

Martina Hudcovicová a Daniel Mihálik

**IMUNOCHEMICKÁ DETEKCIA TOBAMOVÍRUSOV V PAPRIKE
ROČNEJ A V RAJČIAKU JEDLOM**

Metodika pre prax

Centrum výskumu rastlinnej výroby - Výskumný ústav rastlinnej výroby

2012

Metodika vznikla za finančnej podpory MP SR a je výstupom riešenia rezortnej úlohy výskumu a vývoja na roky 2010 – 2012 riešenej v rámci „*Nového modelu vedy a výskumu v rezorte Ministerstva pôdohospodárstva SR*“ : **AGROBIOTECHNOLÓGIE A MOLEKULÁRNA DIAGNOSTIKA OCHORENÍ VYBRANÝCH HOSPODÁRSKY VYZNAMNÝCH PLODÍN (AGROBIOVIR)**

Imunochemická detekcia tobamovírusov v paprike ročnej a v rajčiaku jedlom.

Predmetom metodiky je zavedenie imunochemickej metódy DAS ELISA pre detekciu tobamovírusov TMV a ToMV v paprike ročnej a rajčiaku jedlom na Slovensku, nakoľko tieto vírusy spôsobujú značné ekonomické straty. Metóda je založená na detekcii vírusov pomocou polyklonálnych protilátok špecifických k antigénu vírusu, na ktorý sa naväzujú protilátky s enzýmom vyvolávajúcej farebnú reakciu so substrátom. Aplikácia metodiky predpokladá základné vybavenie imunochemického laboratória. Špecifická a včasná detekcia vírusov umožní účinnú aplikáciu ochranných opatrení a tým pozitívne ovplyvní výnos papriky a rajčiaka. Detekcia TMV a ToMV tiež umožní lepšie hodnotenie odrôd papriky a rajčiaka v odrodových skúškach a pri šľachtení papriky a rajčiaka na rezistenciu voči tobamovírusom.

Metodika je určená orgánom štátnej správy, šľachtiteľským organizáciám a poľnohospodárskej praxi.

Literárny prehľad

Podiel pestovanej plodovej zeleniny na Slovensku tvorí 39% celkovej produkcie pestovanej zeleniny (Štatistický úrad SR, 2006). Paprika ročná (*Capsicum annuum L.*) a rajčiak jedlý (*Solanum lycopersicum L.*) patria z hľadiska agrotechniky a hospodárskeho významu ku strategickým zeleninám na Slovensku aj inde vo svete. Prostredie, v ktorom rastliny žijú je charakterizované určitými vonkajšími podmienkami, ktoré sú pre ich rast, vývoj a rozmnožovanie priaznivé, alebo nepriaznivé. Nepriaznivý vplyv vonkajšieho prostredia môže spomaľovať životné funkcie rastlín, poškodzovať ich jednotlivé orgány, čo v krajnom prípade vedie k odumretiu rastliny. Jedným veľmi dôležitým faktorom ovplyvňujúcim životné pochody papriky a rajčiaka je napadnutie vírusmi rodu *Tobamovirus*.

Tobamovírusy patria medzi najrozšírenejšie vírusy na celom svete, nakoľko majú veľa hostiteľov, sú prenosné mechanicky a mnohé aj semenami, prežívajú v pôde, zvyškoch rastlín atď.. Vyznačujú sa mimoriadne vysokou infekčnosťou a odolnosťou voči vonkajším vplyvom. Napadajú všetky druhy čeľade *Solanaceae*. Príznaky ochorenia sa začínajú prejavovať

zosvetlením žíl listov. Neskôr sa vytvárajú žlté škvrny na listovej čepeli, takže listy nadobúdajú žlté zafarbenie. Intenzita žltnutia listov varíruje od bledej až po citrónovú farbu. Typickými symptómami ochorenia sú mozaiky, u ktorých sa striedajú zelené, žlté a chlorotické oblasti, ktoré sa zafarbujú dohneda a nastáva nekróza. Napadnuté rastliny zaostávajú v raste, sú slabšie olistené, deformujú sa. Kvety vytvorené počas chlorotického štádia z väčšej časti opadávajú. Vytvorené plody sa vyvíjajú pomalšie, deformujú sa. Rastliny postupne odumierajú.

Ochorenia spôsobené tobamovírusmi zapríčiňujú závažné ekonomické straty v pestovaní papriky ročnej a rajčiaka jedlého najmä znížením ich úrody a kvality. Preto je veľmi dôležitá skorá, rýchla a presná diagnostika tohto ochorenia pomocou spoľahlivých metód. Správna identifikácia patogénu je v procese ochrany rastlín najdôležitejším krokom, od ktorého sa odvíjajú následné riešenia. Najbežnejšie používanou sérologickou metódou detekcie vírusových ochorení je ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay), ktorá bola do rastlinnej virológie uvedená už v 70-tych rokoch (Clark a Adams, 1977) a stala sa široko využívanou metódou na detekciu a identifikáciu rastlinných vírusov vrátane tobamovírusov (Sevik a Kose-Tohumcu, 2011 a iní). Jej princípom je schopnosť špecifickej rastlinnej protilátky rozoznať antigén vírusu (väčšinou obalový proteín). Protilátka je naviazaná na steny platničky, do ktorej sa následne pridá vzorka (homogenát z diagnostikovaného rastlinného materiálu). Ak vzorka obsahuje vírus, tak dôjde k naviazaniu vírusového antigénu na protilátku. V ďalšom kroku sa aplikuje sekundárna protilátka nesúca reportérovú molekulu, ktorá sa naviaže na antigén vírusu. Reportérovou molekulou je väčšinou enzým rozkladajúci substrát za zmeny jeho farby. Farebná zmena indikujúca prítomnosť vírusu vo vzorke sa deteguje spektrofotometricky. Kvôli použitiu dvoch protilátok sa táto metóda nazýva aj DAS-ELISA (double antibody sandwich-ELISA). V súčasnosti poznáme viac modifikácií metódy ELISA (indirect-, cocktail-, a iné), no ich spoločnou vlastnosťou je enzýmom sprostredkovaná zmena farby substrátu indikujúca mieru prítomnosti patogénu vo vzorke (Lievens a kol. 2005). Je publikovaných mnoho diagnostických ELISA protokolov, aj pre vírusy z rodu Tobamovirus (napr. Takeuchi a kol. 2000; Sevik a Kose-Tohumcu 2011). Výhodou tejto metódy je jej jednoduchosť, nízke náklady, možnosť testovania veľkého počtu vzoriek a čiastočná automatizácia (Morrison, 1999). Nevýhodou metódy ELISA je možnosť krížovej reakcie medzi jednotlivými tobamovírusmi a ich antisérami, ako aj nižšia citlivosť a presnosť. Preto sa nedávno na detekciu tobamovírusov začali používať aj moderné molekulárne metódy ako sú RT-PCR (Da Silva a kol., 2008; Prakash, 2011), Multiplex RT-PCR (Kumar a kol., 2011), RT-LAMP (Yanhua a kol., 2010) a iné, ktorých výhodou je vysoká špecificita,

presnosť a citlivosť, nevýhodou je často finančná a prístrojová náročnosť a komplikovanejší postup.

Na Slovensku sa problematike tobamovírusov pri paprike ročnej a rajčiaku jedlom zatiaľ nevenovala výraznejšia pozornosť. Cieľom metodiky je zavedenie sérologickej metódy DAS-ELISA na detekciu dvoch najčastejších tobamovírusov - TMV (z angl. tobacco mosaic virus) a ToMV (z angl. tomato mosaic virus) v rastlinách papriky ročnej a rajčiaka jedlého. Predkladaná metodika prináša diagnostický postup využiteľný na monitorovanie zdravotného stavu porastov a osiva papriky a rajčiaka, čo umožňuje pripraviť zásahy smerujúce k ochrane porastov, a tiež pri hodnotení rezistencie genetických zdrojov v procese šľachtenia.

Vlastná metodika

Princíp metódy

DAS ELISA metóda využíva špecifické rastlinné primárne protilátky, ktoré sa naviažu na povrch mikrotitračných buniek, kde následne naväzujú antigén vírusu. Prítomnosť antigénu vírusu je detekovaná naviazaním konjugátu špecifických rastlinných sekundárnych protilátok s enzýmom (alkalickou fosfatázou) na antigén, pričom enzým po pridaní substrátu enzýmu (pNPP) vyvoláva žlté sfarbenie detekovateľné spektrofotometricky pri 405 nm.

Potrebné technické a materiálne vybavenie

- Trecie misky s tĺčkami
- Tekutý dusík – na homogenizáciu rastlinného materiálu
- Skúmavky s objemom 15 ml
- ELISA kity firmy Bioreba na detekciu vírusov TMV a ToMV (polyklonálne protilátky voči izolátu TMV FAL-76 resp. voči izolátu ToMV Dahlemense)
- Vortex
- Centrifúgy s i bez chladienia - separácia molekúl na princípe odstredivej sily
- Automatické mikropipety – na presné dávkovanie roztokov
- Kultivačné zariadenia s reguláciou teploty a pohybu
- ELISA-Reader - zariadenie na kvantitatívne stanovenie imunokomplexov založených na spektrofotometrickej detekcii
- Hlbokomraziace boxy - zariadenia na dlhodobé uskladnenie biologického materiálu

Materiál

Na sérologické testovanie pomocou metódy DAS-ELISA odoberieme listy s príznakmi ochorenia, resp. bez nich ak na testovanej rastline listy s príznakmi nie sú. Priemernú vzorku pripravíme zo šiestich listov odobraných z rôznych častí testovanej rastliny do sterilnej skúmavky. Vzorky až do spracovania uchováваме na ľade, resp. v hlbokomraziacom boxe.

Pracovný postup

Z priemernej listovej vzorky odoberieme 0,1 g a homogenizujeme pomocou tekutého dusíka v sterilných trecích miskách. Homogenizovaný rastlinný materiál prenesieme do sterilnej skúmavky a inkubujeme za občasného vortexovania s 2 ml extrakčného pufru po dobu 3 h na ľade. Nasleduje centrifugácia 5 minút pri 10000 rpm a 4°C. Supernatant - extrakt použijeme na analýzy (každá vzorka v dvoch opakovaníach) podľa pracovného postupu ELISA kitov firmy Bioreba na detekciu prítomnosti vírusov TMV a ToMV:

1. Špecifické rastlinné primárne protilátky (IgG) zriedime 1000x v nanášacom pufri a pridáme 200 µl do každej bunky ELISA platničky. Platničku tesne prekryjeme a vložíme ju do vlhkého boxu. Nasleduje inkubácia pri 4°C cez noc, počas ktorej dôjde k adsorpcii špecifických protilátok na povrch mikrotitračných buniek.

2. Po vyprázdnení buniek bunky premyjeme 3-4 krát premývacím pufrom, odstránime všetku tekutinu vysušením platničky na obrúsky. Do buniek pridáme po 200 µl z extraktu z každej vzorky – všetky vzorky nanášame v dvoch opakovaníach. Ako kontroly použijeme kontrolu pozitívnu a negatívnu dodané výrobcom kitov. Pozitívnu kontrolu použijeme neriedenú a riedenú 1:10, 1:100 a 1:1000. Platničku tesne prekryjeme a vložíme ju do vlhkého boxu. Nasleduje inkubácia pri 4°C cez noc, počas ktorej dôjde k naviazaniu antigénu vírusu na rastlinné protilátky.

3. Platničku premyjeme postupom uvedeným vyššie. Enzýmový konjugát (špecifické rastlinné sekundárne protilátky s naviazaným enzýmom) zriedime 1000x v kojugačnom pufri a pridáme po 200 µl do každej bunky. Platničku tesne prekryjeme a vložíme ju do vlhkého

boxu. Nasleduje inkubácia pri 30°C 5 hodín, počas ktorej dôjde k spájaniu - naviazaniu enzýmom označených sekundárnych protilátok na antigén vírusu.

4. Platničku premyjeme postupom uvedeným vyššie. Substrát p-nitrofenyl fosfát rozpustíme v substrátovom pufrí (1 mg/ml) a pridáme po 200 µl do každej bunky. Nasleduje inkubácia pri izbovej teplote (18-25°C) v tme.

5. Po 30-120 minútach sledujeme reakciu - farebná reakcia indikuje infikované vzorky. Vznik žltého sfarbenia – absorbanciu hodnotíme fotometricky pri 405 nm pomocou zariadenia ELISA reader.

Hodnotenie výsledkov

Ako pozitívne (dokázaná prítomnosť vírusu) hodnotíme tie vzorky, ktorých priemerná absorbancia je vyššia ako 2-násobok priemernej absorbancie negatívnej kontroly (podľa Svoboda a kol., 2006). Bolo dokázané, že hodnoty absorbancie získané ELISou sú ovplyvňované rastovou fázou rastlín, počas ktorej sú vzorky odoberané (Cordoba-Selles a kol., 2007). Pri niektorých vzorkách môže byť zistená krížová reakcia (vzorky pozitívne na oba vírusy), ktorej možnosť uvádza aj výrobca ELISA kitov, nakoľko vírusy TMV a ToMV sú veľmi podobné svojimi charakteristikami, vrátane morfológie, symptómov na hostiteľských rastlinách ako aj polyklonálnych protilátok. Protilátky z kitu na stanovenie TMV vykazujú krížovú reakciu s niektorými izolátmi ToMV a protilátky z kitu na stanovenie ToMV vykazujú krížovú reakciu s TMV a TMGMV (Tobacco mild green mosaic virus). Krížovej reakcii možno predísť použitím vysoko špecifickej monoklonálnej protilátky proti konkrétnemu vírusu (Durante a kol., 2001; Vinayarani a kol., 2011).

Záver

Metodika prináša postup diagnostiky tobamovírusov TMV a ToMV v listoch papriky ročnej a rajčiaka jedlého pomocou sérologickej DAS-ELISA metódy. Stanovovanie vírusových ochorení pri zelenine je nevyhnutnosťou na určenie bezvirózných materiálov v šľachtiteľskom procese ako aj pri zabezpečovaní bezvirózneho osiva. Podľa platných smerníc EÚ je nevyhnutná realizácia takýchto stanovení, zavedením týchto metodík sa zvyšuje konkurencieschopnosť slovenských šľachtiteľov aj v medzinárodnom meradle.

Zoznam najdôležitejšej literatúry

- CLARK, M. F. - ADAMS, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 34, 1977, s. 475-483.
- CORDOBA-SELLES, M. C. –GARCIA-RANDEZ, A. – ALFARO-FERNANDEZ, A. 2007. Seed transmission of Pepino mosaic virus and efficacy of tomato seed disinfection treatments. *Plant Disease*, 91, 2007, s. 1250-1254.
- DA SILVA, R. M. – DE SOUTO, E. R. – PEDROSO, J. C. – ARAKAVA, R. – ALMEIDA, A. M. R. – BARBOZA, A. A. L. – VIDA, J. B. 2008. Detection and identification of TMV infecting tomato under protected cultivation in Paraná state. *Braz. Arch. Biol. technol.*, 51, 5, 2008, s. 903-909.
- DURANTE, K. M. R. – GOMEZ, L. H. – GESZTESI, J. L. – LOPES, J. D. – TAVARES, F. C. A. 2001. Monoclonal antibodies to identify Tomato mosaic tobamovirus (ToMV). *Brazilian Journal of Microbiology*, 32, 2001, s. 240-242.
- KUMAR, S. – UDAYA SHANKAR, A. C. – NAYAKA, S. C. – LUND, O. S. – PRAKASH, H. S. 2011. Detection of Tobacco mosaic virus and Tomato mosaic virus in pepper and tomato by multiplex RT-PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 53, 2011, s. 359-363.
- LIEVENS, B. – GRAUWET, T.J.M.A – CAMMUE, B.P.A. – THOMMA, B.P.H.J. 2005. Recent developments in diagnostics of plant pathogens: A review. *Rec Res Dev Microbiol.* 2005, vol. 9, p: 57-79.
- MORRISON, R. H. 1999. Sampling in seed health testing. *Phytopathology*, 89, 1999, s. 1084-1087.
- SEVIK, M. A. – KOSE-TOHUMCU, E. 2011. The ELISA analysis results in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed health testing for Tobacco mosaic virus. *Žemdirbyste - Agriculture*, 98, 3, 2011, s. 301-306.
- SVOBODA, J. – ČERVENA, G. – RODOVA, J. 2006. First report of Pepper mild mottle virus in pepper seeds produced in the Czech Republic. *Plant Protection Science*, 42, 2006, s. 34-37.
- TAKEUCHI, S. - KAWADA, Y. - OKUNO, T. 2000. Detection of Tobamoviruses from soils by non-precoated indirect ELISA. *J Gen Plant Pathol.* 2000, vol. 66, p. 153-158.
- VINAYARANI, G. – MADHUSUDHAN, K. N. – DEEPAK, S. A. – NIRANJANA, S. R. – PRAKASH, H. S. 2011. Detection of mixed infection of Tobamoviruses in tomato and bell pepper by using RT-PCR and duplex RT-PCR. *Int. J. Plant Pathol.*, 2 (2), 2011, s. 89-95.
- YANHUA, L. – ZHIDE, W. – YUMEI, Q. – JIANMIN, M. – LILI, S. – FENGLONG, W. – JINGUANG, Y. 2010. Rapid detection of tobacco mosaic virus using the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method. *Arch. Virol.*, 155, 2010, s. 1681-1685.