



**Examensarbeten inom Trädgårdsingenjörsprogrammet
2006:17**

(ISSN 1651-8152)

DIAGNOSTISKA METODER FÖR VÄXTVIRUS I NEMATODVEKTORER

Diagnostic methods for
plant viruses
in nematode vectors

av

Veronika Andersson & Helene Klingberg

Biologi 10 p
Handledare: Salla Marttila
Sanja Manduric
Examinator: Stig Andersson
Institutionen för växtvetenskap
Box 55, 230 53 Alnarp

Förord

När detta examensarbete påbörjades var det mycket som för oss var okänt om nematoder och diagnostisering. När vi först gick in i laboratoriet kände vi oss ganska vilsna, men vi fick ett hjärtligt bemötande och kände oss snart som hemma.

Vi har åtskilliga gånger under arbete tagit hjälp av de personer som arbetar på nematologin vid SLU i Alnarp. Vi vill här tacka personalen på nematologiavdelningen för all hjälp, Maimoun Hasoun, för sitt tålamod när vi skulle lära oss extraktion, Susanne Andersson som såg till att vi fick material att arbeta med, Greta Mårtensson för all hjälp och uppmuntran.

Ett stort tack vill vi rikta till våra handledare, Sanja Manduric och Salla Marttila. De har gjort denna upplevelse till något utöver det vanliga. Tack för att ni alltid hade tid och tålamod med två virriga studenter.

Slutligen vill vi passa på att tacka Ann-Louise Assarsson, Maja Bengtsson och Åsa Norén Klingberg för all uppmuntran och inspiration.

Foton på nematoder som finns i arbetet är tagna av Maimoun Hasoun. Övriga foton är tagna av Helene Klingberg.

SAMMANFATTNING

Det jordburna växtviruset Tobacco Rattle Virus (TRV) är en svår skadegörare i bland annat potatisodlingar där det ger upphov till rostringar. Rostringar är en växtsjukdom som orsakar en kvalitetssänkning av skörden. Det är för odlaren av största vikt att få en korrekt diagnos av sjukdomen innan potatissättningen.

TRV sprids naturligt av fritt levande nematoder av släktena *Trichodorus* och *Paratrichodorus*. Överföringen av TRV till en planta inträffar då virusbärande nematoder äter på dess rötter. Samspelet mellan virus, nematoder och plantor är komplicerat och ännu inte helt utrett.

Diagnostiseringsmetoder av TRV är idag inte tillfredställande. Bestämningen baseras på växthus-biotester, en metod som är kostsam och tidskrävande. Ett serumneutralisationstest (ELISA) används också men identifikationen är osäker eftersom TRV förekommer i ett flertal stammar och det finns en relativt stor risk att virus och antikroppar ej överensstämmer.

Ett stort behov av nya diagnostiseringsmetoder som kan utföras snabbt och med en hög tillförlitlighet föreligger. En möjlighet som vi undersökte var negativ kontrastering med transmissionselektronmikroskop, TEM. Vårt metodval motiverades med att viruspartiklar snabbt kan identifieras då TRV enkelt kan kännas igen på den karaktäristiskt rektangulära formen. Mer specifik identifiering av virusstammar skulle kunna vara möjlig om specifika antikroppar är tillgängliga.

Vid SLU i Alnarp finns kunskap om nematoder och växtvirusdiagnostik, och en elektronmikroskopienhet är tillgänglig. Denna studie kan ses som ett pilotprojekt för tillämpning av elektronmikroskopi i TRV-diagnostik.

ABSTRACT

Tobacco Rattle Virus (TRV) is a soilborne plant virus. It is an important pathogen in potatoes where it causes spraing disease. This disease can lead to significant economical loss for the farmer, so it is imperative to get the proper diagnose before planting.

TRV is spread naturally by free-living nematodes (*Trichodorus* and *Paratrichodorus*). Transference of TRV to a plant occurs when the virus-carrying nematodes feed on plant roots. The relationship between virus, nematodes and plants is complicated, and has to these days not been fully characterized.

The diagnostic methods available today do not work sufficiently. The process is made even more complicated by the fact that TRV occurs naturally in a great number of different strains. This leads to problems with molecular diagnosis, since there is a risk that the virus and antibodies used do not match. Today, most diagnosis is carried out by the process of biological testing. There are, however, several problems with this method. It is for example both expensive and time-consuming.

There is a need for new diagnostic methods that are fast, cheep and reliable. One such method could be negative contrasting using transmission electron microscope (TEM). Using this method, virus particles can be identified quickly as TRV is easily recognizable due to its characteristically rectangular shape. In order to correctly diagnose a specific strain of virus, the appropriate antibodies could be used.

At SLU in Alnarp there is knowledge of nematodes and plant virus diagnosis, and an electron microscope available for use in this study. This study can be seen as a pilot project for the use of electron microscopy for the diagnosis of TRV.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

1. INLEDNING	6
1.1 Syfte och avgränsningar	7
2. ROSTRINGAR, SYMPTOM AV SJUKDOMEN.....	8
3. NEMATODER.....	8
3.1 Livscykel	9
3.2 Anatomi	9
3.3 Födointag.....	11
4. TOBACCO RATTLE VIRUS (TRV).....	12
4.1 Anatomi	12
4.2 Virusöverföring	13
4.3 Relationen mellan virus och nematoder	14
5. DIAGNOSTISERINGSMETODER	15
5.1 Biologisk metod.....	15
5.2 Morfologisk metod	16
5.2.1 Ljuskopiering	16
5.2.2 Elektronmikroskopi	16
5.2.2.1 Transmissionselektronmikroskopi (TEM)	17
5.2.2.2 Immunosorbentelektronmikroskopi (ISEM).....	18
5.3 Serologiska och molekylärbiologiska metoder.....	18
5.3.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	18
5.3.2 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	18
6. MATERIAL OCH METOD.....	19
6.1 Materialförteckning	19
6.2 Metod.....	19
7. RESULTAT	21
8. DISKUSSION	22
9. REFERENSLISTA.....	25
10. BILAGA.....	28
10.1 Materialförteckning	28

1. INLEDNING

”If all the matter in the universe except the nematodes were swept away, our world would still be dimly recognizable, and if, as disembodied spirits, we could then investigate it, we should find its mountains, hills, vales, rivers, lakes, and oceans represented by a film of nematodes.”

Cobb, N. (1914)

Denna inspirerande beskrivning har fascinerat oss sedan vi hörde den första gången i början av utbildningen. Vi är förundrade över diversiteten inom den talrikaste gruppen av flercelliga djur som förekommer i miljoner under varje kvm mark och spelar en viktig roll i markekologiska processer. En tiondedel av alla nematoder är skadegörare på ett stort antal växter och man uppskattar att de är orsaken bakom ca 10 % av alla skördeförluster. Ofta samarbetar de dessutom med andra markorganismer och utvecklar olika typer av förhållanden. Nematoder som bildar komplex med virus tjänar mestadels som vektorer och överför virus mellan plantor.

Odlare som har nematodrelaterade problem i sina odlingar kan få jordprover kvantitativt och kvalitativt analyserade avseende förekomst av växtparasitära nematoder inom bara några dagar. Däremot, för att få veta om nematoderna är virusbärande måste man använda sig av biotester, vilket innebär odling av olika värdväxter och registrering av virussymptom. Den processen kan ta några månader. Effektivisering av virustester har länge varit efterfrågad och anledningen till detta arbete var att vi ville starta en metodutveckling för ett annat sätt att diagnostisera virus hos nematoder än den som används idag.

1.1 Syfte och avgränsningar

För svenska potatisodlare är rostringar en växtsjukdom som kan ge upphov till stora bekymmer. Undersökningar har visat att sjukdomen orsakas av bl.a. Tobacco Rattle Virus (TRV). Viruset sprids av fritt rörliga nematoder inom släktena *Paratrichodorus* och *Trichodorus*.

Diagnostiseringen av sjukdomen sker idag dels med nematodanalyser och dels med hjälp av biotester. Då biotester är både dyra och tidskrävande skulle en ny metod som var både billigare och enklare att tillämpa vara önskvärd att finna. En sådan metod skulle kunna vara diagnostisering med hjälp av elektronmikroskop. Det som denna undersökning går ut på är att se om det är möjligt att extrahera viruspartiklar ur nematoder för att sedan kunna identifiera dem med hjälp av elektronmikroskopi.

Vår hypotes är att man med hjälp av elektronmikroskopi ska kunna se om ett prov av nematoder innehåller viruspartiklar. Då vår tid är mycket begränsad kommer vi att nöja oss med att göra inledande tester som skulle kunna sätta igång fortsatta, djupare studier inom detta ämne.

2. ROSTRINGAR, SYMPTOM AV SJUKDOMEN

Rostringar är ett stort gissel som ofta resulterar i stora ekonomiska förluster i många svenska potatisodlingar. Problemen har blivit särskilt påtagliga i Östergötland, Halland och nordöstra Skåne.

En mycket låg populationstäthet (några nematoder/kg jord) är tillräcklig för att orsaka en svår infektion vid virusöverföring. TRV, såväl som stubbrotnematoder, har en mycket bred värdväxtkrets vilket leder till en långvarig smitta med starkt begränsade bekämpningsmöjligheter (Anonymous, 1971).

Virusinfektionen blir oftast begränsad till knölarna, där den visar sig som bruna, mer eller mindre fullständiga rostringar i knölköttet. Ringarna uppkommer efter att nematoderna överfört viruset direkt till knölarna och är oftast belägna nära skalet (Svensson, 1974).

Symptomen på angrepp av TRV skall ej förväxlas med dem av potatismopptoppvisuret (PMTV). Detta ger liknande symptom men sprids med pulverskorvsvampen, *Spongospora subterranea*. Detta virus kan också spridas med utsädespotatisen (Eriksson, 1996).

Studier visar att ett angrepp av TRV sprids längs med odlingsraderna i högre hastighet än till plantor i intilliggande rader i de fall då infektionen sprids av nematoder. Detta ger fläckarna en elliptisk form (Taylor & Brown, 1997). Denna sjukdomsbild skiljer sig väsentligt från de fall då virus förs in i fältet med smittat växtmaterial. Vid det senare fallet återfinns de sjuka plantorna mer utspridda i fältet. Vidare spridning är då beroende på om vektorer finns tillgängliga eller inte (Taylor & Brown, 1997).

3. NEMATODER

Nematoder, eller rundmaskar, lever i stort sett överallt där det finns förutsättningar för liv på denna jord. De olika arterna livnär sig på vitt skilda sätt, många lever fritt i jorden eller i vatten där de äter olika mikroorganismer, alger eller mikroskopiska djur. Det finns även arter som parasiterar på människor och andra djur och vars angrepp kan leda till olika sjukdomar (Agrios, 1997).

Den grupp som är intressant i denna studie är de växtparasitära nematoderna, som genom sina angrepp på olika grödor, kan orsaka stora besvär för odlaren. De växtparasitära nematoderna delas in i tre undergrupper, rotgallnematoder, cystnematoder och fritt rörliga nematoder. Det är i den sistnämnda gruppen virusvektorerna återfinns. Stubbrottnematoder, *Trichodorus* och *Paratrichodorus*, vektorer för TRV, tillhör de ektoparasitära rotnematoderna och spenderar hela sitt liv i jorden. De går alltså inte in i växtvävnaden (Pettersson & Åkesson, 1998).

3.1 Livscykel

Stubbrottnematoder går igenom ett ägg- och fyra olika juvenilstadier innan de blir fullbildade, vuxna individer (Agrios, 1997). Undersökningar tyder på att alla rörliga stadier av nematoderna överför virus lika effektivt (Taylor & Brown, 1997). Efter varje juvenilstadium ömsas kutikulan. Då blir troligtvis nematoden fri från viruset. Detta beror på att vid kutikulaömsningen ersätts även den del av matstrupens skikt där viruspartiklarna sitter. Stubbrottnematoderna har sannolikt en generation per år i Sverige. Detta beroende på våra klimatiska betingelser. I varmare klimat har de en kortare livscykel (Taylor, 1978).

3.2 Anatomi

Växtparasitära nematoder är små och för att kunna studera och identifiera dem krävs tillgång till mikroskop. Kroppsformen är spolformad eller ålformad, och de saknar extremiteter. Kroppen är täckt av en genomskinlig ytterhud, eller kutikula, genom vilken man tydligt kan se de olika strukturerna inuti kroppen. För att kunna förflytta sig använder nematoden fyra muskelbandsknippor som går längs med hela kroppen. Den rör sig framåt genom slingrande rörelser. Något som är karaktäristiskt för *Paratrichodorus* är att kutikulan ser ut att sitta löst på kroppen. När nematoden rör sig kan man se kutikulan vecka sig (Agrios, 1997).

Stubbrottnematoder är, beroende på utvecklingsstadiet, endast 0,35-1,8 mm långa. De karakteriseras av en för nematoder relativt tjock kroppsform (Banck, 1997). Deras huvudände är något avsmalnande medan bakkroppen är rundad (Persson, 1968). De lever oftast i lätta, sandiga jordar med en partikelstorlek på $>50\mu\text{m}$ (Banck, 1997).



Bild 1. Stubbrottnematod

Trichodorus och *Paratrichodorus* kommer åt sin föda med hjälp av en muntagg. Denna använder de till att göra hål i cellväggar för att komma åt den näringsrika vätskan inuti cellen. Muntaggen är väl synlig i mikroskop. *Trichodorus* och *Paratrichodorus* skiljer sig från de flesta andra växtparasitära nematoder genom utformningen och funktionen av muntaggen, även kallad onchiostylet (Persson, 1968; Banck, 1997). Onchiostyleten är solid och bildas i matstrupen, till skillnad från muntaggen på de flesta andra växtparasitära nematoderna (Agrios, 1997). Formen på den kraftiga, långa muntaggen är dorsalt böjd. Efter varje hudömsning förs denna framåt från matstrupen tills den hamnar i den rätta positionen (Persson, 1968).

Matsmältningen sker genom ett rör som sträcker sig från munnen genom matstrupen, vidare till tarmen och genom ändtarmen för att slutligen passera anus (Agrios, 1997). Matstrupen är smal vid munnen för att längre in i kroppen svälla upp och bli spadformad. I den spadformade delen av matstrupen finns ett antal körtlar som producerar saliv som förs in i växtcellerna när nematoden äter (Brown *et al.*, 1995).

3.3 Födointag

Vid ett angrepp av stubbrotnematoder uppstår förutom eventuella, sekundära skador i form av rostringar även primära skador orsakade av själva födointaget.

När en stubbrotnematod lokaliserat en rotspets eller en ung rot från en av sina värdväxter använder den sin muntagg för att sticka hål i en växtcell. Detta görs med huvudet i en rät vinkel från rotens yta. De växtceller som blivit utsatta för angrepp sväller upp. Roten påverkas även genom att tillväxten av celler i meristemmet stannar av och det bildas ett flertal sidorötter som sedan utsätts för nya angrepp. Resultatet blir ett buskigt, kort rotsystem med knubbiga rotspetsar (Agrios, 1997).

Hur själva födointaget går till har studerats noga. Brown *et al.* (1995) har som ett resultat av dessa studier delat in processen i fem faser:

1. Den undersökande fasen
2. Perforering av cellväggen
3. Utsöndring av saliv
4. Intagande av föda
5. Avlägsning från cellen



Bild 2. Detaljbild av stubbrotnematod, muntagg

Hela processen går relativt snabbt. Det kan ta allt ifrån ett antal sekunder till upp emot några minuter (Agrios, 1997). Nematoden börjar med att pressa sina läppar mot cellväggen och penetrerar den därefter med sin muntagg i en serie av stötar på mellan två till tre μm djupt.

När muntaggen befinner sig inne i cellen utsöndras en vätska som gör så att cytoplasman sammanhopas kring den, tillsammans med cellkärnan. Därefter kan nematoden tillgodogöra sig en del av cellens innehåll (Brown *et al.*, 1995). Endast 10 sekunder efter ett angrepp är nematoden redo att angripa en ny cell (Persson, 1968).

4. TOBACCO RATTLE VIRUS (TRV)

4.1 Anatomi

TRV är ett växtvirus som tillhör tobnavirusen. Dessa virus sprids alla med *Trichodorus*- och *Paratrichodorus*-arter. Viruspartiklarna är ca 200 nm långa och stavformade, till skillnad från de runda nepovirusen. Det finns många olika stammar av TRV som sprids med olika arter av nematoder. De flesta stammarna av TRV kan dessutom spridas med frön (Brown *et al.*, 1995).

TRV är uppbyggt av två RNA- strängar, en längre - RNA1 och en kortare - RNA2. RNA1 kan replikera sig själv, men den saknar troligen genetisk information som är nödvändig för att kunna tillverka den stabila formen av viruset. Den informationen tros däremot finnas i RNA2-kedjan som ej kan replikera sig utan hjälp från RNA1. När de båda är tillsammans bildas den stabila formen av viruset (Matthews, 1981). Bägge kedjorna har gener som bestämmer hur sjukdomen gestaltar sig (Brown *et al.*, 1995).

Det är den kortare RNA2- kedjan som varierar i sin uppbyggnad i olika stammar av TRV. För att kunna studera vilken roll de olika RNA-kedjorna uppfyller, har forskare kombinerat RNA1 från en stam med RNA2 från en annan (Taylor & Brown, 1997). Utformningen av RNA2 spelar en roll i virusets förmåga att hålla sig kvar i nematoden och sedan överförs till värdväxter (Brown *et al.*, 1995). Denna kedja ansvarar bland annat för utformningen av det proteinskikt som omger viruset (Ploeg *et al.*, 1992). Troligtvis finns det även andra faktorer som spelar in.

Proteinerna som bygger upp TRV-strukturen bildar formen av en helix. På kanterna av viruspartikeln sitter C-terminus och N-terminus. C-terminus har aminosyrasekvenser vilka sticker ut från viruset och bildar "armar" som tros spela en viktig roll vid fasthållningen i nematodens matstrupe. Studier har även visat på att det mellan viruset och matstrupen finns ett mellanrum som är längre än vad som skulle orsakas av dessa aminosyrasekvenser. Detta utrymme förmodas uppfyllas av bl.a. kolhydrater bildade av vissa andra gener i RNA2-kedjan (Taylor & Brown, 1997).

RNA1- kedjans utformning avgör om en planta är mottaglig för en TRV-infektion (Brown *et al.*, 1995). När en planta blir infekterad av TRV kan den drabbas av två olika former av infektion. En stabil form kännetecknas av att viruset är villigt att överföras till saven och då behåller sin form även efter frysning och upptining av bladet. Det kan även bildas en instabil form, som snabbt blir inaktiv i saven, men kan bevaras med en fenol-behandling (Matthews, 1981).

4.2 Virusöverföring

För att fastställa om en nematodart fungerar som vektor för en viss stam av ett virus finns det en del kriterier som ska uppfyllas:

- Först och främst måste nematoden äta viruset från en infekterad planta.
- Därefter ska nematoden ha förmågan att hålla kvar viruspartiklarna i kroppen. För att viruset skall kunna överföras till värdväxten är det nödvändigt att dessa viruspartiklar fastnar på rätt plats i matsmältningsorganet. Då kan de lossna och följa med saliven till en ny växtcell när nematoden så småningom äter från en frisk planta.
- Växten som blir angripen av nematoden ska bli infekterad av viruset.
- Det ska också kunna uteslutas att infektion har spridits av någon annan organism.

Det ska alltså kunna gå att bevisa att det är just den aktuella nematoden som överfört viruset (Brown *et al.*, 1995).

I *Trichodorus* och *Paratrichodorus* tjänar hela matstrupens lumen som fasthållningsplats för viruset (Brown *et al.*, 1995). Hur det går till när viruset släpper från matstrupen är ännu inte helt utrett. Det finns olika teorier om detta, bland annat att viruset lossnar för att det blir en förändring i pH när saliven passerar matstrupen. Det skulle även kunna orsakas av en förändring i jonladdning eller enzymer i nematoden eller virusets yta (Taylor & Brown, 1997). En enda nematod kan smitta flera plantor. Av detta kan slutsatsen dras att det bara är en del av viruspartiklarna som lossnar vid varje födointag (Agrios 1997). För att ett virus framgångsrikt ska kunna spridas av en nematod räcker det inte att nematoden kan ta upp virus. De skall även kunna överföra det till växten. Det finns undersökningar som visat på fall då viruspartiklar kunnat påträffas i nematoder trots att dessa har ej varit infektionsspridande (Taylor & Robertson, 1975).

Van Hoof (1964) har kunnat visa att en fullbildad nematod som en gång blivit virusbärande förblir det under resten av sin livstid. Detta visades genom att hålla en virusbärande nematod isolerad i jord utan tillgång på mat under 10 månader och sedan placera ut den på en värdväxt. Studier har även visat att det är tillräckligt att en nematod har möjlighet att äta av en planta smittad med virus under en timmes tid för att kunna bli virusöverförande (Persson, 1968). Forskning visar att ju längre tid en nematod får möjlighet att äta av en planta, desto högre chans är det att den lyckas överföra virus. I Taylor och Browns artikel (1997) anges att McGuire (1964) presenterade ett antagande att virusöverföringen ökar proportionellt med tiden upp till tio dagar.

4.3 Relationen mellan virus och nematoder

Det finns ett tydligt samband mellan olika stammar av TRV och olika arter av *Trichodorus* och *Paratrichodorus*, särskilt uttalat är detta i fråga om de olika arterna av *Paratrichodorus*. En viss stam av viruset kan alltså endast spridas av vissa arter av nematoder (Ploeg *et al.*, 1992; Taylor & Brown, 1997). Detta samband beror på ett flertal olika faktorer som samverkar. Några faktorer är: om nematoden har förmåga att behålla viruset, var i nematoden det är som viruset kvarhålls och dessutom hur det kan hållas kvar på rätt plats (Brown *et al.*, 1995). Det räcker nämligen inte att nematoder och virus finns i jorden, det skall också vara rätt stam som passar till den nematodart som finns där.

Åtminstone sex *Trichodorus*-arter och åtta *Paratrichodorus*-arter har identifierats som vektorer för TRV. För att kunna fastställa relationen mellan de olika typerna av virus och vektorerna har enskilda nematoder placerats ut på fånggrödor. Därefter har virusen undersökts genom ELISA- metoden och genom immunosorbent elektron mikroskopi (ISEM) för att stammarna ska kunna identifieras (Ploeg *et al.*, 1992).

Det är många faktorer som ska samverka för att virus framgångsrikt ska kunna överföras av nematoder. Väderleken kan påverka om angreppet blir omfattande. Kommer det lagom mycket regn håller sig nematoderna i de övre markskikten där de kan göra stor skada på växterna. Vid torka söker de sig djupare ned i jorden och angreppet blir mindre eftersom rötterna inte går lika långt ned (Engsbro, 1973). Nematoder behöver nämligen rätt fuktighetsförhållande, temperatur och tillgång till syre för att kunna överleva och förflytta sig (Agrios, 1997).

5. DIAGNOSTISERINGSMETODER

Det finns ett antal metoder för att diagnostisera angrepp av nematodöverförda virus. Diagnostisering kan grovt delas in i biologiska (biotest), morfologiska (mikroskopi), serologiska (ELISA) och molekylärbiologiska (PCR) metoder. Varje metod har fördelar och nackdelar. Något som bör beaktas är att det inte endast är diagnosmetoden som påverkar resultatet av undersökningen. Det finns ett antal andra faktorer som spelar in, såsom extraktionsmetod och antal nematoder i provet (Taylor & Brown, 1997).

5.1 Biologisk metod

En metod som användes redan innan nematoden identifierats som vektor var att göra ett biotest, där friska plantor fick växa i jord som tagits från smittade plantor. Ett problem med denna metod är att det kan ta allt från flera veckor upp till ett par år innan plantan uppvisar symptom. Denna tidsfördröjning lyckades man dock begränsa något genom användandet av fånggrödor. I den smittade jorden odlas under ett par veckor värdväxter för det virus man misstänker. Ur rötterna på dessa växter extraheras sedan sav som strykes på bladen till indikatorplantorna som sedan uppvisar symptom (Taylor & Brown, 1997).

Enligt Taylor och Brown (1997) publicerade Fritzsche (1967) en utvärdering av de metoder för studier av relationen mellan nematoder och virus som fanns vid denna tid. Han ansåg att det fanns ett behov för att utarbeta ett nytt sätt att undersöka om nematoden var virusvektor. Den metod han föreslog gick ut på att ta handplockade nematoder som sköljdes flera gånger i vatten, varefter de placerades i krukor. I dessa hade han även planterat plantor infekterade med virus. Jorden i krukorna skulle vara steriliserad. Efter en viss tid extraherades nematoderna igen, sköljdes på nytt och överfördes till en kruka där det växte en frisk planta. Slutligen extraherades sav från rötterna på denna planta och ströks ut på bladen av en indikatorplanta (Taylor & Brown, 1997).

Inte heller denna metod var utan fel. Det fanns en risk att nematoderna inte lyckades ta sig fram till plantan och därmed misslyckades med att överföra viruset. För att minska denna risk gjorde Fritzsche en del förbättringar av sin metod. Genom att bl.a. minska storleken på krukorna och minska mängden jord kunde han förbättra möjligheterna för nematoderna att finna plantan inom en skälig tid (Taylor & Brown, 1997).

5.2 Morfologisk metod

5.2.1 Ljuskopiering

För att det ska vara möjligt att kunna utföra ingående studier av nematoder, krävs det tillgång till ett ljuskopieringsmikroskop. Principen bakom ljuskopieringsmikroskopet är att använda linser och synligt ljus för att studera ett preparat i förstoring.

Det finns begränsningar för ljuskopieringsmikroskopet. Vid alltför höga förstoringar går det inte att få någon bra upplösning. Den högsta förstoringen som kan visas med en bra upplösning är ca 1000 gånger. Det innebär partiklar med en storlek på 0,2 μm . Viruspartiklar är betydligt mindre än så. För att kunna studera dem krävs det alltså en annan förstoringmetod (Campbell *et al.*, 1999).

5.2.2 Elektronkopiering

För att studera partiklar av ett virus storlek är det möjligt att använda sig av ett elektronkopieringsmikroskop. Denna typ av instrument skiljer sig betydligt från ljuskopieringsmikroskopet. I stället för att använda sig av ljusbestrålning och glaslinser för att förstora upp bilden av ett preparat, är det i elektronkopieringsmikroskopet en ström av elektroner respektive magnetiska "linser" som svarar för förstoringen.

Tack vare att elektronerna har en kortare våglängd än det synliga ljuset är det med denna process möjligt att få en hög upplösning på preparat som är förstora hundra gånger mer än i ljuskopieringsmikroskopet. Det blir möjligt att se partiklar som är så små som 2nm (Campbell *et al.*, 1999).

5.2.2.1 Transmissionselektronmikroskopi (TEM)

TEM används ofta för att studera de olika *interna* strukturerna i celler.

Principen för hur TEM fungerar är snarlik den som ljusmikroskopet bygger på. En ström av elektroner får passera genom ett preparat och bilden förstoras med hjälp av linser. I denna typ av mikroskop är linserna gjorda av elektromagneter.



Bild 3. Föreställer ett TEM av märket Jeol, jem 1010.

För att få en tydligare bild färgas preparatet in med en tungmetall (Campbell *et al.*, 1999).

I detta arbete användes uranylacetat eftersom det är elektrontätt med stabila elektroner.

Uranylacetatet går ej in i partiklarna utan skuggar runt så det blir en negativ kontrastering i mikroskopet. Uranylacetatet färgar lipider, protein- och nucleinsyra (Forslind, 1981) .

5.2.2.2 Immunosorbentelektronmikroskopi (ISEM)

ISEM är en variant av elektronmikroskopi där antikroppar används för att fånga viruspartiklarna på gridden. Gridden behandlas först med en lösning av antikroppar. Därefter placeras den på en viruslösning så att viruspartiklarna kan fastna. En fördel med denna typ av preparat är att det endast fastnar viruspartiklar på gridden. Därmed kan koncentrationen av virus höjas och det blir enklare att ställa en diagnos. Det finns ett antal metoder för att förbättra utfallet med ISEM-preparat, såsom användandet av olika buffertar och olika pH-värden. Även denna typ av preparat kan färgas in med uranylacetat (Mendgen & Lesemann, 1991).

5.3 Serologiska och molekylärbiologiska metoder

5.3.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA är en serologisk metod där antikroppar används för att identifiera virusprotein i ett preparat. För att kunna upptäcka viruspartiklarna behandlas en särskilt utformad plastplatta med antikroppar. Därefter tillföres preparatet. I de fall då det finns viruspartiklar som stämmer överens med antikropparna fastnar de. Därefter kan de påvisas genom tillförelse av nya antikroppar med ett enzym som färgar vätskan i de fall det finns virus. Eftersom det finns flera olika stammar av TRV är denna metod svår att använda. Dessa olika stammar har olika virusprotein som reagerar med olika antikroppar (<http://en.wikipedia.org/wiki/ELISA>).

5.3.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR är en molekylärbiologisk metod för att identifiera DNA.

Med hjälp av olika primers och temperaturcykler mångdubbleras ett preparats DNA. För att detta skall kunna utföras behövs endast en liten mängd genetiskt material. Med hjälp av denna kan forskningen snabbt få fram en stor mängd DNA att undersöka.

När det gäller TRV används en metod som kallas RT-PCR. Det innebär att ett enzym kan bygga DNA utifrån ett RNA. Denna teknik används för att mäta mängden av en speciell gen. (<http://sv.wikipedia.org/wiki/RT-PCR>) Ett problem med denna metod är att de som använt den inte fått samma resultat varje gång. Den är alltså inte 100 % tillförlitlig när det gäller TRV (Manduric, 2006, pers. med.).

6. MATERIAL OCH METOD

6.1 Materialförteckning

Jordprover:

Prov 1, kommer från en trädgård i Skåne där kunden ville veta om det fanns nematoder i jorden. Här fanns ingen vetskap om virusförekomst. Provet var nedfrysst före finfördelning.

Prov 2, kommer från samma kund som prov 1, men detta är centrifugerat och koncentrerat.

Prov 3, kommer från en odlare i Halland. Här finns vetskap om virusförekomst i odlingen. Provet är centrifugerat och koncentrerat. Detta prov är ej nedfrysst före finfördelning.

Prov 4, kommer från samma kund som prov 3. Detta prov fick stå framme i rumstemperatur i 5 dagar.

Prov 5, kommer från samma kund som prov 3. Detta prov har efter finfördelning koncentrerats i Speedvac.

Nematoder (*Trichodorus* och *Paratrichodorus*)

Övrigt material, se **bilaga 1**

6.2 Metod

Extraktion

Nematoderna extraherades ur jordproven enligt Seinhorstmetoden (Seinhorst, 1960).

Därefter blandades proven med en magnetomblendare för att koncentration av nematoderna i vätskan skulle bli homogen. Detta bör utföras för att det ska vara möjligt att räkna antalet nematoder i provet. Därmed erhålls en god uppfattning av hur stor population det fanns i fältet.

Provet innehållande de nematoder som extraherats ur jordproven tömdes upp i en räknekammare. Detta skedde för att det skulle vara lättare att identifiera stubbrotsnematoderna i provet. När alla stubbrotsnematoder i provet plockats upp räknades de och placerades i ett eppendorfrör.

Finfördelning

När nematoderna väl hade räknats och placerats i ett eppendorfrör, koncentrerades provet med en centrifug så att nematoderna samlades i botten av provröret. Överflödigt vätska togs bort ur ytan med en finpipett. Sedan mosades det koncentrerade provet med en liten homogenisator som fördes ned i eppendorfröret. När nematoderna väl mosats var det dags att göra ett preparat som kunde användas i elektronmikroskopet.

Negativ kontrastering för TEM

Droppar av 20 µl nematodextrakt placerades på nescofilm i en petriskål. Viruspartiklar överfördes på gridden och kontrasterades för observering i TEM. En koppargridd med 200 mesh användes, detta innebär att det är 200 hål på gridden. Gridden plockades försiktigt upp ur en griddbox med en mycket smal pincett. Med pincetten tar man försiktigt tag längst ut i kanten på gridden som sedan läggs med den matta sidan ner på en droppe av 20 µl nematodextrakt. Den matta sidan av gridden är täckt av en plast- och kolhinna och kan mer effektivt dra åt sig de partiklar som finns i provet. Här får den ligga i ca 20-30 min för att så mycket material som möjligt skall hinna fastna.

Efter inkubation med nematodextrakt plockades gridden upp och överflödigt vätska sögs försiktigt bort med filterpapper. Gridden doppades först i ett par droppar av 1 % uranylacetat följt av ca 5 min i en tredje för att bli ordentligt infärgad. Därefter sögs överflödigt vätska bort och gridden lades över till griddasken där den fick torka i ca 10 min innan asken stängdes.

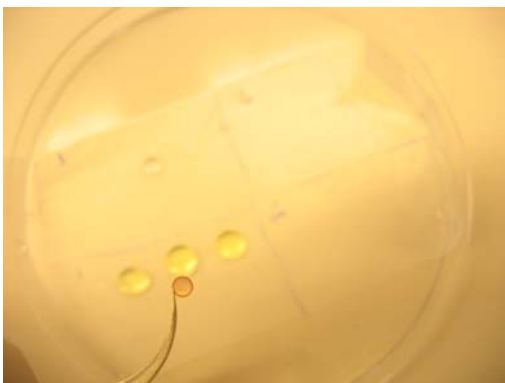


Bild 4. Gridden överförs till uranylacetatet **Bild 5.** Gridden ligger på uranylacetatdroppe

Observation

Vid observation i elektron mikroskop startas mikroskopet upp enligt anvisningar för respektive mikroskop. När mikroskopet är uppvärmt sättes griddens i för observation. Först med låg förstoring (1500-4000x) och, när intressanta partiklar hittas, används en större förstoring (ev. 20-30 000x).

7. RESULTAT

Resultatet av vårt försök visas i tabell 1 nedan. Genom observation i elektronmikroskop påträffades förekomst av biologiskt material, dock ej några viruspartiklar. Det ser emellertid lovande ut, särskilt eftersom andra åstadkommit detta på liknande sätt.

Tabell 1. Resultatet av de fyra proverna som observerades i elektron mikroskopet. För beskrivning av prover se materialförteckning.

PROV	KONCENTRATION	FÖREKOMST AV VIRUS	FÖREKOMST AV VÄVNAD
1	Ca 55st nematoder i 1 ml vatten	Inget synligt virus	Ingen synlig vävnad
2	Samma prov som ovan, men centrifugerat och koncentrerat.	Inget synligt virus	Vävnad funnen
3	Ca 70st nematoder i 0,25-0,50 ml vatten	Inget synligt virus	Vävnad funnen
4	Samma prov som ovan, men har stått några dagar	Inget synligt virus	Vävnad funnen
5	Samma prov som prov 3, men koncentrerat med Speedvac	Inget synligt virus	Ingen synlig vävnad

8. DISKUSSION

Syftet med detta arbete var att hitta en snabbare och mer ekonomiskt överkomlig diagnostiseringsmetod för virus i nematoder. Det fanns ett antal funderingar som dök upp under arbetets gång om hur detta bäst skulle uppnås. Hur vi bäst skulle finfördela materialet för att få loss viruspartiklarna ur nematoderna var en svår fråga. En annan stor fråga var hur vi skulle koncentrera proverna för att få bästa resultat. Vi funderade också mycket över vilka alternativa metoder man kunde ha använt sig av, t.ex. antikroppar.

Något man måste ha i åtanke när man ska utforma en diagnostiseringsmetod för virusbärande nematoder är att det sällan finns några större mängder stubbrotsnematoder i ett jordprov. För att en diagnostiseringsmetod ska kunna vara användbar i praktiken ska det vara möjligt att hitta viruspartiklar i prover med så lite som 5-6 nematoder i 250g jord (Manduric, 2006, pers. med.).

Vid undersökningen av det första preparatet hittades inget av intresse, inte ens lite vävnad från nematoderna, vilket vi annars hade väntat oss. Det enda som kunde ses var kanske någon bakterie eller liknande. Funderingarna då var: finns det inget virus?, har vi gjort något fel?, fungerar inte metoden?

Eftersom det var okänt om nematoderna i detta preparat innehöll virus, var det omöjligt att säga vad som inte stämde. En tanke var att det första preparatet var för utspätt och viruspartiklarna för utspridda. Därmed kunde det vara aktuellt att koncentrera provet mer. För att kunna koncentrera nematoderna till botten av röret använde vi en centrifug, sedan togs överflödiga vätska bort ur ytan med en automatpipett.

Efter ytterligare koncentrerings fanns det vävnadsrester som kunde beskådas i mikroskopet och något som kanske skulle kunna vara viruspartiklar. En teori vi hade gick ut på att provröret med nematoder först skulle frysas in. Anledningen till detta var att iskristallerna som bildas vid nedfrysning skulle hjälpa till att förstöra nematodernas vävnad. Det skulle förhoppningsvis vara till hjälp när provet finfördelades (Manduric, 2006, pers. med.).

Det kan dock vara så att viruspartiklarna brutits sönder i mindre delar vid infrysningen, vilket skulle försvåra upptäckten av partiklarna i elektronmikroskopet. Det hade gjorts tidigare undersökningar med växtvävnad som tydde på detta (Marttila, 2006, pers. med.).

För att vi skulle få ut mer viruspartiklar beslöt vi oss även för att finfördela provet ytterligare. Trots våra ansträngningar syntes inte en enda viruspartikel i mikroskopet. Det finns en risk att viruspartiklarna, som är väldigt små, var flytande även efter koncentrationen. I så fall kan de ha följt med den vätska vi tagit ut och kasserat. För att komma till rätta med detta problem provade vi att koncentrera preparatet i en annan typ av centrifug (Speedvac) där vätskan i provet evaporeras medan det biologiska materialet blir kvar. Det är önskvärt att det finns lite vätska kvar i provröret för om preparatet torkar helt går det inte att göra någon gridd till elektronmikroskopet. Vårt prov blev för torrt och behövde fuktas upp. Summan blev att vi inte fick något resultat i elektronmikroskopet. Vi hittade varken viruspartiklar eller biologisk vävnad.

I en artikel vi läst, har forskare studerat olika metoder för att identifiera viruspartiklar som extraherats ur insekter. Något vi skulle ha kunnat använda oss av var en metod av Rozas Dennis *et al.* (1999) för att studera dessa viruspartiklar med hjälp av just TEM. De hade utarbetat en metod som innehåller ett antal olika moment där de bland annat frös ner insekter, behandlade dem med buffertar och centrifugerade preparatet i flera steg (). Det ser väldigt lovande ut för vår metod att någon annan har lyckats identifiera viruspartiklar med TEM. Vi tror att det finns mycket lärdom att dra från deras forskning. En förenklad version av deras metod skulle kunna vara ett bra sätt att identifiera TRV i nematoder.

En alternativ metod skulle kunna vara att använda antikroppar för att fler viruspartiklar ska fastna på gridden. Detta kan utföras om gridden först preparerats med en antiserum-lösning. Därefter följer samma metod som för negativ kontrastering. Gridden får ligga i virusprovet och färgas sedan in med en tungmetall (Mendgen, & Lesemann, 1991).

Fördelen med denna metod är som nämnts att viruspartiklarna dras till antikropparna så att det förhoppningsvis blir lättare att upptäcka dem i elektronmikroskopet. Nackdelen med metoden är att det finns många olika stammar av TRV och att alla stammar inte reagerar med samma antikropp. Vilken stam man har, vet man inte förrän den är identifierad. Vet man inte från början vilken stam av viruset man letar efter, kan det vara svårt att veta vilka antikroppar som behövs. Det blir svårt att veta om det saknas viruspartiklar i provet eller om det är fel antikroppar som använts.

9. REFERENSLISTA

Agrios, G.N. (1997). *Plant pathology*, 4th ed. San Diego: Academic Press.

Anonymous (1971). *Nematoder på växter*, LTs förlag, sid. 160.

Banck, A. (1997). Stubby root nematodes, *Trichodorus/Paratrichodorus* spp., in Swedish Agriculture. Alnarp: SLU/Repro.

Brown, D.J.F, Robertson, W.M. & Trudgill, D.L. (1995). Transmission of viruses by plant nematodes. *Ann. Rev. Phytopathol.* 33:223-249.

Campbell N.A, Reece J.B, Mitchell L.G (1999). *Biology*, 5th ed., Menlo Park, Calif., Benjamin/Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman Inc.

Cobb, N. A. (1914). Nematodes and their relationships. *Yearbook Dept. Agric.* Washington, DC: Dept. Agric. 457-490.

Engsbro, B. (1973). Undersøgelser og forsøg vedrørende jordbårne vira, *Tidsskrift for planteavl.* 77: 103-117.

Eriksson, B. (1996). Rostringar i potatis – en översikt. *Svenska växtskyddskonferensen* 37, sid. 185-191.

Forslind, B. (1981). *Elektronmikroskopi teori och praktik*. Stockholm, Almqvist & Wiksell Förlag AB.

Manduric, Sanja, Dr i växtskyddsekologi, Sveriges lantbruksuniversitet, institutionen för växtvetenskap, Alnarp, september – oktober 2006.

Marttila, Salla, Dr i cellbiologi, Sveriges lantbruksuniversitet, institutionen för växtvetenskap, Alnarp, september – oktober 2006.

Matthews, R.E.F. (1981). *Plant Virology*, 2 ed. New York: Academic Press

Mendgen, K. & Lesemann, D.-E. (1991). *Electron Microscopy of Plant Pathogens*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Persson, S. (1968). Nematoder av släktet *Trichodorus* i sydsvenska åkerjordar och deras förmåga att överföra rattlevirus. I: *Statens växtskyddsanstalt*, 14:123, sid.163-199.

Pettersson, M-L. & Åkesson, I. (1998). *Växtskydd i trädgård*. Stockholm: Natur och kultur/LT.

Ploeg, A.T., Brown, D.J.F. & Robinson D.J. (1992). The association between species of *Trichodorus* and *Paratrichodorus* and serotypes of tobacco rattle tobnavirus *Ann. Appl. Biol.* 121, 619-630.

Rozas Dennis. G.S., La Torre, J.L., Muscio, O.A. & Guérin, D.M.A. (2000). Direct methods of detecting picorna-like virus from dead or alive triatomine insects. *Mem inst Oswaldo Cruz*, 95 (3):323-327

Seinhorst, J.W. (1960). The quantitative extraction of nematodes from soil, *Nematologica* 1:249-267.

Svensson, L. (1974). Rostringar på potatis. *Växtskyddsnotiser* 38:8-14

Taylor, C.E. (1978). Plant-parasitic Dorylaimida: Biology and virustransmission. In: Southey, J.F (Ed.) *Plant Nematology*, 3 ed. London: Her Majesty's stationary office, Sid 241.

Taylor, C.E. & Brown, D.J.F. (1997). *Nematode vectors of plant viruses*. Cambridge: University press.

Taylor, C.E. & Robertson, W.M. (1975). Acquisition, retention and transmission of viruses by nematodes. In: *Nematode vectors of plant viruses*. 2:253-276. London & New York: Plenum Press.

Van Hoof, H.A. (1964). Serial transmission of rattle virus by a single male of *Trichodorus pachydermus* Seinhorst, *Nematologica* 10:141-144

<http://sv.wikipedia.org>, 2006-10-25

10. BILAGA

10.1 Materialförteckning

Magnetombländare

Räknekammare

Ljuskroskop

Provrör (Eppendorf)

Morasbott (namn)

Pensel försedd med endast ett strå, används för att fiska upp nematoder med.

Liten glasbägare till förvaring av nematodextrakt

Kyl. (Vid detta försök användes en kyl där temperaturen är 2°C.)

Uranylacetat 1 %

koppargridd, 200 mesh

Griddask

Automatpipett 2-20µl

Petriskål

Nescofilm

Nematodpreparat

Pincett, mycket smal

Elektronmikroskop, Jeol, jem1010

Material till extraktion av nematoder enligt Seinhorstmetoden (Seinhorst, 1960).