segregacji sprawdzał się najlepiej w sierpniu, stopniowo zmniejszając swoją dokładność aż do zbiorów. Uzyskane wyniki pokazują, że techniki teledetekcji mogą być używane w celu ułatwienia wykrywania rizomanii.

Raport i dokumentacja z badań

Wytyczne odnośnie raportów i dokumentacji z badań zawarte są w Standardzie EPPO PM7/77 (1) *Documentation and reporting on a diagnosis*.

Dodatkowe informacje

Dodatkowe informacje odnośnie *Beet necrotic yellow vein virus* można uzyskać w:

Pest and Disease Identification Team (PLHB) oraz Immunological and Molecular Methods Team (PLHC), Central Science Laboratory, Sand Hutton, York YO41 1LZ, United Kingdom, e-mail: v.harju@csl.gov.uk.

Informacje te można uzyskać również od innych instytutów, łącznie z Institute for Plant Virology, Microbiology and Biosafety, Messeweg 11/12, D-38104, Braunschweig, Germany, e-mail: Biosearch@bba.de oraz Institut International de Recherches Betteravières 195, Avenue de Tervuren B-1150Bruxelles, Belgium, e-mail: mail@iirb.org.

Podziękowania

W oryginale protokół ten został napisany przez: V. Harju, Central Science Laboratory, York (GB).

Francuski test pułapkowy (LNPV Fleury method) opracowany został przez: F. Vey, LNPV Fleury les Aubrais.

Główne testy diagnostyczne zalecane w tym protokole poddane były badaniom

międzylaboratoryjnym w różnych laboratoriach europejskich⁴. We wszystkich przypadkach badane były pojedyncze próbki. Nie badano próbek mieszanych, stosowanych czasem w obszernych badaniach.

Materiały źródłowe⁵

Canova A (1959) [On the pathology of sugar beet]. *Informatore Fitopatologico* 9, 390 – 396 (in Italian).

Chang S, Puryear J & Cairney J (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* 11,113–116.

Ciafardini G (1991) Evaluation of Polymyxa betae Keskin contaminated by beet necrotic yellow vein virus in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 1817 –1821.

EU (2000) Council Directive 2000/29 of 8 May 2000 on protective measures against the introduction into the Community of organisms harmful to plants or plant products and against their spread within the Community. *Official Journal of the European Communities* L169, 1–112.

Grassi G, Cerato C, Benso P & Borgatti S (1988) Monoclonal and conventional antibodies for the detection of beet necrotic yellow vein virus(BNYVV) in sugar beet. *Phytopathologia Mediterranea* 27, 125 – 132.

Griep RA, Twisk C & van Schots A (1999) Selection of beet necrotic yellow vein virus specific single-chain Fv antibodies from a semi-synthetic combinatorial antibody library. *European Journal of Plant Pathology* 105, 147–156.

Harju VA, Mumford RA, Blockley A, Boonham N, Clover GRG, Weekes R & Henry CM (2002) The identification of isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* from the United Kingdom which contain RNA 5. *Plant Pathology* 51, 811.

Harju VA, Skelton A, Clover GRG, Ratti C, Boonham N, Henry CM & Mumford RA (2005) The use of real time RT- PCR (TaqMan®) and post ELISA virus release for the detection of Beet necrotic yellow vein virus types containing RNA 5 and its comparison with conventional PCR. *Journal of Virological Methods* 123, 73– 80.

Harness AM, Johnson JC, Kulemeka BP, Sutula CL & Badla MD (2003) Immunocapture RT-PCR as a confirmation tool for ELISA. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 110, 101. (Abstract) [[http:// www.agdia.com/references/immunocaptureposter.pdf](http://www.agdia.com/references/immunocaptureposter.pdf)].

Heijbroek W, Musters PMS & Schoone AHL (1999) Variation in pathogenicity and multiplication

⁴ L. Potyondi (Beta Kutato Kft, Sopronhorpacs, HU); C. Bragard (UCL Unit of Phytopathology, Louvain-la Neuve, BE); S. L. Nielsen (Danish Institute of Agricultural Sciences, Flakkebjerg, DK); M. Jezewska (Instytut Ochrony Roślin, Poznań, PL); C. Ratti (DISTA, University of Bologna, IT); C. H. B. Olsson (SLU, Plant Pathology and Biocontrol Unit, Göteborg, SE); G. W. van den Bovenkamp (Laboratory Methods & Diagnostics, NAK, Emmeloord, NL); S. Steyer (Research Station of the Ministry of Agriculture, Gembloux, BE); D. Vilsan (Central Laboratory for Phytosanitary Quarantine, Bucharest, RO); E. Pocsai (Fejér Megyei Növény- és Talajvédelmi Szolgálat, Virologiai Laboratórium, Velence, HU).

⁵ Została zachowana oryginalna pisownia (przyp. tłum.)

of *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in relation to the resistance of sugar beet cultivars. *European Journal of Plant Pathology* **105**, 397–405.

- Henry CM, Barker I, Morris J & Hugo SA (1995) Detection of beet necrotic yellow vein virus using reverse transcription and polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* **54**, 15–28.
- Henry CM, Harju V, Brewer G & Barker I (1992) Methods for the detection of *Rhizomania* in soil. *Aspects of Applied Biology* **32**, 129–133.
- Horváth J (1994) Beet necrotic yellow vein furovirus 1 new host. *ActaPhytopathologica et Entomologica Hungarica* **29**, 109–118.
- Hughes DW & Galau G (1988) Preparation of RNA from cotton leaves and pollen. *Plant Molecular Biology Reporter* **6**, 253–257.
- Jezewska M & Piszczek J (2001) Surprisingly high frequency of detection of *Beet necrotic yellow vein virus* in sugar beet leaves by ELISA. *Phytopathologic Polonica* **21**, 165–170.
- Kaufmann A, Koenig R & Lesemann DE (1992) Tissue print-immunoblotting reveals an uneven distribution of beet necrotic yellow vein and beet soil-borne viruses in sugar beets. *Archives of Virology* **126**, 329–335.
- Kiguchi T, Saito M & Tamada T (1996) Nucleotide sequence analysis of RNA-5 of five isolates of beet necrotic yellow vein virus and the identity of a deletion mutant. *Journal of General Virology* **77**, 575–580.
- Kingsnorth CS, Asher MJC, Keane GJP, Chwarszczynska DM, Luterbacher MC & Mutasa-Göttgens ES (2003) Development of a recombinant anti- body ELISA test for the detection of *Polymyxa betae* and its use in resistance screening. *Plant Pathology* **52**, 673–680.
- Koenig R, Haeberle AM & Commandeur U (1997) Detection and characterization of a distinct type of beet necrotic yellow vein virus RNA 5 in a sugar beet growing area in Europe. *Archives of Virology* **142**, 1499–1504.
- Koenig R, Kruse M, Hoffmann H, Heijbroek W, Buttner G, Lindsten K & Paul (1994) The existence of possible pathotypes of *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) and their possible impact on partially resistant sugar beet varieties.
- In Proceedings of the 57th IIRB Winter Congress. IIRB, Bruxelles (BE). Koenig R & Lennefors BL (2000) Molecular analyses of European A, B and P type sources of beet necrotic yellow vein virus and detection of the rare P type in Kazakhstan. *Archives of Virology* **145**, 1561–1570.
- Koenig R, Lesemann DE & Burgermeister W (1984) Beet necrotic yellow vein virus: purification, preparation of antisera and detection by means of ELISA, immunosorbent electron microscopy and electro-blot immunoassay. *Phytopathologische Zeitschrift* **111**, 244–252.
- Koenig R, Luddecke P & Haeberle AM (1995) Detection of beet necrotic yellow vein virus strain,

varieties and mixed infections by examining single-strand confirmation polymorphism of immunocapture RT-PCR products. *Journal of General Virology* **76**, 2051–2055.

- Kruse M, Koenig R, Hoffmann A, Kaufmann A, Commandeur U, Solovyev AG, Savenkov I & Burgmeister W (1994) Restriction fragment length polymorphism analysis of reverse transcription-PCR products reveals the existence of two major strain groups of beet necrotic yellow vein virus. *Journal of General Virology* **75**, 1835–1842.
- Meunier A, Schmit J-F, Stas A, Kutluk N & Bragard C (2003) Multiplex RTPCR for the simultaneous detection of *Beet necrotic yellow vein virus*, *Beet soil borne virus*, *Beet virus Q* and their vector *Polymyxa betae* Keskin on sugar beet. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 2356 – 2360.
- Miyaniishi M, Kusume T & Tamada T (1999) Evidence for three groups of sequence variants of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA 5. *Archives of Virology* **144**, 879–892.
- Morris J, Clover GRG, Harju VA, Hugo SA & Henry CM (2001) Development of a highly sensitive nested RT-PCR method for Beet necrotic yellow vein virus detection. *Journal of Virological Methods* **95**, 163–169.
- Mumford RA, Walsh K, Barker I & Boonham N (2000) Detection of Potato mop-top and Tobacco rattle virus using a multiplex real-time fluorescent reverse transcription polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* **90**, 448–453.
- Ratti C, Clover GRG, Rubies-Autonell C, Harju VA & Henry CM (2005) A Multiplex RT-PCR assay capable of distinguishing beet necrotic yellow vein virus types A and B. *Journal of Virological Methods* **124**, 41–47.
- Spiegel S & Martin RR (1993) Improved detection of potato leafroll virus in dormant potato tubers and microtubers by the polymerase chain reaction and ELISA. *Annals of Applied Biology* **122**, 493–500.
- Steddom K, Heidel G, Jones D & Rush CM (2003) Remote detection of rhizomania in sugar beets. *Phytopathology* **93**, 720–726.
- Tamada T & Baba T (1973) Beet necrotic yellow vein virus from rhizomania- affected sugar beet in Japan. *Annals of Phytopathological Society of Japan* **39**, 325–331.
- Tamada T, Kusume T, Uchino H, Kiguchi T & Saito M (1996) Evidence that Beet necrotic yellow vein virus RNA 5 is involved in symptom development of sugar beet roots. In *Proceedings of the Third Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors* (Ed. Sherwood, JL & Rush, CM), pp. 49 – 52. American Society of Sugar beet Technologists, Denver (US).
- Tamada T, Shirako Y, Abe H, Saito M & Kiguchi T (1989) Production and pathogenicity of isolates of beet necrotic yellow vein virus with different numbers of RNA components. *Journal of General Virology* **70**, 399–409.

- Torrance L, Pead MT & Buxton G (1988) Production and some characteristics of monoclonal antibodies against beet necrotic yellow vein virus. *Annals of Applied Biology* **113**, 519–530.
- Tuitert G (1990) Assessment of the inoculum potential of *Polymyxa betae* and beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in soil using the most probable number method. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **96**, 331–341.
- Tuitert G & Bochen GJ (1993) Recovery of resting spores of *Polymyxa betae* from soil and the influence of duration of the bioassay on the detection level of beet necrotic yellow vein virus in soil. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **99** (Suppl. 3), 219–230.
- Uhde K, Kerschbaumer RJ, Koenig R, Hirschl S, Lemaire O, Boonham N, Roake W & Himmler G (2000) Improved detection of *Beet necrotic yellow vein virus* in a DAS ELISA by means of antibody single chain fragments (scFv) which were selected to protease-stable epitopes from phage display libraries. *Archives of Virology* **145**, 179–185.

Załącznik 1. Test ELISA

Materiały zalecane do testu ELISA

Bufor homogenizacyjny

Bufor ten używany jest do maceracji tkanek: polywinylpyrolidon (PVP) 20,0 g; bufor fosforanowy-Tween (PBST) 1 l (patrz niżej). Dodać 500 ml PBST do 20 g PVP. Rozpuścić mechanicznie, szybko mieszając. Uzupełnić do 1 l, dokładnie mieszając. Bufor ten powinien być sporządzany na świeżo w miarę potrzeb.

Węglanowy bufor oplatczający

pH 9,6: Na₂CO₃ 1,59 g; NaHCO₃ 2,93 g; woda destylowana 1 l. Rozpuścić składniki i ustalić pH. Przechowywać w 5 °C.

10 × Bufor fosforanowy (PBS), 1 × = pH 7,2: NaCl 80 g; KH₂PO₄ 2 g; Na₂HPO₄·12H₂O 29 g; KCl 2 g; woda destylowana 1 l. Rozpuścić wszystkie składniki i ustalić pH. Używać po rozcieńczeniu do 1 ×.

Bufor fosforanowy-Tween (PBST)

10 × PBS 100 ml; 10% Tween-20 5 ml; woda destylowana 895 ml. Wymieszać składniki.

Bufor do przeciwciał (przygotować na świeżo)

PBST 100 ml; 5% mleko w proszku 5 g lub 0,2% albumina surowicy bydlęcej 0,2 g. Wymieszać składniki.

Roztwór substratu dla alkalicznej fosfatazy pH 9,8: dietanoloamina 97 ml; woda destylowana 800 ml. Wymieszać i doprowadzić do pH 9,8 używając stężonego HCl. Uzupełnić do 1 l wodą destylowaną. Dodać 0,203 g MgC₂ i przechowywać w 5 °C. Rozpuścić dwie 5 mg tabletki substratu fosfatazy (Sigma) na 15 ml roztworu substratu.

Przeciwciała

Odpowiednie przeciwciała (łącznie z przeciwciałem specyficznym względem gatunku, skoniugowanym z AP) do zastosowania w teście ELISA w celu wykrycia BNYVV to te, opisane przez Koenig i wsp. (1984), Grassi i wsp. (1988) oraz Torrance i wsp. (1988).

Zestawy do detekcji dostępne komercyjnie

- Bio-Rad, Phyto-Diagnostics, 3 bd. Raymond Poincaré, 92430 Marnes-la-Coquette (FR) [wcześniej Sanofi Cie (Libourne, FR)] . Tel. +33 (0)1 47 60 00, Fax +33 (0)1 47 41 91 33, www.bio-rad.com;

- Bioreba AG (Szwajcaria), Chr. Merian-Ring 7, CH 4153 Reinach BL1 (CH) www.bioreba.ch;

- Adgen Ltd, Nellies Gate, Auchincruive, Ayr KA6 5HW, Szkocja (GB). Tel. +44 (0)1292 525275, Fax +44 (0)1292 525477, www.adgen.co.uk;

Test ELISA – Triple Antibody Sandwich (TAS)

Test ten, przeprowadzany w oparciu o Henry i wsp. (1992), poddany był badaniom międzylaboratoryjnym. Podsumowanie analizy wyników badań diagnostycznych w kierunku BNYVV, uzyskanych w badaniach międzylaboratoryjnych, przedstawione jest poniżej:

TP (Prawdziwie pozytywne) 76	TN (Prawdziwie negatywne) 54
FP (Fałszywie pozytywne) 0	FN (Fałszywie negatywne) 2
Ogólna liczba próbek	132
Czułość = 0,97 (97%)	Specyficzność = 1,00 (100%)
Przewidywana wartość dodatnia = 1,00 (100%)	Przewidywana wartość ujemna = 0,96 (96%)
Dokładność = 0,98 (98%)	

Wniosek z badań międzylaboratoryjnych dotyczący testu ELISA: zalecany

Analiza danych została dokonana według metody stosowanej na Uniwersytecie Medycznym w Południowej Karolinie w następujący sposób:

Czułość = Prawdziwie pozytywne / (prawdziwie pozytywne + fałszywie negatywne)

Specyficzność = prawdziwie negatywne / (prawdziwie negatywne + fałszywie pozytywne)

Przewidywana wartość dodatnia = prawdziwie pozytywne / (prawdziwie pozytywne + fałszywie pozytywne)

Przewidywana wartość ujemna = prawdziwie negatywne / (prawdziwie negatywne + fałszywie negatywne)

Hit rate (dokładność) = (prawdziwie pozytywne + prawdziwie negatywne) / ogólna liczba próbek.

Zaleca się użycie płytek titracyjnych Nunc-Maxisorp lub innych, podobnej jakości. Inkubować negatywne kontrole buraka cukrowego, kontrolę buforu do homogenizacji oraz kontrolę pozytywną (którą może stanowić porażony materiał buraka cukrowego, albo porażone liście pochodzące z *Chenopodium quinoa*, które inokulowane były BNYVV). Dodać przeciwciało BNYVV w zalecanym rozcieńczeniu do buforu opłaszającego. Rozpipetować roztwór na płytki titracyjne, 100 µl do studzienki. Inkubować przez 3 h w 33 °C. Wytrzepać zawartość studzienek i wypłukać trzykrotnie buforem PBS-Tween, trzymając po 3 minuty w buforze pomiędzy płukaniem. Osuszyć na bibule.

Dodać homogenat próbki w ilości 100 µl do studzienki, wykorzystując dwie studzienki na próbkę testową. Inkubować w 4 °C przez noc. Usunąć zawartość studzienek jak poprzednio, ale płukać 4 razy. Dodać specyficzne względem BNYVV monoklonalne przeciwciała, odpowiednio rozcieńczone w buforze do przeciwciał, w ilości 100 µl na studzienkę. Inkubować przez 2 h w 33 °C. Usunąć zawartość studzienek i płukać 4 razy. Przygotować odpowiednie rozcieńczenie specyficznych względem gatunku przeciwciał skoniugowanych z alkaliczną fosfatazą, w buforze do przeciwciał. Nałożyć 100 µl do każdej studzienki. Inkubować przez 2 h w 33 °C. Usunąć zawartość studzienek i płukać 4 razy. Przygotować roztwór substratu dla alkalicznej fosfatazy. Nałożyć po 100 µl do każdej studzienki. Inkubować w temperaturze otoczenia przez 1 h. Odczytać absorbancję przy długości fali 405 nm.

Niektóre komercyjne zestawy do wykrywania BNYVV opierają się o test double antibody sandwich (DAS) ELISA. Mając do czynienia z tą metodą należy dodać koniugat zamiast monoklonalnego przeciwciała i pominąć następczy krok dodawania koniugatu.

Test ELISA jest negatywny jeśli absorbancja próbki jest mniejsza niż 3-krotność absorbancji kontroli negatywnej, lub pozytywna jeśli absorbancja ta jest równa bądź większa od 3-krotności tej wartości (Web Ryc. 7).

Protokół ten jest zalecany, ale może być on zmodyfikowany zgodnie z instrukcjami dostarczonymi z przeciwciałem, doświadczeniem laboratorium lub w wyniku określonych badań.

Załącznik 2. Test PCR

Materiały do testu PCR

Oligonukleotydowe sekwencje starterów:

Downstream primer:

(BNYVV 017 (R) 5'-ACT-CGG-CAT-ACT-ATT-CAC-T(T)-3'

Upstream primer:

(BNYVV 016 (F) 5'-CGA-TTG-GTA-TGA-GTG-ATT-T (A)-3'

Oczekiwana wielkość amplikonu 500 bp.

Startery do Nested PCR

Downstream primer:

(Rhzn 17 (R) 5'-GAC-GAA-AGA-GCA-GCC-ATA-GC)-3'

Upstream primer:
(Rhzn 15 (F) 5'-ATA-GAG-CTG-TTA-GAG-TCA-CC)-3'
Oczekiwana wielkość amplikonu 326 bp.

Metoda ekstrakcji RNA

RNA jest ekstrahowane z korzeni buraka cukrowego przy użyciu metody zaadaptowanej od Hughes & Galau (1988), z modyfikacjami zaczerpniętymi od Spiegel & Martin (1993).

Bufor ekstrakcyjny

Tris base-HCl 200 mM pH 8,5; 1,5% dodecylosiarczan litu; Tris 10 mM; NaCl 300 mM; 1% Dezoksyholan sodu. Zautoklawować (121°C w 1,2 bar przez 30 min) i przechowywać. Przygotować świeży bufor ekstrakcyjny w ilości odpowiedniej do ilości próbek przeznaczonych do ekstrakcji (3 ml na próbkę) dodając 1% Ipegal CA-630 (Sigma- Aldrich); DTT (DL-Ditiotreitol) 10 mM; tiomocznik (CH₄N₂S) 5 mM. Gotowy bufor zachowuje swą przydatność przez 2 tygodnie, przechowywany w temperaturze pokojowej.

Octan potasu

Octan potasu 6 M; woda o czystości do biologii molekularnej. Doprowadzić pH do 6,5 używając kwasu octowego i uzupełnić do 1 l. Zautoklawować przed użyciem.

Chlorek litu

LiCl 4 M; woda o czystości do biologii molekularnej. Uzupełnić do 1 l.

Bufor TE:

Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; woda o czystości do biologii molekularnej. Doprowadzić pH do 8,0 i uzupełnić do 1 l.

Chlorek sodu

NaCl 5 M; woda o czystości do biologii molekularnej. Uzupełnić do 1 l. Zautoklawować przed użyciem.

Bromek etydyny

TBE 600 ml; bromek etydyny 60 µl (0,5 µg/ml). Przechowywać w zamykanym, plastikowym pudełku, aby zapobiec fotodegradacji.

1× Tris borate EDTA buffer (do elektroforezy w żelu)

Tris BASE 107,8 g; EDTA 7,4 g; H₃BO₃ 55,0 g; uzupełnić wodą dejonizowaną do 10 l. Doprowadzić do pH 8,2.

Wolna od RNaz woda DEPC

Dodać 0,05% estru dietylowego kwasu pirowęglowego (DEPC- diethyl pyrocarbonate) do wody, która wymaga takiego traktowania. Rozlać do małych butelek, lub w miarę potrzeb (pokryć wszystkie wewnętrzne powierzchnie). Wieczka butelek zostawić luźne. Zostawić na noc pod wyciągiem. Autoklawować w 121°C przy ciśnieniu 1,2 bar przez 30 min. Tak przygotowana woda nie może być użyta do sporządzania buforów Tris.

6 × bufor obciążający (do elektroforezy w żelu)
0,25% błękit bromofenolowy (bromophenol blue); 0,25% ksylenocjanol FF; 30% glicerol w wodzie. Przechowywać w 4°C.

Badanie PCR

Badanie to, oparte na Morris i wsp. (2001), poddane zostało badaniom międzylaboratoryjnym. Podsumowanie analizy wyników badań diagnostycznych w kierunku BNYVV, uzyskanych w badaniach międzylaboratoryjnych, przedstawione jest poniżej:

One-step RT-PCR

TP (prawdziwie pozytywne) 82	TN (prawdziwie negatywne) 31
FP (fałszywie pozytywne) 2	FN (fałszywie negatywne) 10
Ogólna liczba próbek	125
Czułość = 0,89 (89%)	Specyficzność = 0,93 (93%)
Przewidywana wartość dodatnia	Przewidywana wartość ujemna
= 0,97 (97%)	= 0,75 (75%)
Dokładność = 0,90 (90%)	

Wniosek z badań międzylaboratoryjnych dotyczący protokołów PCR: konwencjonalny PCR sprawdza się dobrze jako badanie potwierdzające (o ile istnieje taka konieczność). Jeśli zaistnieje potrzeba mogą być stosowane inne metody ekstrakcji RNA.

Nested One-step RT-PCR

TP (prawdziwie pozytywne) 44	TN (prawdziwie negatywne) 12
FP (fałszywie pozytywne) 23	FN (fałszywie negatywne) 2
Ogólna liczba próbek	81
Czułość = 0,91 (91%)	Specyficzność = 0,34 (34%)
Przewidywana wartość dodatnia	Przewidywana wartość ujemna
= 0,65 (65%)	= 0,85 (85%)
Dokładność = 0,69 (69%)	

Wniosek z badań międzylaboratoryjnych dotyczący Nested PCR: jako rutynowa metoda diagnostyczna wymaga szczególnej ostrożności, ponieważ wyniki są wiarygodne jedynie z prawidłowo działającymi wszystkimi kontrolami.

Analiza wyników uzyskanych w badaniach międzylaboratoryjnych sporządzona została w oparciu o metodę stosowaną na Uniwersytecie Medycznym w Południowej Karolinie (patrz Załącznik 1).

Podczas wszystkich etapów obróbki próby oraz innych czynności związanych z PCR, należy używać rękawiczki jednorazowe, sterylne końcówki zaopatrzone w filtr, próbówki typu Eppendorf, itp..

Ekstrakcja kwasu nukleinowego (Hughes & Galau, 1988)

Odważyć 200 mg świeżej lub mrożonej tkanki korzenia (albo 100 mg wysuszonej próbki). Umieścić w odpowiednio opisanych, małych, mocnych, polietylenowych torebkach (typu Stomacher) i zanurzyć w termosie z ciekłym azotem. Dodać 0,5 –1 ml buforu do ekstrakcji RNA z dodatkiem DTT oraz dodanym na świeżo tiomocznikiem. Homogenizować. Zlać 600 µl homogenatu do opisanych 1,5 ml probówek. Do każdej probówki dodać jednakową objętość 6 M octanu potasu (potassium acetate) i inkubować w lodzie przez 15 min. Wirować próbówki w wirówce w 12 000 × g przez 10 min. Przenieść 600 µl supernatantu do nowych, opisanych probówek wirówkowych. Dodać jednakową objętość 4 M LiCl. Inkubować próbki w 4 °C przez noc. Wirować próbki w 12 000 × g, w 4 °C przez 30 min. Zawiesić osad w 200 µl buforu TE z dodatkiem 1% SDS. Dodać 100 µl 5M NaCl i 300 µl zmrożonego izopropanolu, zworteksować i inkubować próbki w –20°C przez 30 min. Próbki wirować w 12 000 × g, w 4 °C przez 10 min. Zlać supernatant i przemyć osad 500 µl 70 % etanolu. Wirować w 13 000 obr. min⁻¹ w 4 °C przez 5 min. Ostrożnie zlać etanol i suszyć osad w wirówce z suszeniem próżniowym przez około 15 min. Zawiesić osad w 50 µl wody wolnej od RNaz. Użyć do reakcji PCR lub zamrozić w –20°C i przechowywać do momentu kiedy zajdzie potrzeba użycia.

One-step RT-PCR

Rozmrożone ekstrakty, odczynniki i bufony przed użyciem przechowywać w lodzie. Dla każdej próbki: napipetować 1 µl próbki RNA do opisanej 0,5 ml probówki typu Eppendorf. W badaniu zawrzeć kontrolę pozytywną i negatywną oraz wolną od RNaz kontrolę wodną.

W 1,5 ml probówce typu Eppendorf sporządzić RT master mix o następującym składzie (podana ilości na próbkę, jednak dodaje się 2 dodatkowe objętości z uwagi na błędy pipetowania): 10 × bufor PCR 5 µl (Promega), 100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 9,0; dNTPs (10 mM) 1 µl; starter „forward” 016F (5 µM) 2 µl; starter „reverse” 017R (5 µM) 2 µl; MgCl₂ (25 mM) 3 µl; woda DEPC (wolna od RNaz) 35,45 µl; MMLV 0,05 µl (10 jednostek, Promega, Southampton, GB); polimeraza Taq (dodawac jako ostatnią) 0,5 µl (2,5 jednostki, Promega). Do każdego Eppendorfa zawierającego już 1 µl RNA z próbki dodać 49 µl sporządzonego w powyższy sposób mixu.

Uruchomić następujący program w termocyklerze: 30 min w 37 °C, 2 min w 94 °C; następnie 30 cykli po 1 min w 94 °C, 1 min w 55 °C i 1 min w 72 °C. Finalnie 3 min w 72 °C. Analizować rozciągając próbki na żelu lub przechowywać próbówki w 5 °C (krótkoterminowo) lub w –20°C aż do czasu przeprowadzenia analizy. Kiedy konwencjonalny PCR zakończy się, użyć 0,5 µl produktu PCR jako matrycy do nested PCR, jak opisano poniżej, lub rozciągnąć

produkty na żelu.

Nested PCR

Jeżeli istnieje potrzeba startery do nested PCR używane są w dodatkowej amplifikacji. Metoda ta jest 1000 razy bardziej czuła aniżeli konwencjonalny PCR. Zaleca się zachowanie szczególnej ostrożności aby zapobiec kontaminacji produktu. Jako dodatkowej kontroli na etapie nested PCR należy użyć dodatkowej probówki typu Eppendorf zawierającej 0,5 µl wody DEPC, która nie była używana w początkowej reakcji PCR.

Master mix (na próbkę)

10 × bufor PCR (Promega, 100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 9,0) 5 µl; dNTPs (10 mM) 1 µl; Starter rhzn15 (5 µM) 2 µl; Starter rhzn17 (5 µM) 2 µl; MgCl₂ (25 mM) 3 µl; polimeraza Taq (Promega 2,5 jednostki) 0,5 µl; woda DEPC (wolna od RNaz) 36 µl; produkt amplifikacji konwencjonalnego BNYVV PCR 0,5 µl. Do każdej probówki zawierającej 0,5 µl produktu PCR dodać 49,5 µl master mixu.

Uruchomić następujący program w termocyklerze: 94 °C przez 2 min; 30 cykli 94 °C przez 1 min, 58 °C przez 1 min i 72 °C przez 1 min; ostatecznie, 72 °C przez 3 min. Dokonać analizy produktów PCR lub przechować probówki w -20°C do czasu dokonania analizy.

RT-PCR dla RNA 5 (P-typ) (Harju i wsp., 2005)

(Nie poddany badaniom międzylaboratoryjnym) Specyficzne testy do wykrywania RNA 5 BNYVV zostały zawarte w tym protokole (przyp. tłumacza)

Specyficzność

Produkty PCR uzyskane z zastosowaniem zestawu starterów specyficznych względem RNA-5 mierzące 530 izolat francuski (Pithiviers) (izolaty angielski i japoński) oraz 527 (izolat chiński) par zasad (bp) uzyskano z próbek buraka zawierających RNA 5. Ekstrakty RNA pozyskane z buraków zainfekowanych izolatami A lub B BNYVV oraz buraki niezainfekowane, nie tworzyły produktów PCR.

Czułość

Badanie w kierunku BNYVV RNA 5 umożliwia wykrycie do rozcieńczenia 1 : 10.

Materiały do RT-PCR dla RNA 5 (P-type)

Oligonukleotydowa sekwencja startera

starter komplementarny do nici wstępującej:

BNYVV 5F1 starter "forward" GATATGGCATATAGCGACG.

Oligonukleotydowa sekwencja startera

starter komplementarny do nici zstępującej:

BNYVV 5R1 starter "reverse" GGTCGTTGCCAAAATCTC.

Oczekiwana wielkość amplikonu 530 (bp) (izolaty francuski (Pithiviers), angielski i japoński), 527 (bp) (izolat chiński).

(Projekt starterów oparto na sekwencji BNYVV RNA 5 (Koenig *i wsp.*, 1997)).

Odwrotna transkrypcja próbki RNA wykonywana jest zasadniczo według instrukcji producenta, z użyciem 1 µl matrycy RNA, 1 µl (10 pmol) BNYVV 5RI i 100 jednostkami M-MLV odwrotnej transkryptazy (Promega, Southampton, UK lub podobnej), w końcowej objętości 10 µl. Inkubować próbkę(ki) w bloku grzejnym lub łaźni wodnej przez 1 h w 37°C.

W celu przeprowadzenia reakcji PCR do 10 µl cDNA powstałego w poprzedniej reakcji dodać następujące składniki; 10 pmols startera BNYVV 5F1, 1,5 mM MgCl₂, 1 × bufor reakcyjny Taq (Promega; 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 9,0), 0,2 mM dNTPs (Promega) i 2,5 jednostki Taq DNA polimerazy (Promega), uzupełnić do końcowej objętości reakcji 50 µl, sterylną, wolną od RNaz wodą. Podgrzewanie prowadzone jest w następujących warunkach: 94 °C przez 1 min, następnie 30 cykli 94 °C przez 1 min, 60 °C przez 1 min i 72 °C przez 1 min, a następnie 72 °C przez 3 min. Produkty reakcji PCR (10 µl na studzienkę) poddawane są elektroforezie w żelu i analizowane (patrz Analiza produktu PCR).

Analiza produktu PCR

Produkty reakcji PCR wykrywane są poprzez elektroforezę w żelu agarozowym i barwienie bromkiem etydyny. Przygotować 1,2% żel agarozowy, delikatnie doprowadzając do wrzenia (czystość molekularna, ogólnego przeznaczenia) agarozę w buforze Tris borate EDTA. Schłodzić rozpuszczoną agarozę do 50–60°C, wylać na saneczki żel i umieścić w nim grzebień. Pozwolić, by żel zastygł. Usunąć grzebień, zanurzyć żel w buforze Tris borate EDTA tak, by był on przykryty 2–3 mm cieczy.

Na parafilm lub do nowych probówek typu Eppendorf, nałożyć 2 µl 6 × buforu obciążającego i wymieszać z 10 µl produktu PCR. Nałożyć 10 µl mieszaniny bufor obciążający/produkt PCR ostrożnie do studzienek. Do badania załączyć odpowiedni marker(y) 1 Kb, nakładany w ilości 5 µl na studzienkę lub drabinkę 100 par zasad, a także zamplifikowane, kontrolne DNA.

Rozciągać żel w 100 V przez 1–1,5 h (czoło barwnika obciążającego na około 15 cm). Wyjąć żel i moczyć go w roztworze bromku etydyny (0,5 µg/ml) przez 30 – 45 min. Odbarwiać przepłukując w wodzie destylowanej. Zwizualizować zamplifikowane produkty DNA w UV transiluminatorze. Produkt PCR BNYVV uzyskany z pary starterów komplementarnych do

nukleotydów 1301–1320 oraz 1781–1800 RNA 2 ma wielkość 500 bp. Produkt nested PCR jest wielkości 326 bp. Sprawdzić względem markera wielkości DNA oraz względem kontroli pozytywnej. W każdym przypadku kontrola wodna powinna być negatywna. Jeśli dojdzie do kontaminacji, badanie należy powtórzyć. Wykonać fotografię żelu, by zapewnić trwałą zapis.

Badanie PCR jest negatywne jeśli nie wykrywamy określonego fragmentu 500 bp (PCR) (lub 326 bp dla nested PCR), a wykrywamy fragment dla kontroli pozytywnej izolatu BNYVV, oraz pozytywne jeśli wykrywany jest fragment 500 bp (PCR) (lub 326 bp dla nested PCR) i jest on identycznej wielkości z fragmentem dla kontroli pozytywnej izolatu BNYVV. Badanie PCR dla RNA 5 jest negatywne jeśli określony fragment 527 lub 530 bp (PCR) nie jest wykrywany, a wykrywany jest fragment dla kontroli pozytywnej izolatu BNYVV RNA 5 i pozytywne jeśli fragment o długości 527 lub 530 bp (PCR) jest wykrywany i jest on identycznych rozmiarów co fragment kontroli pozytywnej izolatu BNYVV RNA 5.

Załącznik 3. One-step Immunocapture RT-PCR

Materiały do Immunocapture PCR

Dla uzyskania informacji odnośnie buforu do maceracji tkanek w teście ELISA oraz odnośnie PBST, patrz Załącznik 1. Dla starterów PCR itp., patrz Załącznik 2. Opisany poniżej one-step Immunocapture RT-PCR uznany został za nieco mniej czuły aniżeli RT-PCR (Morris i wsp., 2001), do którego używa się oczyszczone RNA i wykrywa wirusa z soku pozyskanego z zainfekowanych buraków cukrowych oraz z *C. quinoa* z rozcieńczeń do 1×10^{-2} i 1×10^{-3} , odpowiednio.

Wnioski z badań międzylaboratoryjnych dotyczące Immunocapture PCR: Z powodu faktu, że jedynie kilku uczestników wyraziło chęć do przetestowania metody, nie można było wyciągnąć ostatecznych wniosków, jednak wydaje się, że w rękach doświadczonego operatora metoda działa dobrze.

Opłaszczyc 500- μ l próbki wirówkowe przeciwciałami poliklonalnymi anti-BNYVV (np. Adgen) 3 h w 33 °C. Wypłukać próbki trzykrotnie buforem PBST (Załącznik 1). Rozetrzeć próbkę korzeni w buforze ekstrakcyjnym do testu ELISA w stosunku w/v 1 : 9 (jak w teście ELISA, Załącznik 1). Dodać 100 μ l zhomogenizowanej tkanki korzeni do opłaszczonych próbek wirówkowych i inkubować przez noc w 4 °C. Wypłukać trzy razy buforem PBST i dwukrotnie sterylną wodą destylowaną.

Do każdej wypłukanej z pozostałości próbki próbki dodać 50 μ l RT Master mix o następującym składzie: starter „forward” (016F, 5 μ M) 2 μ l; starter „reverse” (017R, 5 μ M) 2 μ l; 10 \times bufor reakcyjny Taq (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 9,0) 5 μ l; MgCl₂ (25 mM) 3 μ l; dNTPs (10 mM) 1 μ l; odwrotna transkryptaza MMLV (Promega, Southampton, GB) 10 jednostek 0,05 μ l; inhibitor RNaz (Promega, Southampton, GB) 20 jednostek 0,5 μ l; Taq DNA polimeraza (Promega, Southampton, GB) 2,5 jednostki 0,5 μ l; woda o czystości do biologii molekularnej/wodaDEPC 35,95 μ l.

Umieścić próbki w termocyklerze załączając następujący program: 30 min w 37 °C, 2

min w 94 °C, następnie 30 cykli 1 min w 94 °C, 1 min w 55 °C i 1 min w 72 °C, a następnie 3 min w 72 °C. Poddać produkt PCR analizie (patrz poprzednia sekcja) lub przechowywać próbki w -20°C do czasu przeprowadzenia analizy.

Załącznik 4. Badanie TaqMan® PCR (nie poddane badaniom międzylaboratoryjnym)

Wzrost czułości, oszczędność czasu i pracy spowodowane uniknięciem potrzeby przeprowadzania post-PCR elektroforezy w żelu, to niektóre z głównych korzyści PCR w czasie rzeczywistym w stosunku do konwencjonalnego PCR, jednak urządzenia i materiały eksploatacyjne są stosunkowo drogie.

Specyficzność

12 izolatów BNYVV pochodzących z różnych zakątków świata przebadano używając tych badań. Były to trzy izolaty, o których wiadomo było, że zawierają RNA 5, jeden izolat z Pithiviers, Francja (P) i dwa dalekowschodnie izolaty, z Chin oraz z Japonii, oraz dziewięć europejskich izolatów, które zostały zakwalifikowane jako typy A oraz B.

W badaniu w kierunku RNA 5, tylko trzy izolaty, o których wiadomo, że zawierają RNA 5 (Pithiviers, Francja (P), japoński oraz chiński) dały wynik pozytywny, podczas gdy pozostałe izolaty A lub B wszystkie dały wynik negatywny. Odmienne, stosując badanie specyficzne w kierunku RNA 2 wszystkie 12 izolatów dało wynik pozytywny. Ekstrakty RNA uzyskane z niezainfekowanych buraków cukrowych dały wynik negatywny przy użyciu obu analiz.

Wyniki były walidowane z zastosowaniem próbek pochodzących z pól UK przez okres trzech sezonów wzrostu. Do badania użyto specyficznych starterów RNA 2 opisanych przez Morris i wsp. (2001). Dla wszystkich 12 izolatów uzyskano produkty o prawidłowej, przewidywanej wielkości, zarówno z użyciem starterów standardowych (500 bp) jak i pary starterów nested (326 bp).

Czułość

Przygotowano serie rozcieńczeń porażonej próbki w niezainfekowanym buraku roztartym w buforze CTAB RNA. Czułości zarówno real-time (TaqMan® RNA 2 oraz RNA 5) jak i konwencjonalnego badania RNA 5 RT-PCR zostały bezpośrednio porównane. Wyniki wykazały, że obydwa warianty TaqMan® były 10 000 razy bardziej czułe aniżeli konwencjonalne badanie PCR, wykrywając w dół do rozcieńczenia 1 : 100 000, w przeciwieństwie do konwencjonalnego testu PCR BNYVV RNA 5, który wykrywał jedynie do rozcieńczenia 1 : 10.

Uwalnianie wirusa po teście ELISA (ang. post-ELISA virus release (VR)) - ekstrakcja do TaqMan®. RT-PCR

Czułość

Oprócz metody CTAB, sprawdzono również nieco szybszą metodę, opartą na uwolnieniu wirusa po teście ELISA (VR z ang. virus release- przypis tłum.) (Harness i wsp., 2003). Uzyskane wyniki wskazują na to, że metoda umożliwia wiarygodną detekcję o ile stosowanym badaniem jest BNYVV TaqMan® RT-PCR, dający typowy zakres pozytywnych wartości CT, pomiędzy 19 a 31 dla RNA 2. Oferuje to niezawodny sposób zarówno na potwierdzenie jak i typowania próbek pozytywnych w teście ELISA, bez potrzeby ponownego pobierania i przeprowadzania złożonych procedur ekstrakcji RNA. Ogólnie rzecz biorąc, podczas gdy wyniki wskazują, że doszło do redukcji czułości używając VR jako alternatywy w stosunku do tradycyjnej metody ekstrakcji całkowitego RNA, wskazują one również, że detekcja VR TaqMan® jest przynajmniej tak czuła, jak czuła jest detekcja samej ELISY. Całkowite oszczędności czasu i pracy oferowane przez VR TaqMan® czynią go wyjątkowo atrakcyjną opcją, gdy mamy do czynienia z dużą ilością próbek. Bezpośrednie porównanie czułości samego testu ELISA z czułością wykrywania z zastosowaniem VR TaqMan®, do którego dochodzi po teście ELISA wskazują, że zarówno za pomocą testu ELISA jak i VR TaqMan® (stosując analizę w kierunku BNYVV RNA 2), możliwa jest detekcja do tego samego rozcieńczenia, w dół do 1 : 100.

Materiały do badania TaqMan® PCR

Sekwencja starterów

Sekwencje starterów i sond specyficznych względem BNYV używanych w TaqMan® dla RNA 2 i RNA 5 (typ P).

TaqMan® RNA 2

Sekwencja (5'-3')

BNYVV-CP 26F (starter "forward") CATGGAAGGATATGTCTCATAATAGGTT

BNYVV-CP 96R (starter "reverse") AACACTCACGACGTCGAAAC

BNYVV-CP 56T (Sonda, znakowana FAM) TGACCGATCGATGGGCCCCG

TaqMan® RNA 5 (typ P)

BNYVV-R5 96F (starter "forward") CAATTTGAAAACGAGTGTAAGTAAAAGG

BNYVV-R5203R (starter "reverse") CTG CTT CTG AGT GAC ACC AAG TG

BNYVV-R5123T(Sonda, znakowana VIC)

AGGTTACTAAACAAAATAGCCCTCCATACGGTACGA

Bufor CTAB stock

Stock buforu może być autoklawowany i przechowywany w temperaturze pokojowej przez co najmniej 1 rok: 2% cetyl tetra ammonium bromide (CTAB), 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM EDTA; 1,4 M chlorek sodu.

Bufor CTAB do maceracji tkanek

1,0% Siarczyn sodu, 2,0% rozpuszczalny poliwinylpirolidon-40, należy dodać na świeżo do buforu CTAB stock (zawierającego pierwsze cztery składniki) przed ekstrakcją. Bufor może być przechowywany przez co najmniej 2 tygodnie w temperaturze pokojowej.

Chloroform:alkohol izoamylowy

(24 : 1 v/v): Zmieszać 96 ml chloroformu z 4 ml alkoholu izoamylowego.

4 M chlorek litu:

Odważyć 169,56 g LiCl. Uzupełnić do 1 l.

5 M NaCl:

Odważyć 292,2 g NaCl. Uzupełnić do 1 l.

Izopropanol:

Przechowywać zmrożony w -20°C .

Bufor TE-SDS:

10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; 1% (w/v) dodecylosiarczan sodu. Uzupełnić do 1 l.

Bufor uwalniający wirusa po teście ELISA (ang. post-ELISA virus release (VR) buffer):

10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1,0% (v/v) Triton X-100. Uzupełnić do 1 l.

Bufor PBST:

Bufor fosforanowy z dodatkiem 0,05% Tween 20 (v/v) (PBST).

Badanie TaqMan® PCR

Podczas wszystkich etapów obróbki próby oraz innych czynności, związanych z TaqMan® PCR należy używać rękawiczki jednorazowe, sterylne końcówki zaopatrzone w filtr, probówki typu Eppendorf, itp..

Ekstrakcja całkowitego RNA z zastosowaniem CTAB

Zmodyfikowane od Chang i wsp. (1993).

Rozetrzeć 100 – 200 mg tkanki korzeni na gładką pastę w 10×15 cm, 500 gauge polietylenowej torebce ok.125 mikrometrów grubości przyp. tłum.), z dodatkiem 1 – 2 ml buforu CTAB do maceracji tkanek (grinding buffer). Wcześniej zamrozić tkanki (w -80°C lub w ciekłym N_2 , może to pomóc zmacerować niektóre tkanki). Przenieść uzyskany sok do 1,5 ml probówki wirówkowej i inkubować w 65°C przez 10–15 min. Po zakończeniu inkubacji,

wirować próbki w wirówce w 12 500 g, przez 5 min, w temperaturze pokojowej. Usunąć 700 µl sklarowanego soku, przenieść go do świeżej próbki wirówkowej i dodać taką samą objętość mieszaniny chloroform: izoamyl alkohol (24 : 1 v/v) i wymieszać do uzyskania emulsji poprzez odwracanie próbki. Wirować w 12 500 g przez 10 min w temperaturze pokojowej. Ostrożnie usunąć górną (wodną) warstwę i przenieść ją do świeżej próbki. Dodać taką samą objętość mieszaniny chloroform: izoamyl alkohol (24 : 1 v/v), wymieszać i zwirować jak we wcześniejszym kroku. Odpipetować wodną warstwę uważając by nie poruszyć interfazy. Wytrącić RNA dodając taką samą objętość 4 M chlorku litu (LiCl), dobrze wymieszać i inkubować próbkę/ki przez noc w 4 °C. Strącić RNA wirując 25 min w 12 500 g, w 4 °C. Zawiesić powstały osad w 200 µl buforu TE-SDS. Strącić RNA dodając 100 µl 5 M NaCl i 300 µl lodowego izopropanolu, dobrze wymieszać, a następnie inkubować próbkę(ki) w -20°C przez 20–30 min. Wirować próbki przez 10 min w 12 500 g. Zlać sól/izopropanol i przemyć powstały osad przez dodanie 400 µl 70% etanolu. Wirować próbkę przez 4 min w 12 500 g. Zlać całość etanolu i pozostawić próbkę otwartą na powietrzu aż całkowicie wyschnie (co najmniej 45 min). Ponownie zawiesić wysuszony osad w 100 µl wody wolnej od RNaz.

Uwalnianie wirusa po teście ELISA (ang. post-ELISA virus release (VR)) do badania TaqMan®. RT-PCR

Po teście ELISA uwięziony wirus może być uwolniony poprzez zastosowanie metody Harnessa i wsp. (2003).

Przemyć pozytywne lub potencjalnie pozytywne po teście ELISA studzienki płytki buforem fosforanowym, z dodatkiem 0,005% Tween (PBST) i osuszyć na chłonnym papierze. Wypełnić te studzienki 50 µl buforu uwalniającego wirusa (VRB ang. virus release buffer). Owinąć folią spożywczą lub czymś podobnym, by zapobiec parowaniu i umieścić na wytrząsarce na 5 min w 65 °C. Po inkubacji, zlać ekstrakty do oznakowanych próbek typu Eppendorf i przechowywać w 5°C. Badać tego samego dnia lub zamrozić w -80°C, by przechować do czasu rozpoczęcia badania. Do badania TaqMan® używać 5 µl ekstraktu.

Badanie TaqMan® RT-PCR

W pojedynczych próbkach przygotować reakcje TaqMan® RT-PCR (25 µl) w 96-dołkowej lub 384-dołkowej płytce reakcyjnej używając TaqMan® core reagent kit (Applied Biosystems). Sporządzić startery do końcowego stężenia 200 µM. Dodać dodatkowe 10 jednostek enzymu M- MuLV odwrotnej transkryptazy (Promega, Southampton, UK lub podobnej) i 1 µl RNA z próbki na reakcję. Real time PCR można przeprowadzić z użyciem ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) lub podobnego, stosując ogólne warunki powielania (Mumford i wsp., 2000). Cykl progowy (ang. threshold cycle) (CT) to cykl, w którym ma miejsce znaczący wzrost fluorescencji, stąd wartość CT poniżej, oznacza wynik pozytywny, a wartość CT powyżej 40 oznacza wynik negatywny. (Typowe wartości CT uzyskiwane z buraków zainfekowanych BNYVV zawierają się pomiędzy CT 16 a CT 31).

Załącznik 5. Badania z zastosowaniem mikroskopii elektronowej (nie poddane badaniom międzylaboratoryjnym)

Materiały do badań w mikroskopie elektronowym

2% octan uranylu (U/A) stain

Octan uranylu 2 g; woda destylowana do 100 ml. Rozpuścić i przechowywać w 4 °C w butelce z brązowego szkła, zaopatrzonej w zakraplacz.

Bufor fosforanowy pH 6,5 (Sorensona)(SPB)

Zmieszać 3 ml Na₂HPO₄ (9,469 g/l) i 7 ml KH₂PO₄ (9,079 g/l). PBS – patrz Załącznik 1.

Transmisyjna Mikroskopia Elektronowa (TEM)

Opłukać korzenie pozbawione gleby i osuszyć na chłonnym papierze. Rozetrzeć 1 g korzeni używając moździerza oraz tłuczka w około 1 ml buforu SPB pH 6,5 (wybierać korzenie boczne lub cienkie zrębki korzeni bocznych). Pobrać płyn pipetą i umieścić dwie 20- μ l krople w szalce Petriego wyściełanej parafilmem. Umieścić dwie pokryte węglem siatki TEM, po jednej na każdej kropli, powleczoną stroną w dół, używając do tego celu delikatnej pęsety. Inkubować przez 10 minut w szalce Petriego, pod przykryciem. Usunąć pęsetą siatki i wypłukać z nich nadmiar soku roślinnego 20 kroplami wody destylowanej, używając pipety Pasteura. Wybarwić próbkę 3 kroplami 2% U/A korzystając z butelki z zakraplaczem. Ostrożnie osuszyć siatki przykładając ich krawędzie do bibuły filtracyjnej i tak przygotowane przechowywać. Badać TEM przy powiększeniu $\times 46\ 000$ w poszukiwaniu cząstek o następującej morfologii: wiriony o pałeczkowatym kształcie, zazwyczaj proste, pozbawione otoczki (Web Ryc. 9); cztery wyraźne modalne długości (70, 100, 265, 390 nm), szerokości 20 nm; kanał osiowy niewyraźny, widoczny skok helisy 2,6 nm.

Mikroskopia Immunoelektronowa (IEM)

Przygotować i rozetrzeć korzenie jak wyżej. Zlać homogenat do próbki typu Eppendorf i wirować w 1000 g przez 1 minutę. By uwięzić cząsteczki wirusa, inkubować pokryte węglem siatki TEM na dwóch 20 μ l kroplach przeciwciał monoklonalnych BNYVV firmy Adgen lub podobnych, rozcieńczonych 500-krotnie w SPB pH 6,5 przez 15 min, w temperaturze pokojowej. Wypłukać siatki 20 kroplami SPB pH 6,5 przy użyciu pipety Pasteura celem usunięcia nadmiaru przeciwciał i ostrożnie osuszyć na bibule filtracyjnej. Inkubować siatki przez 1 h na dwóch 20 μ l kroplach homogenatu próbki. Wypłukać siatki 20 kroplami SPB pH 6,5 i wysuszyć jak poprzednio. W celu wyznakowania cząsteczek wirusa, umieścić siatki na 20 μ l kroplach przeciwciał poliklonalnych firmy Adgen (Adgen polyclonal coat) lub podobnych 1/50–1/100 (w celu ujawnienia) przez 15 min. Wypłukać siatki 20 kroplami wody destylowanej i wysuszyć jak uprzednio. Wybarwić siatki 3 kroplami 2% U/A, osuszyć jak wcześniej i tak

przygotowane przechowywać. Badać w TEM, przy powiększeniu $\times 46\ 000$ w poszukiwaniu wyznakowanych cząsteczek.

Znakowanie z zastosowaniem koloidalnych cząsteczek złota sprzężonych z białkiem-A (Protein-A Immunogold with trapping)

Rozcieńczyć specyficzne przeciwciało 1 : 500 w SPB pH 6,5. Umieścić powleczone węglem siatkę EM na powierzchni płynu, stroną węglową w dół. Inkubować w temperaturze pokojowej przez 10 min. Wypłukać 20 kroplami buforu PBS i osuszyć na bibule filtracyjnej. Rozetrzeć tkankę korzenia i rozcieńczyć 1 : 10 w SPB pH 6,5. Umieścić 20 μ l roztworu zawierającego rozartą tkankę korzenia na parafilmie. Umieścić siatkę na powierzchni płynu, stroną węglową skierowaną ku dołowi. Inkubować w temperaturze pokojowej przez 10 min i osuszyć. Rozcieńczyć antyserum, np. Adgen detection antibody (MAFF 9) lub równoważne w SPB pH 6,5 1 : 500. Inkubować siatkę na 20 μ l kropli, w temperaturze pokojowej przez 10 min i osuszyć. Wypłukać siatkę 20 kroplami buforu PBS i umieścić na 20 μ l kropli Protein A gold (20 nM) (British Biocell International) (przyp. tłum. jest to białko A z koloidalnym złotem) lub podobnym, rozcieńczonym w stosunku 1 : 50 w SPB pH 6,5. Inkubować w temperaturze pokojowej przez 10 min i odsączyć. Wypłukać 10 kroplami buforu PBS, 5 kroplami wody destylowanej i wybarwić 3 kroplami 2% U/A, osuszyć. Badać w TEM przy powiększeniu $\times 46\ 000$ (Web Ryc. 10).

Załącznik 6. Testy płytkowe

Zestawy Pocket Diagnostics do wykrywania rizomanii testami płytkowymi (produkowanymi oraz rozprowadzonymi w Central Science Laboratory, York, GB) zostały poddane sprawdzeniu w badaniach międzylaboratoryjnych. Podsumowanie analizy wyników badań diagnostycznych w kierunku BNYVV, uzyskanych w badaniach międzylaboratoryjnych przedstawione jest poniżej.

TP (prawdziwie pozytywne) 35	TN (prawdziwie negatywne) 37
FP (fałszywie pozytywne) 0	FN (fałszywie negatywne) 3
Ogólna liczba próbek	75
Czułość = 0,92 (92%)	Specyficzność = 1,0. (100%)
Przewidywana wartość dodatnia	Przewidywana wartość ujemna
= 1,0 (100%)	= 0,92 (92%)
Dokładność = 0,96 (96%)	

Wnioski z badań międzylaboratoryjnych dla zestawów polowych testów płytkowych: działają dobrze (w celu potwierdzenia wyniku użyć innego badania laboratoryjnego).

Analiza wyników uzyskanych w badaniach międzylaboratoryjnych sporządzona została w oparciu o metodę stosowaną na Uniwersytecie Medycznym w Południowej Karolinie (patrz Załącznik 1).

Przed użyciem zapoznać się z instrukcją. Jeśli buraki wykazują symptomy rizomanii, pobrać korzeń palowy oraz drobne włosowate korzenie, strząsnąć nadmiar ziemi, podzielić na małe kawałki i dodać do butelki (butelka dostarczona wraz z zestawem zawiera bufor oraz azydek

sodu). Zamknąć dobrze butelkę, upewniając się, że jest ona zaopatrzona w zakraplacz. Wstrząsać przez 30 s. Brązowy ekstrakt powinien stać się widoczny.

Wyjąć kasetkę z jej foliowego opakowania, unikając dotykania okienka. Usunąć nakrętkę z butelki i odwracając oraz delikatnie ściskając butelkę usunąć 2–3 krople. Trzymać urządzenie w pozycji poziomej i delikatnie wycisnąć 2 krople na studzienkę kasetki przeznaczoną na naniesienie próbki. Trzymać test w pozycji poziomej, aż do czasu wchłonięcia się ekstraktu (około 30 s) i pojawienia się niebieskiego barwnika w okienku testu. Linia kontrolna powinna stać się wyraźnie widoczna w okienku po upływie 3 min, a wynik testu (oznaczenie T na kasetce) widoczny będzie w przeciągu 1–3 min. Dwie niebieskie kreski (C & T) wskazują na pozytywny wynik, test przeprowadzony prawidłowo (Web Ryc. 8b). Jedna niebieska (tylko C) wskazuje na wynik negatywny, test przeprowadzony prawidłowo (Web Ryc. 8a). Słaba niebieska kreska T, mocna kreska C wskazuje na pozytywny, prawidłowo przeprowadzony test. Słaba kreska lub jej brak może wskazywać na niską koncentrację patogenu, nierównomierną dystrybucję w obrębie rośliny lub świeżą infekcję. Test ten powinien być przede wszystkim wykorzystywany do celów badań przesiewowych. Jakkolwiek próbka dająca pozytywny wynik powinna zostać przesłana do laboratorium celem potwierdzenia wyniku.

Załącznik 7. Test pułpkowy

Test angielski

Badanie to, które nie było poddane badaniom międzylaboratoryjnym, oparte jest na zmodyfikowanej wersji Tuitert (1990) oraz D. Wright (pers. comm., 1998). 500 g zainfekowanej rizomą gleby, pobranej z górnych 15 cm pola należy wysuszyć na powietrzu, dokładnie wymieszać w nadmuchanej, plastikowej torebce (rozdrobnić, jeśli potrzeba użyć młotka) i przesiać przez 2 mm sito. Dla każdej próbki gleby należy wykonać sześć powtórzeń. Zmieszać pozbawioną nasion glebę z kompostem doniczkowym w stosunku 3 : 1 z piaskiem i użyć jako mieszankę doniczkową. Dokładnie wymieszać mieszankę doniczkową w stosunku 1 : 1 z glebą do badania (600 ml każdego) w nadmuchanej torebce. Napełnić sześć 250-ml jednorazowych kubków wyposażonych w otwory drenażowe w podstawie mieszanką próbka/podłoże. Ustawić sześć doniczek razem na plastikowej tacce. Podlać je delikatnie od góry oraz na podstawkę.

Wstępnie skiełkować nasiona buraka cukrowego odmiany podatnej, przez moczenie w letniej wodzie przez 4 h. Rozłożyć nasiona na wilgotnym papierze kuchennym w szczelnym, plastikowym pojemniku i trzymać przez około 24 h, aż pojawią się korzonki. Wysiać po dwa wstępnie skiełkowane nasiona na doniczkę. Do sadzenia używać jednorazowych patyczków lub pęsetki. Sterylizować pęsetę pomiędzy różnymi próbkami gleby (np. 70% etanolem). Przykryć nasiona małą ilością sterylnego piasku. Uprawiać rośliny przez 6 tygodni w szklarni, z dzienną temperaturą 23°C i temperaturą nocną 15°C. Nie podlewać nadmiernie, ani nie dopuścić by doniczki stały w wodzie przez dłuższy okres czasu ponieważ będzie to hamować wzrost korzeni. Podlewać lekko od szczytu, aż do kierowania bezpośredniego strumienia do poszczególnych doniczek. Unikać zanieczyszczeń krzyżowych pomiędzy próbkami. Pozwolić glebie lekko wyschnąć pomiędzy podlewaniami. Nawozić raz na tydzień odpowiednim nawozem płynnym. Oplukać korzenie, oddzielni z każdej doniczki do wiadra lub na tacę. Spłukać czystą wodą w celu usunięcia pozostałości. Zmieniać wodę pomiędzy kolejnymi próbkami badanej gleby. Odciąć korzenie i korzenie boczne i umieścić około 1 g w oznakowanej torebce homogenizacyjnej.

Przebadac testem ELISA (Załącznik 1), objętości nanoszone na płytkę to 100 µl na studzienkę.

Test francuski (LNPV Fleury method)

Protokół ten został opracowany przez INRA w Dijon, sprawdzony przez LNPV i używany jest od 1987 do seryjnych analiz. Opublikowano go w French Official Journal drugiego czerwca 2005 pod oznaczeniem 'VS/04/07 wersja b'. W chwili obecnej poddawany jest on badaniom międzylaboratoryjnym.

Z pola pobrać próbkę ziemi o masie 2,5 kg. Jeśli próbka gleby nie jest zbyt wilgotna oraz posiada odpowiednią sypkość, należy ją dobrze wymieszać i użyć bezpośrednio do badania. Jeśli istnieje potrzeba osuszyć próbkę powietrzem, rozdrobnić używając młotka, przesiać przez 5 mm sito a następnie dobrze wymieszać przed badaniem. Dla każdej próbki gleby należy wykonać 6 powtórzeń. Próbką wypełnić sześć 150-ml, jednorazowych kubków, zaopatrzonych w otwory drenażowe wywiercone w podstawie. Ustawić sześć doniczek razem na tacce. Do każdej doniczki wysiać około 20 nasion odmiany podatnej. Przykryć nasiona cienką warstwą badanej gleby. Przykryć każdą doniczkę podstawką, lub podobnym, by zapobiec wysychaniu gleby przed wschodami roślin. Podlewać lekko na spód tacki. Powierzchnia gleby musi być wilgotna. Uprawiać rośliny przez 3–4 tygodnie w komorach fitotronowych z temperaturą regulowaną w okolicy 25°C w odpowiednim świetle (15 h światło dzienne). Usunąć przykrycie jak tylko siewki skiełkują. Zawsze utrzymywać glebę wilgotną, regularnie podlewać. Nie podlewać z góry, ale bezpośrednio na tackę. Przez cały czas warstwa wody musi być utrzymywana na dnie podstawki. Po 3–4 tygodniach wzrostu, opłukać korzenie czystą wodą, osobno z każdej doniczki. Obciąć korzenie i umieścić około 0,5 g w opisanej torebce homogenizacyjnej. Każda torebka powinna zawierać korzenie pochodzące z jednej doniczki. Używanych jest tylko pięć doniczek. Szósta doniczka używana jest w celu uzupełnienia zawartości torebek, jeśli w pozostałych pięciu doniczkach zbrakło korzeni. Przebadac testem ELISA (Załącznik 1).

Tłumaczenie z jęz. angielskiego	Zatwierdził:
Justyna Pięcińska (GIORiN CL)	Janina Butrymowicz (GIORiN CL)
25.09.2013	



Web Ryc. 1 Typowe objawy rizomanii w polu: wyraziste, żółte smugi porażonych buraków.



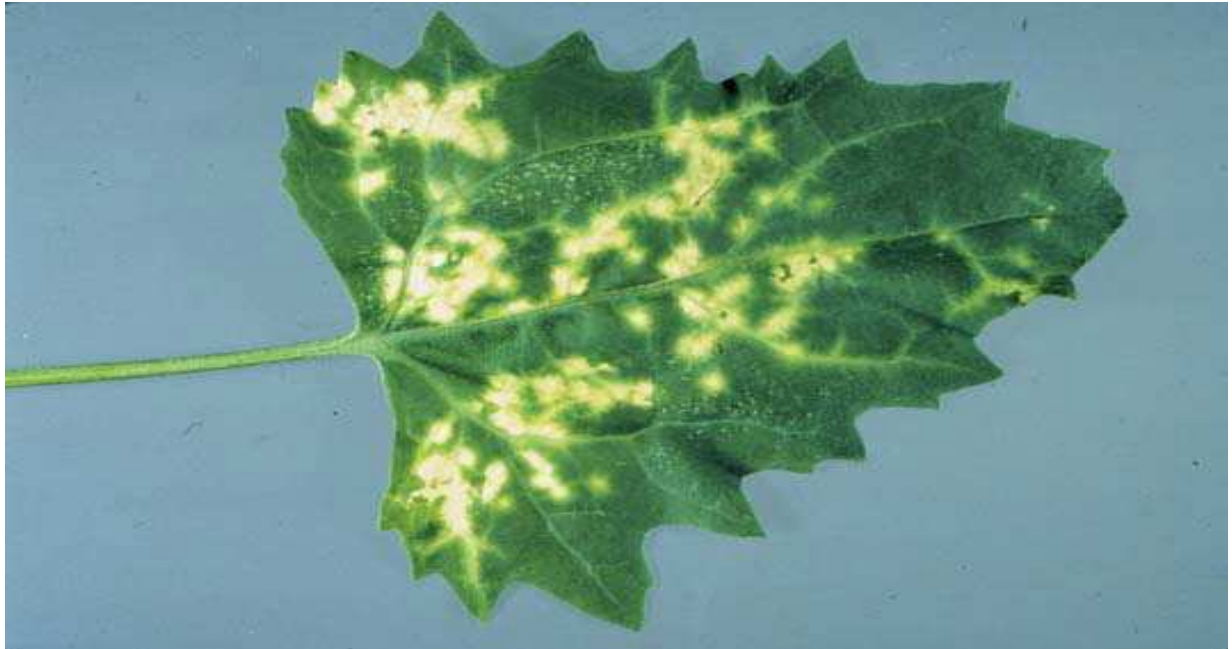
Web Ryc. 2 Objawy rizomanii na liściach: żółte przebarwienian nerwów postępujące od głównej żyły liścia (bardzo rzadko obserwowane w UK).



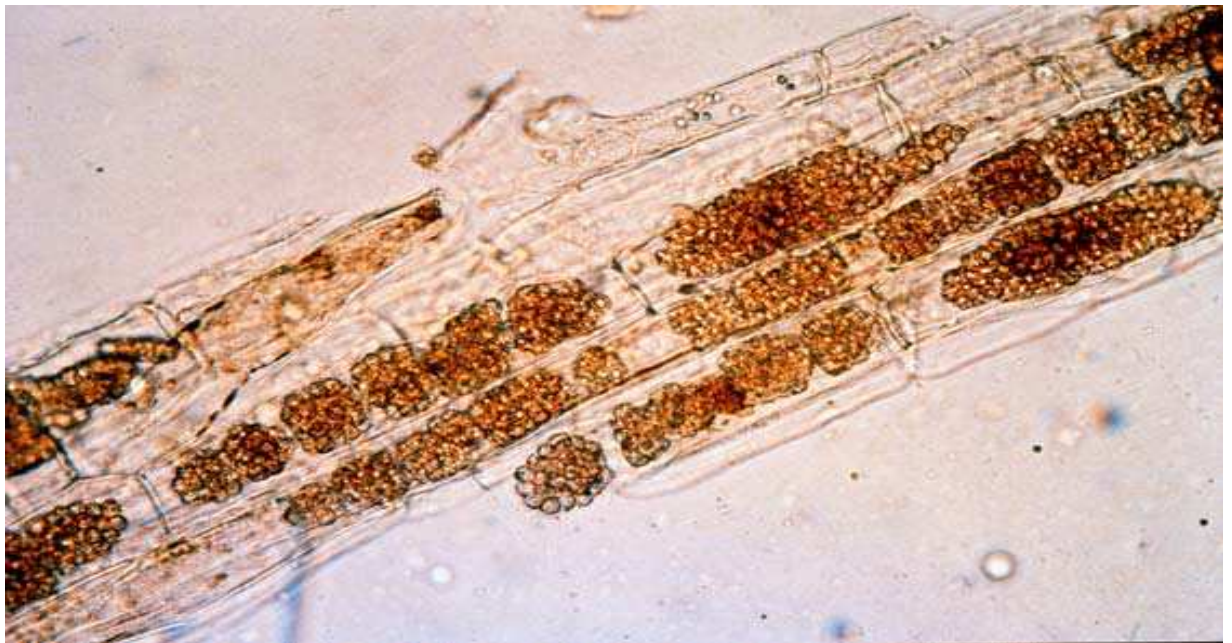
Web Ryc. 3 Objawy rizomanii na liściach: jasno zielone liście, pionowo wydłużone listowie, zwężone blaszki liściowe



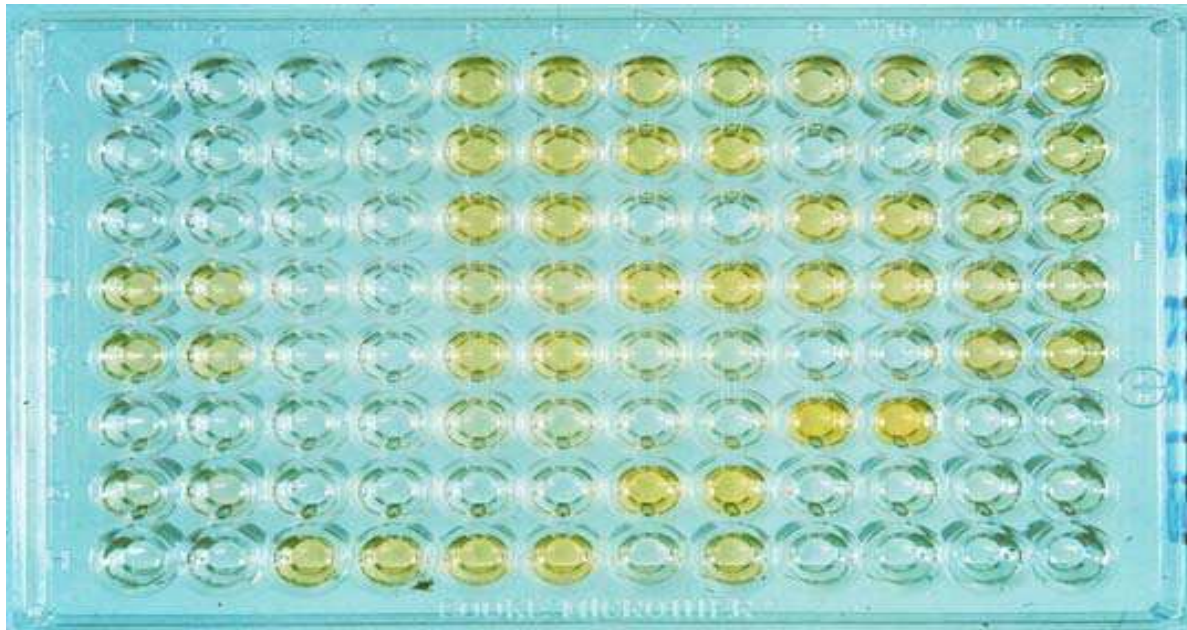
Web Ryc. 4 Typowe zewnętrzne objawy korzeniowe rizomanii wykazujące zmniejszenie wielkości buraków oraz proliferację korzeni (broda korzeni).



Web Ryc. 5 Chlorotyczne zmiany spowodowane BNYVV na *Chenopodium quinoa*.



Web Ryc. 6 Szkiełko mikroskopowe z widocznymi cystosorusami *Polymyxa betae*.



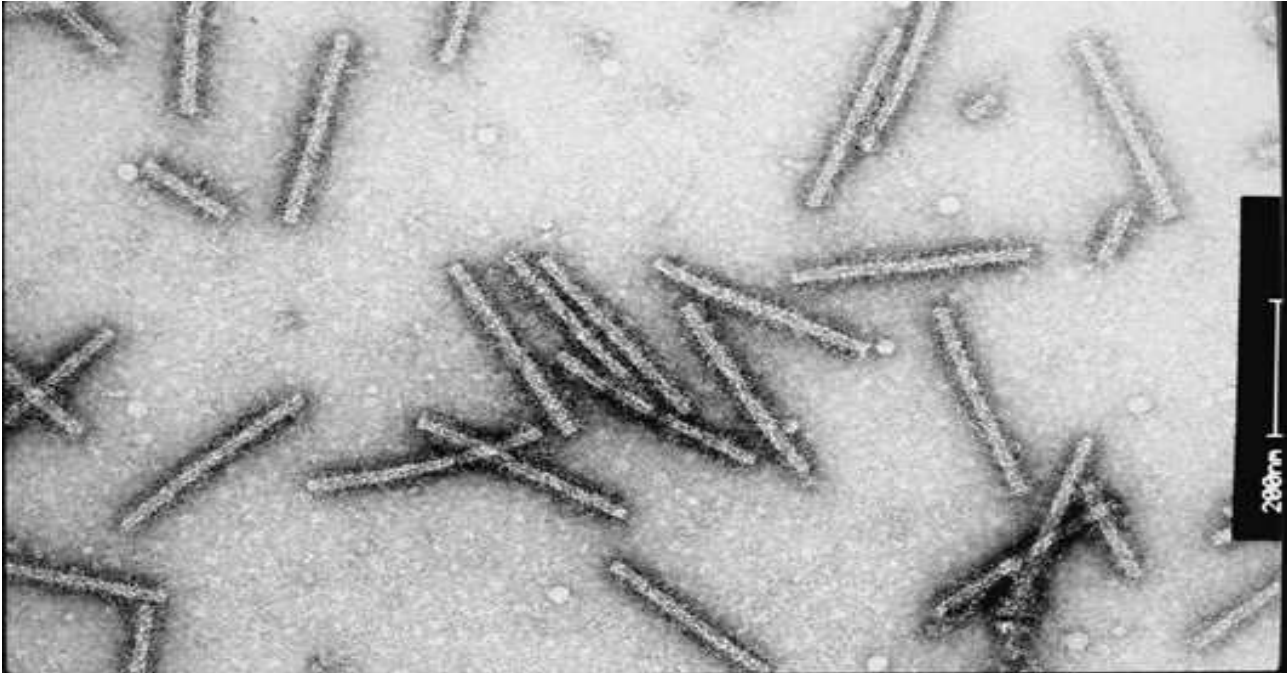
Web Ryc. 7 Test diagnostyczny ELISA: żółte studzienki, jeśli używamy substratu dla alkaliczne fosfatazy, wskazują na pozytywny wynik – obecny jest BNYVV.

Web Ryc. 8 Zestaw Pocket Diagnostics do wykrywania rizomanii testami płytkowymi

a. test płytkowy- negatywny

b. test płytkowy- pozytywny





Web Ryc. 9 Mikrografia elektronowa pałeczkowatych wirionów BNYVV, wykonana przy użyciu metody IEM



Web Ryc. 10 Mikrografia elektronowa cząsteczek wirusa BNYVV wyznakowanych immunozłotem.