METODICKÁ PRÍRUČKA

Stanovenie vírusu mozaiky rajčiaka modernými molekulárno – biologickými metódami

Táto štúdia vznikla vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Prenos efektívnych postupov selekcie a identifikácie rastlín do šľachtenia ITMS : 26220220142, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja a projektu MP a RR SR 2005 UO 27/050 02 06/050 02 06 a projektu APVV-14-0055

Vypracoval: Daniel Mihálik
Spoluautori: Kraic Ján, Hudcovicová Martina, Mrkvová Michaela, Ondreičková Katarína, Gubišová Marcela, Gubiš Jozef, Klčová Jela, Šliková Svetlana, Hauptvogel Pavol
Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum
Výskumný ústav rastlinnej výroby
Bratislavská cesta 122
921 68 Piešťany

Piešťany, 2015

Obsah

Úvod **6**

Literárny prehľad **7**

Materiál a metódy **36**

Biologický materiál 36

Umelá infekcia rastlín 36

Kultivácia rastlinného materiálu 37

Aplikácia vírusového inokula 37

Príprava polyklonálnej protilátky proti obalovému proteínu(CP) 38

Syntéza ToMV charakteristických oligopeptidov 40

Imunizácia zvieraťa a izolácia protilátky 42

Izolácia proteínových lyzátov z infikovaných rastlín 42

Stanovenie prítomnosti kapsidového proteínu ToMV pomocou imunodetekcie ELISA testom 42

Western blotting analýza 45

Transkriptomika 50

Reverzná PCR, Real-time PCR 50

Záver **57**

Použitá literatúra **58**

Úvod

Negatívny vplyv rastlinných vírusov na celosvetovú poľnohospodársku produkciu je všeobecne známy fakt a hľadanie efektívnych prostriedkov na zmiernenie, či zamedzenie šírenia vírusových nákaz, buď klasickými šľachtiteľskými, alebo modernými metódami génového inžinierstva prispel k vytvoreniu rezistentných odrôd mnohých poľnohospodársky významných plodín. Využitie moderných metód biologického výskumu vo fytopatológii zjednodušuje a zefektívňuje boj proti širokému spektru patogénov, vrátane rastlinných vírusov, boj s vírusovými fytopatogénmi sa opiera o tradičné metódy fytopatológie, akými sú dodržiavanie prísnych karanténnych opatrení, eradikácia infekčných agens, rotácia plodín a využívanie certifikovaného rastlinného materiálu. Diagnostika vírusových ochorení rastlín predstavuje v procese ochrany rastlín významný príspevok. Vizuálne zhodnotenie vonkajších symptómov, tak nahrádzajú sofistikované metódy založené na analýze charakteristických biomakromolekúl a vlastností cieľových vírusov.

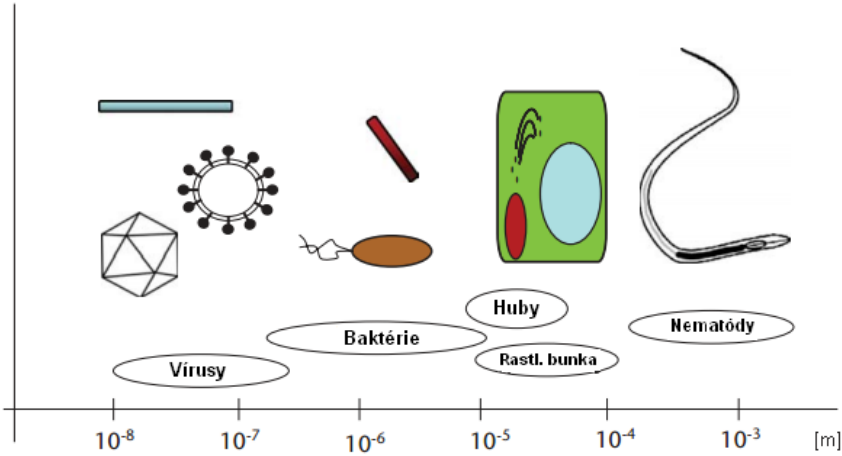
Cielený boj voči rastlinným patogénom je dôležitý najmä z hľadiska zachovania kvality a kvantity poľnohospodárskych výnosov.

Tobamovírusy sú významnou skupinou rastlinných vírusov s vysokým potenciálom patogenicity. Vírus mozaiky rajčiaka patrí medzi najvýznamnejších predstaviteľovi tejto skupiny.

Literárny prehľad

RASTLINNÉ VÍRUSY

Rastlinné vírusy sú nukleoproteínovými časticami, ktoré nie sú schopné samostatnej replikácie. Na svoju reprodukcu využívajú podobne ako všetky ostatné vírusy metabolizmus hostiteľskej bunky. Rastlinné vírusy sa vyskytujú v prirodzených ekosystémoch zahŕňajúcich vodu, pôdu a ovzdušie (Filhart a kol. 1998; Castello a kol. 1999). Predstavujú najmenšie fytopatogény (obr.1). Prvým popísaným vírusom bol rastlinný vírus mozaiky tabaku(TMV), patriaci do skupiny tobamovírusov. V roku 1892 Dmitri Ivanowski dokázal šírenie vírusu z infikovaných rastlín. Ivanowski spoločne s Mayerom svojimi pozorovaniami koncom 80-tych a začiatkom 90-tych rokov 19. storočia začali novú éru štúdia „filtrovateľných častíc spôsobujúcich ochorenie tabaku, ktoré nie sú baktériami, ale tzv. *contagium vivum fluidum*“, ktoré boli neskôr označené ako vírusy (Creager a kol. 1999). TMV sa stal najštudovanejším vírusom a modelovým objektom pri štúdiu iných rastlinných vírusov. Franklina a kol. (1956) odhalili kvartérnu špirálovitú štruktúru viriónu TMV s dutinou vo vnútri, charakteristickú pre celú skupinu tobamovírusov. Prvým kompletne osekvenovaným genómom vírusu bol genóm TMV, patotyp U1 (Goelet a kol. 1982). Jeho porovnaním s ďalšími nukleotidovými sekvenciami iných patotypov TMV bol odhalený striktne organizovaný genóm TMV.

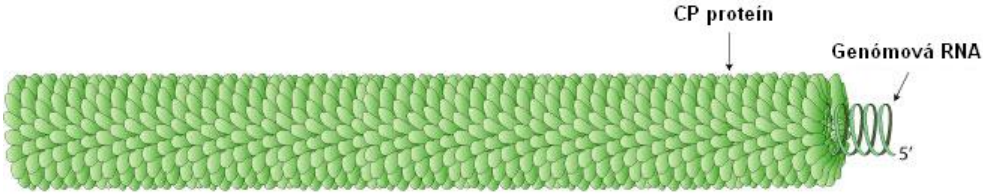


Obr.1 Veľkosti a tvary jednotlivých fytopatogénnych organizmov vo vzťahu k rastlinnej bunke (Rietz a Parker 2007)

TAXONOMICKÁ CHARAKTERISTIKA TOBAMOVÍRUSOV

Tobamovírusy sú významnou skupinou fytopatogénov patriacich do novej rodiny rastlinných vírusov *Virgaviridae*. Názov skupiny je odvodený od latinského *virga*, čo v preklade znamená tyčinka a indikuje morfológiu jej zástupcov. Okrem tobamovírusov táto rodina zahŕňa ďalších päť skupín: furovírusy, hordeivírusy, pecluvírusy, pomovírusy a tobravírusy (Adams a kol. 2009). Spoločnými črtami vírusov sú:

1. prítomnosť “alpha-like“ replikačných proteínov a teda ich príslušnosť k skupine alfavírusov (Koonin a Dolja, 1993; Goldbach a de Haan 1994),
2. organizácia genómu do lineárneho pozitívneho vlákna (+) RNA s t-RNA podobnou štruktúrou na 3'-konci a s metylovaným 5'-koncom RNA
3. tyčinkovité virióny s centrálnym ‘‘kanálom’’ s veľkosťou v priemere 20–25 nm
4. obalové proteíny o veľkosti 19–24 kDa (Obr. 2).

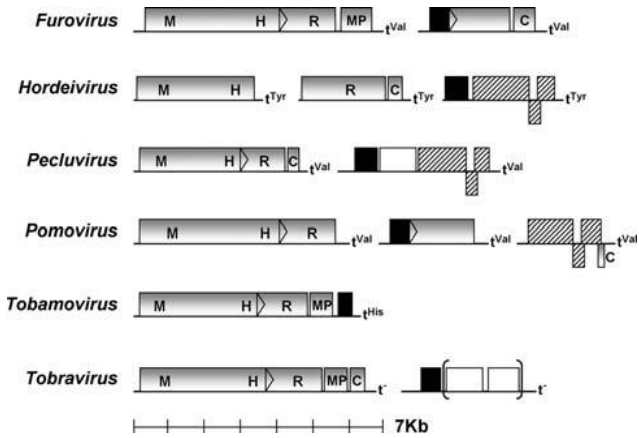


Obr.2 Charakteristický virión zástupcov čeľade *Virgaviridae*
(cit.1 : http://viralzone.expasy.org/all_by_species/51.html,15.11. 2011)

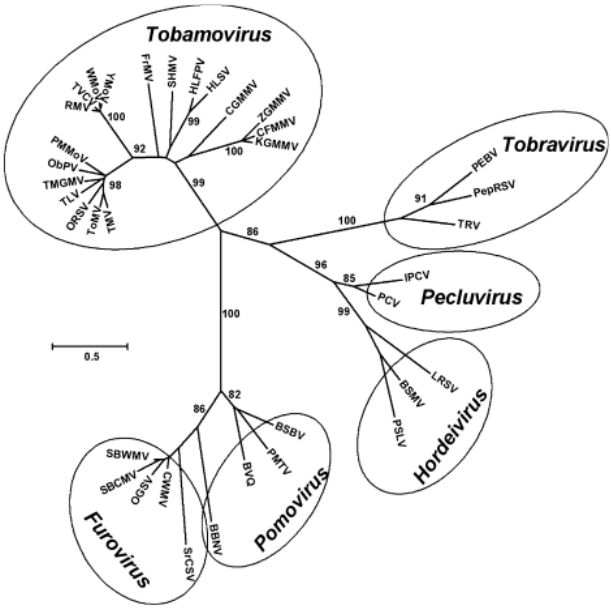
Podľa prítomnosti proteínov, potrebných k transportu vírusu z bunky do bunky hostiteľa,

rozdeľujeme skupinu *Virgaviridae* na podskupiny ‘‘TGB‘‘ a ‘‘30K‘‘. Skratka “TGB“ je odvodená od “triple gene block“ a “30K“ od veľkosti proteínu (30 kDa). Okrem pár výnimiek, všetky genómy alfavírusov majú rovnaké štrukturálne usporiadanie jednotlivých domén do štyroch otvorených čítacích rámcov (ORFs) v tomto poradí: metyltransferáza, helikáza, RNA-závislá RNA polymeráza, gén pre “30K“ proteín, gén pre obalový proteín (CP) a pri TGB skupine blok troch génov pre syntézu “TGB proteínu“. Sekvencie pre syntézu proteínov bohatých na cysteín sú v genóme jednotlivých skupín alfavírusov rozmiestnené nepravidelne (obr.3) (Adams a kol. 2009). Jednotlivé génové sekvencie sú usporiadané buď neprerušene za sebou (tobamovírusy), alebo sú rozdelené do viacerých oddelených genómových segmentov (ostatné skupiny). Tobamovírusy patria do skupiny “30K“ spolu s tobravírusmi a furovírusmi. Charakteristickým znakom tejto podskupiny je celková štrukturálna a sekvenčná príbuznosť ich obalových proteínov (Gibbs 1999). Špecifikom tobamovírusov je, že ako jediné zo skupiny *Virgaviridae* majú v genóme na 3'-konci
t-RNA-podobnú štruktúru aminoacylovanú histidínom. Percentuálne zastúpenie jednotlivých biopolymérov podieľajúcich sa na stavbe viriónu tobamovírusov predstavuje 5% nukleových kyselín a 95% proteínov. Lipidy absentujú z toho dôvodu, že virión tobamovírusov nie je obalený lipidickou schránkou. Táto skupina rastlinných vírusov zahŕňa viacero známych zástupcov. Skupina obsahuje 25 druhov (cit. 2: http://ictvonline.org/virusTaxonomy. asp ?version =2009,

23.1.2012). Pôvodné členenie rodu *Tobamovirus* na jednotlivé druhy bolo založené na aminokyselinovom zložení ich CP proteínov (Tsugita 1962). Vôbec najznámejšími predstaviteľmi rodu sú vírus mozaiky tabaku (TMV) a jemu fylogeneticky najpríbuznejší vírus mozaiky rajčiaku (ToMV) (obr. 4).



Obr.3 Genómová štruktúra jednotlivých rodov čeľade *Virgaviridae* (Adams a kol. 2009)



Obr.4 Fylogenetický strom aminokyselinových sekvencií CP proteínov rodov čeľade *Virgaviridae* (Adams a kol. 2009)

Molekulárna charakteristika tobamovírusov

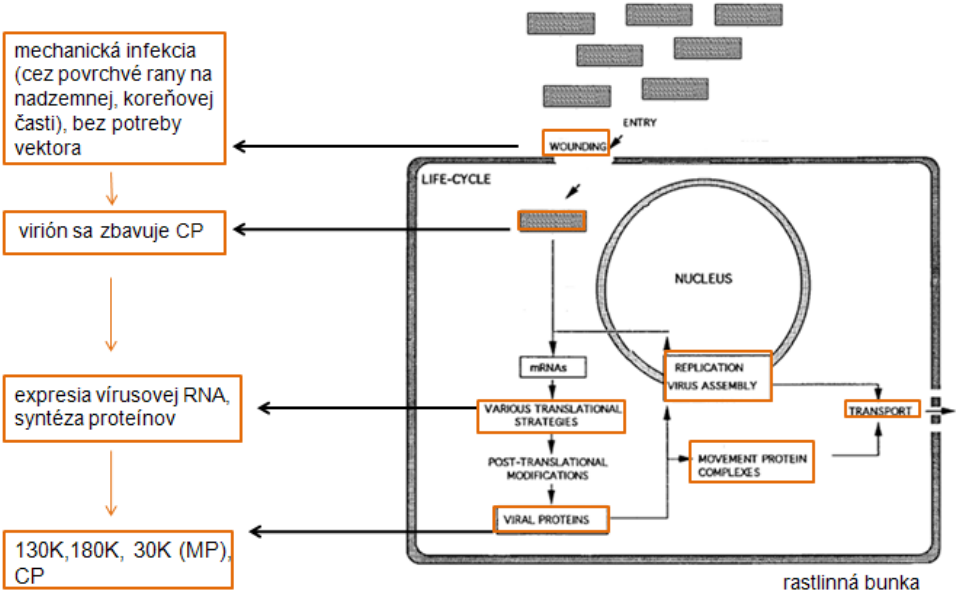
Genóm tobamovírusov pozostáva z molekuly RNA o veľkosti približne 6400 nukleotidov, ktorá kóduje proteíny o rôznej veľkosti (130 kDa - 130K proteín, 180 kDa – 180K proteín, 30 kDa – 30K proteín, CP – obalový proteín) v smere 5'-3'.

Replikuje sa v cytoplazme hostiteľskej bunky prostredníctvom negatívneho (-) vlákna RNA, ktoré je k nej komplementárne. Proteíny 30K a CP sa syntetizujú transláciou príslušných subgenómových (sg) molekúl RNA, ktoré sú 3'-koterminláne s genómovou RNA. Proteíny 130K a 180 majú funkciu tobamovírusovej replikázy a sú exprimované priamo z genómovej RNA a spolu s CP proteínom sa exprimujú nepretržite. Naproti tomu proteín 30K sa exprimuje dočasne, najmä v skorých štádiách infekčného procesu (Palukaitis a Zaitlin, 1986; Watanabe a kol. 1984). Na základe pozorovaní sa zistilo, že pred replikáciou genómovej RNA sa exprimujú iba proteíny 130 K a 180 K, existoval predpoklad ich nevyhnutnosti pri jej replikácii. Na modelovom príklade vírusu ToMV sa však zistilo, že proteín 180 K je schopný zastať všetky funkcie proteínu 130 K. Naopak mutanty s defektným génom pre proteín180 K sa neboli schopné replikácie. Pre efektívnu replikáciu ToMV RNA je nevyhnutná vyvážená expresia oboch proteínov (Ishikawa a Okida 2004). Meshi a kol. (1987) pripravili delečné mutanty vírusov v génoch kódujúcich proteíny 30K a CP. Tento zásah nemal dopad na schopnosť replikácie vírusovej RNA. Prítomnosť týchto dvoch proteínov je potrebná pri úspešnom transporte vírusu z bunky do bunky, respektíve na dlhšie vzdialenosti (Citovsky a Zambryski 1991). Na zabezpečenie systematického, medzibunkového šírenia na krátke vzdialenosti je kľúčovou molekulou 30 K proteín, ktorý sa preto označuje ako “MP-moving protein“. Hoci je tobamovírus pomerne veľký, k medzibunkovému transportu využíva plazmodezmy.

Ich šírka je však pre pasívny transport viriónu tobamovírusu limitujúca (SEL - size exclusion limit - nedostatočný). Funkciou MP proteínu je preto zvýšiť SEL plazmodeziem a umožniť bezproblémový transport vírusu(Wolf a kol. 1989). Na transporte vírusu sa však najväčšou mierou podieľa hostiteľská bunka cytoskeletonom, endomembránovým systémom a interakciou vírusových proteínov s proteínmi hostiteľských buniek. Medzibunkový transport TMV zabezpečujú mikrofilamenty, zatiaľ čo mikrotubuly a s nimi asociované proteíny sú pravdepodobne zodpovedné za degradáciu vírusových MP proteínov (Gillespie a kol. 2002; Kragler a kol. 2003). Funkciu mikrofilamentov pri transporte TMV dokázali aj Liu a kol. (2005), ktorí po ich chemickej depolymerizácii sledovali obmedzenie transportu vírusu, nie však jeho akumuláciu v infikovanej bunke. Okrem toho popísali aj úlohu 130 K proteínu TMV pri transporte vírusu pozdĺž mikrofilamentov. Endomembránový systém endoplazmatického retikula hostiteľskej bunky je zase zodpovedný za transport vírusových MP proteínov k plazmodezmám (Boevink a Oparka 2005). Chen a kol. (2005) demonštrovali, že MP proteín TMV sa viaže na rastlinný proteín kalretikulín, ktorý sa prednostne akumuluje v plazmodezmách (Baluška a kol 1999). Táto interakcia je ďalším dôkazom úspešnej vírusovej manipulácie hostiteľa pre svoju translokáciu naprieč pletivami. TMV sa po dosiahnutí vodivých pletív pasívne transportuje transpiračným a asimilačným prúdom na dlhé vzdialenosti (Lartey a kol. 1998). Transport TMV z bunky do bunky je naopak procesom aktívnym.

Životný cyklus tobamovírusov (obr.5):

1. Penetrácia vírusu do bunky hostiteľa .
2. Uvoľnenie vírusovej molekuly RNA do cytoplazmy hostiteľskej bunky.
3. Expresia genómovej (+) RNA hostiteľským proteosyntetickým aparátom za produkcie dvoch proteínov potrebných pre ďalšiu replikáciu vírusovej RNA.
4. Syntéza jednovláknovej (-) molekuly RNA na základe genómového vlákna (+) RNA, ktoré slúži ako templát .
5. Nová genómová RNA je syntetizovaná na základe mínus (-) vlákna RNA slúžiaceho ako templát, ako aj subgenómových molekúl RNA, ktoré kódujú MP a CP proteíny.
6. Vytvorenie nových vírusových častíc.
7. Šírenie sa z bunky do bunky hostiteľa prostredníctvom plazmodeziem.
8. Mechanický prenos na ďalšieho hostiteľa.

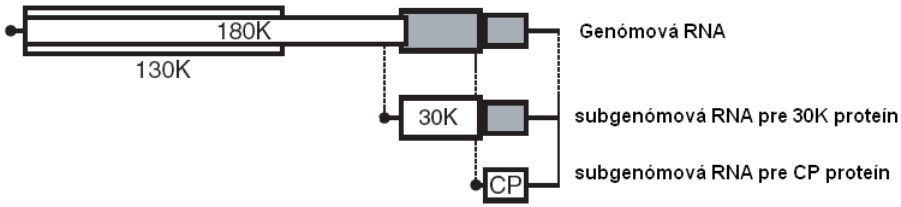


Obr.5 Životný cyklus tobamovírusov (upravené podľa Scholthof a kol. 1993)

CHARAKTERISTIKA ToMV

ToMV je fytopatogénny druh vírusu s celosvetovým výskytom, patriaci do rodu Tobamovirus. Pôvodne bol považovaný za patotyp TMV napádajúci rajčiak, s ktorým má približne 80%-nú homológiu nukleotidovej sekvencie genomickej RNA. Dnes už predstavuje samostatný druh s akronymom ToMV (Lewandowski a Dawson 1999). V roku 1909 ho v americkom Connecticute po prvý krát izoloval Clinton z rajčiaka jedlého (*Lycopersicon esculentum* Mill.), ktorý je jeho prirodzeným hostiteľom. Okrem rajčiaka však infikuje aj široké spektrum iných rastlinných druhov, najmä z čeľadí ľuľkovitých (*Solanaceae*) a mrĺíkovitých (Chenopodiaceae), Patria sem: *Capsicum frutescens*, *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium murale*, *Chenopodium quinoa*, *Datura metel*, *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon pimpinellifolium*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana megalosiphon*, *Nicotiana rustica*, *Nicotiana tabacum*, *Petunia × hybrida*, *Physalis floridana*, *Physalis peruviana*, *Solanum giganteum*, *Solanum melongena*, *Solanum nigrum*. Pre ToMV platia všetky, v predchádzajúcich podkapitolách uvedené, základné molekulárne charakteristiky skupiny tobamovírusov. Jeho genóm tvorí lineárne nesegmentované (+) vlákno RNA pozostávajúce z 6384 nukleotidov s 7-

metylguanozínovou čiapkou na 5'-konci a štruktúrou podobnou t-RNA s aminoacylovaným histidínom na 3'-konci (Komoda a kol. 2007) (Obr. 6). Po prvý krát genomickú RNA ToMV izolovali Mandeles a Bruening (1968). Percentuálny podiel dusíkatých báz v nej zastúpených je: 23% G; 28% A; 19% C; 30% U. ToMV k svojmu šíreniu v prirodzenom prostredí nepotrebuje biotický vektor. Hostiteľ sa infikuje mechanickým kontaktom s infekčným rastlinným materiálom, vodou, pôdou alebo iným zdrojom vírusových častíc, cez rany na povrchu nadzemnej časti rastlín alebo koreňov (Hollings a Huttinga. 1976; Pares a kol. 1992,1996). Takisto sa infekcia môže šíriť semenom (najmä pri rajčiaku), v ktorom vírus prežíva väčšinou na povrchu osemenia, zriedkavo v endosperme, no nikdy nie v embryu. Pri pestovateľských prácach nie je neobvyklý ani prenos vírusu z kontaminovaného náradia, či ľudských rúk. Podobne ako TMV, ToMV je relatívne stabilný vírus a dokáže prekonať nepriaznivé podmienky. V rastlinných zvyškoch prežíva po dobu 2 rokov, 22 mesiacov v koreňových zvyškoch rastlín v pôde ležiacej úhorom a 1 mesiac vo vlhkej pôde (Cerkauskas 2005). Pôda, v ktorej po dlhú dobu ostali infikované zvyšky rastlín, je potenciálnym zdrojom nákazy pre zdravé sadenice. Dlhé obdobia dokáže perzistovať aj v skleníkoch.



Obr.6 Schematická štruktúra genómu ToMV, biele a sivé rámčeky reprezentujú otvorené čítacie rámce, ktoré sa prekladajú a neprekladajú, v tomto poradí (upravené podľa Ishikawa a Okida 2004)

Symptómy spôsobené ToMV

Symptómy ochorenia spôsobené ToMV sa vyskytujú vo všetkých rastových štádiách a postihujú všetky rastlinné orgány. Ide o systémové ochorenie (Matthews 1991). Jednotlivé prejavy, ktoré môžeme sledovať voľným okom, sa líšia v závislosti od virulencie infikujúceho patotypu ToMV, odrody hostiteľa a environmentálnych podmienok (dĺžka dňa, svetelná intenzita, teplota, vzdušná vlhkosť). Pri náchylných druhoch sa môže po infekcii vyskytnúť buď celá škála symptómov, alebo aj žiaden. Vo všeobecnosti však listy infikovaných rastlín majú bledozelené a tmavozelené škvrny vytvárajúce mozaiku (Obr. 7). Bežne dochádza k skrúcaniu mladých listov a je zreteľný rôzny stupeň zakrpatenia rastlín. Ťažko postihnuté listy môžu dokonca svojou morfológiou pripomínať morfológiu listu papradí (Obr. 8). Niektoré ToMV symptómy na listoch sú veľmi podobné účinku fytohormónu 2,4-D. Ďalším možným

symptómom sú tmavé pásiky na stonkách, listových stopkách, listoch alebo plodoch. Postihnuté rastliny majú obvykle nižšiu násadu plodov, na ktorých sa tiež prejavujú špecifické symptómy: hnedé až nekrotické škvrny na nezrelých aj zrelých bobuliach (Obr. 9) a hnednutie oplodia viditeľné na priereze plodom (Obr. 10).

Obr. 7 Charakteristické mozaikovité symptómy na listoch rajčiaka CERKAUSKAS, R.F. 2005. "Tomato Diseases - Tomato Mosaic Virus (ToMV).", *Asian Vegetable Research and Development Center Report, AVRDC Publication 04-609.*

Obr. 8 Poskrúcané listy pripomínajúce morfológiu papradí

CERKAUSKAS, R.F. 2005. "Tomato Diseases - Tomato Mosaic Virus (ToMV).", *Asian Vegetable Research and Development Center Report, AVRDC Publication 04-609*.

Obr. 9 Hnedé škvrny na bobuliach rajčiaka

CERKAUSKAS, R.F. 2005. "Tomato Diseases - Tomato Mosaic Virus (ToMV).", *Asian Vegetable Research and*

Development Center Report, AVRDC Publication 04-609.

Obr. 10 Hnedé lézie na priereze oplodím, CERKAUSKAS, R.F. 2005. "Tomato Diseases - Tomato Mosaic Virus (ToMV).", *Asian Vegetable Research and Development Center Report, AVRDC Publication 04-609*.

Možnosti ochrany a predchádzanie šíreniu ToMV infekcie

Napriek moderným metódam výskumu, voči ToMV stále neexistuje efektívny spôsob chemickej pesticídnej ochrany. Výskum v tejto oblasti samozrejme napreduje a sú k dispozícii rôzne zaujímavé výsledky štúdií, no ich využitie v komerčnej produkcii je zatiaľ z rôznych dôvodov limitované. Vírusové infekcie rastlín vo všeobecnosti nie je možné chemicky eliminovať. Z toho dôvodu je potrebné dodržiavať konvenčné zásady zmierňovania rizika vzniku novej, resp. šírenia existujúcej infekcie. V prípade pestovania rastlín rajčiaka zo semien je nevyhnutné používať iba semená získané zo zdravých rastlín. Pred výsadbou je tiež vhodné ich povrchovo sterilizovať pôsobením vyššej teploty (70 °C po dobu 4 dní, alebo 82-85 °C počas 4 hodín), alebo dôkladným premytím vo vhodnom sterilizačnom roztoku. Kvôli perzistencii vírusu ToMV v pôde je nevyhnutné dodržiavať minimálne dvojročnú rotáciu výsadby rajčiaka jedlého. Po zbere úrody tiež treba zamedziť výsadbe ToMV náchylných druhov hospodárskych rastlín, ktoré by mohli slúžiť ako rezervoár vírusovej infekcie. Pri spozorovaní symptómov a potvrdení infekcie je potrebné ihneď odstrániť infikované jedince. a treba pamätať, že infekcia sa šíri mechanicky. Akýkoľvek kontakt infikovaných rastlín so zdravými je veľkým rizikom (Cerkauskas 2005).

Výskum v oblasti antivírusovej ochrany rastlín sa kontinuálne vyvíja od začiatku 20. storočia. V minulosti sa využívala krížová ochrana sprostredkovaná menej virulentným kmeňom toho istého vírusu. Tento prístup navrhol v roku 1929 McKinney, ktorý dokázal zamedziť superinfekcii rastlín tabaku silne virulentným kmeňom TMV ich predchádzajúcou umelou infekciou miernejším kmeňom TMV (McKinney 1929, Gadani a kol. 1990). Princípom tohto javu je interakcia genetických informácií a proteínov dvoch príbuzných kmeňov toho istého druhu vírusu. Ide však o pomerne nebezpečnú metódu, pri ktorej sa ako ochranný prostriedok používa infekčný materiál, ktorý môže pri iných odrodách toho istého druhu hostiteľa, ale aj okolitých druhoch rastlín, spôsobiť viac škôd ako úžitku.

Určité podobnosti s krížovou ochranou má metóda "rezistencie sprostredkovanej obalovým proteínom vírusu". Nedochádza pri nej ku komplexnej odpovedi spôsobenej replikáciou a expresiou celého vírusového genómu ako pri krížovej ochrane, pretože v hostiteľskej rastline sa exprimuje iba cielenou transgenézou vnesený gén pre obalový proteín (CP) (Beachy 1999). V tomto prípade odpadá potreba priamej vírusovej infekcie rastlín využívaná pri krížovej ochrane a uvedená metóda je z tohto hľadiska bezpečnejšia. Experimentálne vytvorené genotypy rastlín CP^+ a CP^- boli následne podrobené umelej infekcii TMV. Rastliny exprimujúce gén pre obalový proteín (CP^+ variant) vytvorili menej lokálnych a systematických symptómov ochorenia ako CP^- variant. Navyše ELISA metódou v

nich bolo dokázaných iba 30 % z množstva vírusových častíc prítomných v CP^- variante (Nelson a kol. 1987).

Mechanizmus kompetície príbuzných kmeňov vírusov je stále nejasný, no najpodstatnejšiu úlohu v nej zohráva prítomnosť obalového proteínu miernejšieho kmeňa vírusu. Ten obaľuje molekulu RNA virulentnejšieho vírusu a tým zmierňuje patogenézu virózy (Zinnen a Fulton 1986). Ako druhé možné vysvetlenie predpokladal Zaitlin (1976) možnú hybridizáciu molekúl RNA oboch vírusov brániacu správnej replikácii a/alebo translácii nebezpečnejšieho kmeňa.

Ďaľšou z transgénných stratégií tvorby rezistencie rastlín je "replikázou sprostredkovaná rezistencia". Modifikovaná rastlina obohatená a exprimujúca upravený gén kódujúci na RNA-závislú RNA polymerázu vírusu je schopná inhibovať vírusovú replikáciu na mieste inokulácie. Prvýkrát bol takýto spôsob vírusovej rezistencie popísaný pre TMV (Golemboski 1990).

V porovnaní s rezistenciou sprostredkovanou obalovým proteínom alebo replikázou, vírusová rezistencia modifikovaných rastlín produkujúcich dysfunkčný MP (30 K) proteín TMV je omnoho širšia. Znamená to, že efektívnejšie chráni hostiteľa aj pred taxonomicky menej príbuznými druhmi vírusov v porovnaní s predchádzajúcimi dvoma stratégiami (Prins a kol. 2008). Pri tejto ochrannej stratégii je funkcia MP proteínu útočiaceho vírusu, zodpovedného za jeho lokálny a systematický transport v pletive, potlačená dominantne exprimovaným mutantným MP proteínom modifikovaného hostiteľa.

Najnovším príspevkom k palete metód zvýšenia rezistencie voči rastlinným vírusom je metóda “rezistencie sprostredkovanej molekulami RNA“. Dochádza pri nej k inhibičnej komplementácii vírusového genómu s transkriptom transgénu a následným znemožnením jeho expresie (Niu a kol. 2006). Táto metóda je odvodená od “tlmenia RNA molekúl“ (RNA silencing), ktorá je prirodzeným obranným mechanizmom rastlín a iných eukaryontov proti cudzím genetickým elementom, vrátane vírusov. “Utlmenie“ je spôsobené malými interferujúcimi molekulami RNA (siRNAs), ktoré sú vlastne deriváty vírusoveho genómu následne upravované hostiteľskou bunkou do podoby siRNA (Qu a kol. 2007). Vírusovo špecifické molekuly siRNA vlastne predstavujú charakteristický znak prirodzene získanej vírusovej rezistencie.

Vplyv tobamovírusov na uhlíkový metabolizmus hostiteľskej rastliny

Vírusy všeobecne využívajú bunky hostiteľa na dokončenie svojho životného cyklu a vo vzťahu k hostiteľskému organizmu sú preto obligátnymi symbiontmi. Pre náchylné rastliny sa však prítomnosť takéhoto "symbionta" prejaví vypuknutím ochorenia, ktoré sprevádzajú charakteristické príznaky. Takýto vzťah potom z pohľadu hostiteľskej rastliny pomenúvame parazitizmom. Prítomnosť rozmanitých vonkajších symptómov, spôsobených vírusovými

ochoreniami rastlín, svedčí o tom, že nielen navonok, ale aj vo vnútri rastliny dochádza k určitým patofyziologickým javom. Mozaikovité symptómy pri TMV, ToMV a iných vírusoch mozaiky, indikujú negatívny vplyv vírusu na fotosyntetický aparát hostiteľskej rastliny. Malé žily predstavujú väčšinovú žilnatinu listov a sú tvorené rôznymi typmi buniek, ktoré sú druhovo špecifické (Grusak a kol. 1996). Malé žily v listoch sú zodpovedné za transport fotoasimilátov z miesta produkcie na miesto spotreby. Keďže tvoria prevažnú časť listovej žilnatiny, sú potenciálnym miestom vírusovej kolonizácie. Prítomnosť tobamovírusov v listovom pletive zapríčiňuje ultraštrukturálne zmeny infikovaných, najmä mezofylových, buniek. Dezintegrácia chloroplastov, ktorá sa prejavuje ich napuchnutím, dezintegráciou tylakoidov, vretenovitými granami a zhlukovaním plastoglobúl sú typickými prejavmi zmien v listoch s mozaikovitými symptómami (Almási a kol. 2001). Je zrejmé, že kolonizácia a ultraštrukturálne zmeny hostiteľského pletiva narušujú prirodzené fyziologické procesy, ktoré v ňom prebiehajú. Okrem zmien v ultraštruktúre kolonizovaných pletiv, dochádza tiež k zmenám proteómu chloroplastov. Konkrétne bola zaznamenaná znížená expresia fotosyntetických proteínov potrebných pre elektrón-transportný reťazec a Calvinov-Bensonov cyklus (Pineda a kol. 2010).

DIAGNOSTIKA RASTLINNÝCH VÍRUSOV

Fytopatogénne vírusy každoročne spôsobujú enormné škody pri pestovaní dôležitých plodín. Prirodzene sa preto vyvíjajú diagnostické metódy, ktoré dokážu rýchlo a efektívne detegovať prítomnosť vírusu v pletivách hostiteľa a obmedziť vznik a šírenie epidémií. Správna identifikácia patogénu je v procese ochrany rastlín najdôležitejším krokom, od ktorého sa odvíjajú následné riešenia. V bežnej diagnostickej praxi je postačujúce vo vzorke dokázať zástupcu skupiny vírusov, nie konkrétny druh. Pre ďalšie epidemiologické štúdie, určovanie vírusových patotypov a šľachtenie rezistentných odrôd je však taký dôkaz nepostačujúci. V posledných rokoch sa v diagnostike vírusových ochorení aplikujú moderné metódy. Tieto dokážu odhaliť pôvodcu ochorenia so špecificitou omnoho vyššou ako bežne používané sérologické metódy, ktoré boli vyvinuté na detekciu vírusov (Lievens a kol. 2005). Limitujúcim faktorom ich používania je najmä vysoká finančná a technická náročnosť, bežné diagnostické laboratória nie sú schopné tento progres nasledovať. Legislatívne opatrenia v tejto oblasti tiež nepodporujú zavádzanie nových postupov. Stanovené diagnostické schémy často nereflektujú aktuálny stav poznania.

Sérologické metódy

Najbežnejšie používanou sérologickou metódou detekcie vírusových ochorení je *ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)*. Počiatky jej využitia siahajú do

70 rokov minulého storočia (Clark a Adams 1977). Jej princípom je schopnosť 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 tvorbe imunokomplexu. V ďalšom kroku sa aplikuje sekundárna protilátka nesúca reportérovú molekulu, ktorá sa naviaže na primárnu protilátku. 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 modifikácii metódy ELISA (indirect-, coctail-, 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. (Sevik a Kose-Tohumcu 2011; Takeuchi a kol. 2000).

Ďalšími sérologickými metódami detekcie rastlinných vírusov sú *TIBA* (*Tissue-blot immunoassay*) a *DIBA* (*Dot-blot immunoassay*). Pri metóde TIBA sa na nitrocelulózový papier alebo nylonovú membránu priamo nanášajú malé kúsky diagnostikovaného rastlinného materiálu. Odpadá tak izolácia vírusu ako pri metóde ELISA. Vírus sa následne deteguje rôzne značenými protilátkami (Kamenová a Adkins 2004). Metóda DIBA je principiálne podobná predchádzajúcej blotovacej

metóde, na membránu sa však nanáša homogenát z diagnostikovaného materiálu. Jej použite je pri diagnostike rastlinných vírusov bežné (Powell 1987). Spomenuté dve blotovacie metódy sú veľmi rýchle a nenáročné na prístrojové vybavenie, a preto potenciálne použiteľné ako alternatíva ku konvenčnej metóde ELISA.

Metódy založené na analýze nukleových kyselín

Skupina diagnostických metód založená na analýze nukleových kyselín sa v poslednom období rozvíjala najintenzívnejšie. Pretože väčšina rastlinných vírusov má RNA genóm, ich detekcia je realizovaná RNA technikami.

RT-PCR

Pri diagnostike RNA vírusov sa štandardne využíva metóda RT-PCR. Jej princípom je prepis informácie uloženej v RNA do cDNA, pomocou enzýmu reverzná transkriptáza. Vytvorená cDNA sa následne PCR reakciou exponenciálne amplifikuje, na vytvorenie dostatočného množstva DNA, špecifickej pre konkrétny vírus. Tá sa vizualizuje na agarózovom géli alebo špeciálnom zariadení určenom na semikvantitatívnu analýzu (real time PCR). Pre navrhnutie primerov je nevyhnutné poznanie detekovanej sekvencie. Hlavnou výhodou tejto metódy je jej vysoká citlivosť. Pomocou RT-PCR detekcie sa preukázateľne identifikoval tobamovírus v infekčnom semene (Wylie a kol 1993). Postupom času sa vyvinuli rôzne modifikácie tejto metódy, ktoré vylepšili jej

vlastnosti pre diagnostické účely. Medzi jej najčastejšie využívané aplikácie patria tieto:

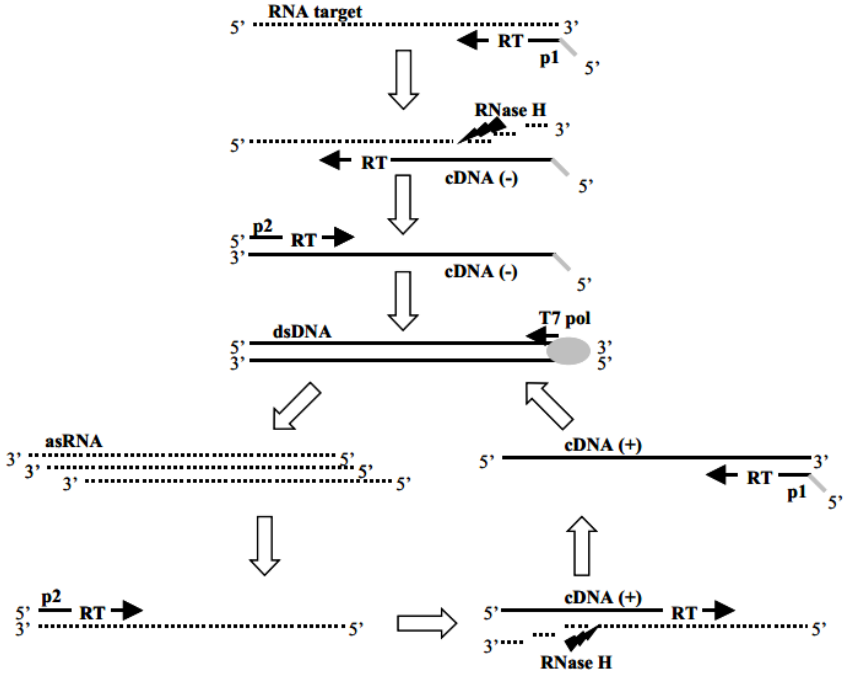
- *multiplex RT-PCR* sa využíva na detekciu viacerých druhov vírusov, resp. odlišných kmeňov toho istého druhu v jednej polymerázovej reakcii. Princíp je rovnaký ako pri jednoduchej, monošpecifickej RT-PCR, len sa do reakčnej zmesi kombinujú viaceré primery charakteristické pre hľadané kmene. Dnes je bežné, že hostiteľ je infikovaný viacerými patogénmi, a toto je spôsob, ako urýchliť a optimalizovať diagnostický proces. Pri tobamovírusoch Jacobi a kol. (1998) vyvinuli multiplex RT-PCR rozlišujúcu TMV a ToMV, ktoré sú si fylogeneticky najpríbuznejšie.

- *RT-PCR-RFLP* sa podobne ako predchádzajúca metóda používa na identifikáciu viacerých, sérologicky príbuzných kmeňov vírusu vo vzorke. Nepoužívajú sa však viaceré páry primerov ako pri multiplex RT PCR, ale cDNA molekuly sa amplifikujú s použitím jedného rodovo špecifického páru. Amplikóny sa potom na základe odlišného rozmiestnenia väzobných miest pre restrikčné enzýmy poštiepia. Fragmenty sa elektroforeticky separujú a určia sa prítomné vírusové kmene. Detekciu piatich sérologicky príbuzných tobamovírusov touto metódou popísali Letschert a kol. (2002).

- *IC-RT-PCR* kombinuje vychytávanie vírusových častíc protilátkami a následnú RT-PCR amplifikáciu vírusovej RNA. Je vhodné ju použiť vtedy, keď infikované pletivá obsahujú nízky titer vírusu resp. inhibítory PCR

AmpliDet RNA

Je metóda, ktorá kombinuje výhody metód NASBA (obr. 11) a Real Time PCR.
NASBA (Nucleic acid sequence based amplification) je izotermická amplifikácia RNA molekúl (vírusové RNA, mRNA, rRNA) pri teplote 41 °C, za použitia oligonukleotidových primerov a enzýmov reverzná transkriptáza, RNáza H a T7 RNA polymeráza (Compton 1991). Finálnym produktom amplifikácie sú jednovláknové molekuly RNA s antisense zmyslom (opačnou polaritou) pôvodnej RNA molekuly, ktoré sa vizualizujú špecificky značenými próbami Northern blotting analýzou.
(Lanciotti a kol. 2001). NASBA je teda sama o sebe plnohodnotnou diagnostickou metódou rastlinných vírusov. Amplikóny sa však dajú kvantitatívne detegovať v reálnom čase špeciálnymi próbami, tzv. molekulárnymi majákmi. Táto aplikácia sa nazýva AmpliDet RNA metóda a jej využitie pri diagnostike fytopatogénov sa taktiež osvedčila (Klerks a kol. 2001, van Beckoven a kol. 2002)



Obr.11 Princíp metódy NASBA (Lievens a kol. 2005)

Microarrays a macroarrays

Okrem konvenčného použitia metód microarrays a macroarrays na stanovenie hladiny expresie génov, ju možno aplikovať aj na identifikáciu génov špecifických pre fytopatogénne organizmy (Boonham a kol. 2002; Lee a kol. 2003). Jednovláknové DNA próby sú pri nich ireverzibilne naviazané na presne vymedzené miesta sklíčka. Takéto sklíčko potom obsahuje veľké množstvo

sekvencií komplementárnych k špecifickým sekvenciám vírusových genómov, a tým umožňuje v jednom kroku simultánne detegovať viaceré fytopatogénne druhy vírusov vo vzorke. Vírusová RNA sa izoluje z infikovaného hostiteľa a následne sa enzymaticky prepíše do molekuly cDNA. Tá sa amplifikuje do potrebného množstva a označí rádioaktívnou alebo fluorescenčnou próbou. Značená cDNA molekula sa denaturuje a komplementárne naviaže na jednovláknovú DNA próbu imobilizovanú na mriežke. Fluorescenčný resp. rádioaktívny signál na konkrétnom mieste mriežky dáva dôkaz o prítomnosti konkrétneho vírusu v rastlinnej vzorke. Táto metóda je veľmi efektívna, no pre detekciu rastlinných vírusov ešte nie sú komerčne dostupné sklíčka s naviazanými nukleotidovými sekvenciami. V prípade záujmu o diagnostiku touto metódou je potrebné si pripraviť sklíčka svojpomocne.

Nepriama diagnostika vírusov špecifickými protilátkami a próbami

Imunolokalizácia a *in situ* hybridizácia

Imunolokalizácia (IHC) a *in situ* hybridizácia (ISH) sú dve ekvivalentné techniky, pri ktorých sa kladie dôraz na lokalizáciu vírusu v rastlinnom pletive. Imunolokalizáciou sa detegujú vírusové proteíny a *in situ* hybridizáciou vírusové nukleové kyseliny (Maule a Havelda 2008).Výhoda oboch metód spočíva v ich špecificite k cieľovým molekulám. Pri imunolokalizácií je rozhodujúcim krokom schopnosť rozpoznania

vírusového antigénu primárnou protilátkou (Herman 2000). Rozlišujeme monoklonálne a polyklonálne protilátky. Monoklonálna protilátka je vysoko špecifická a rozpoznáva iba jeden typ epitopu v antigéne. To môže byť niekedy problémom, pretože pri fixácií rastlinného materiálu dochádza k prekrytiu niektorých epitopov. Polyklonálna protilátka rozpoznáva viaceré epitopy antigénu, čo rieši spomenutý problém, avšak zvyšuje riziko nešpecifického naviazania. Pred samotným nanášaním protilátok na rastlinný materiál je potrebné enzymaticky (pektinázou) obnažiť antigénové determinanty Vhodný titer a špecificita primárnej protilátky sa zvyčajne určuje metódou ELISA, Western blotting analýzou a inými. Na primárnu protilátku sa v nasledujúcom kroku viaže sekundárna protilátka, ktorá je špecificky fluorescenčne, alebo enzymaticky značená. Sekundárna protilátka sa volí podľa druhu zvieraťa, v ktorom bola protilátka vytvorená. Výsledný signál sa sleduje fluorescenčným mikroskopom. Pri *in situ* hybridizácii sa špecifická vírusová RNA sekvencia lokalizuje prostredníctvom jej hybridizácie s antisense RNA. Pripravená ribopróba je značená buď fluorescenčne (FISH) resp. digoxigenínom.

Western Blotting analýza

Je analytická metóda, ktorá sa využíva na detekciu špecifických proteínov v biologickej vzorke (Burnette 1981). Pomocou SDS-PAGE elektroforetickej separácie sa izolované bielkoviny najprv separujú na základe ich molekulovej hmotnosti. V nasledujúcom kroku sa transferujú na membránu, ktorá sa inkubuje s roztokmi

primárnej a sekundárnej protilátky. Špecifickú väzbu proteínu, primárnej a sekundárnej protilátky môžeme detegovať na základe toho, akým spôsobom je značená sekundárna protilátka. Najčastejšie detekčné spôsoby sú chemiluminiscenčné, fluorescenčné alebo rádioaktívne. Keďže vírusy sú nukleoproteínové častice a za ich antigenicitu sú zodpovedné kapsidové proteíny, touto metódou je možné diagnostikovať aj prítomnosť konkrétneho vírusu vo vzorke. (Hess 2004).

MATERIÁL A METÓDY

BIOLOGICKÝ MATERIÁL

Ako východiskový materiál pre umelú infekciu rastlín sme použili vírus mozaiky rajčiaka (izolát ToMV PV-0135) zo zbierky Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, SRN). Infikovali sa klíčence rastlín rajčiaka jedlého (*Lycopersicon esculentum* Mill.), ktoré nám zo svojho šľachtiteľského materiálu poskytla spoločnosť Zelseed s.r.o., Horná Potôň.

Umelá infekcia rastlín

1. Príprava vírusového inokula ToMV, PV-0135 (DSMZ)

V sterilnej trecej miske sa homogenizuje inokulum obsahujúce vírus ToMV PV-0135. Po rozdrvení listovej biomasy na zelený prášok (7-10mg) resuspenduje v 2ml Norit pufru.

Zloženie Norit-pufru:

- 0,05M Na/K $(PO_4)_3$, pufor s pH 7.0
- 1mM EDTA, 5mM DIECA,
- 5mM kyselina tioglykolová

Alikvóty obsahujúce vírusové inokulum uskladníme pri -20°C

Kultivácia rastlinného materiálu

Semená získané zo spoločnosti Zelseed s.r.o. budeme vysievať do klasických 12 cm plastových nádob s vhodným substrátom. Rastliny predpestujeme v skleníku a potom ich premiestnime do kontrolovaných podmienok rastovej komory, kde bude kultivácia prebiehať pri 16 hodinovej fotoperióde (16 hodín svetlo/8 hodín tma), teplote 24-25 °C a intenzite svetla 152 µmol m^{-2} s^{-1} FAR po dobu 30 dní.

Aplikácia vírusového inokula

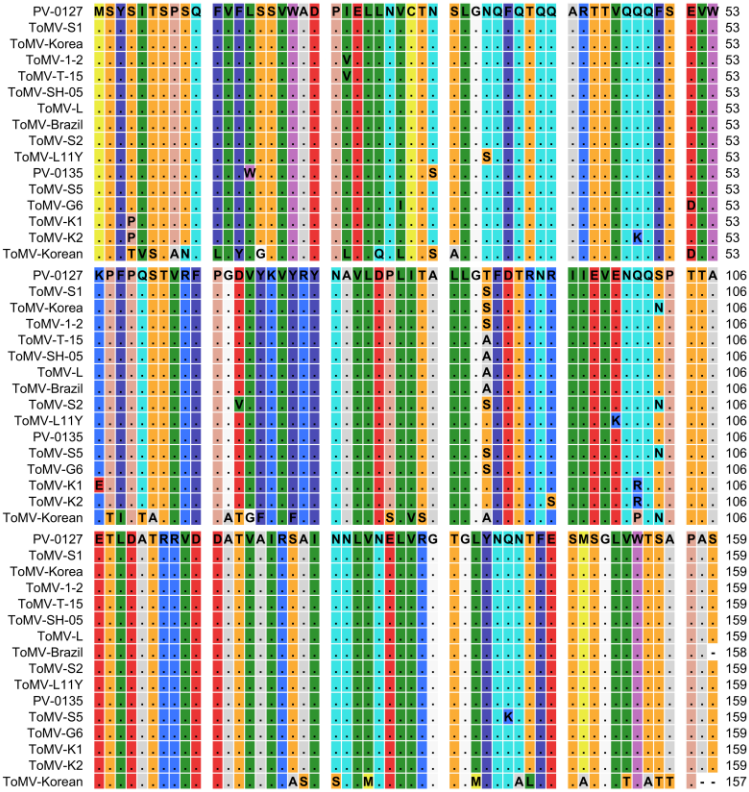
Rastliny určené na umelú infekciu sa mechanicky poškodia prostredníctvom karborunda, čím sa narušia povrchové pletivá listu a tak sa uľahčí penetrácia vírusu štruktúr rastliny. Na jeden list sa nanáša 20µl inokula. Po 20 minútach sa rastliny opláchnu sterilnou dH_2O tak, aby sa zmylo prebytočné a karborundum. Po inokuláci sa rastliny kultivujú a pravidelne sa sledujú symptómy.

Infikované rastliny kultivujeme v rastových komorách pri 16 hodinovej fotoperióde (16 hodín svetlo/8 hodín tma), teplote 24-25 °C a intenzite svetla 152 μmol m^{-2} s^{-1} FAR.

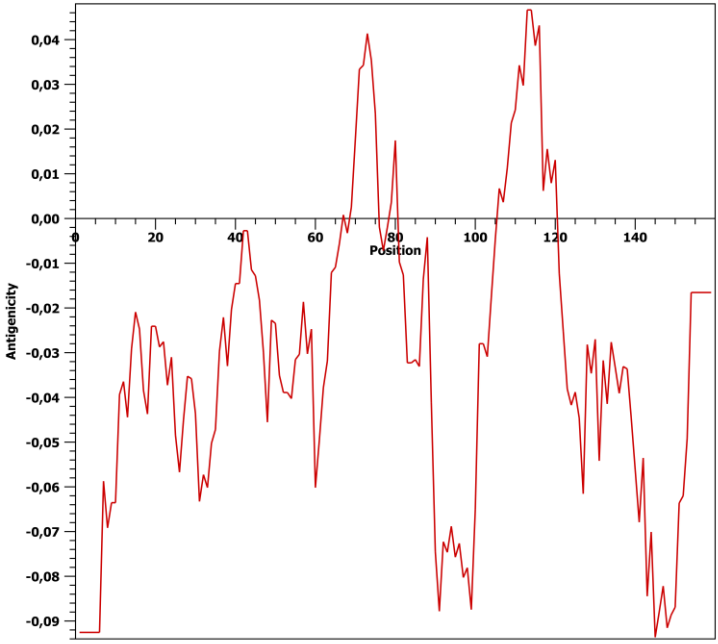
Príprava polyklonálnej protilátky proti obalovému proteínu (CP)

Softvérová analýza obalových CP proteínov ToMV

Vo verejne prístupných databázach GenBank, The UniProt Knowledgebase (UniProtKB) vyhľadáme sekvencie všetkých publikovaných obalových (CP) proteínov rôznych patotypov ToMV. Následne stiahneme získané informácie do súboru vo formáte FASTA. Prostredníctvom softvéru CLC Main Workbench analyzujeme a vyhodnotíme stiahnutý súbor sekvencií. Prostredníctvom softvéru určíme oligopeptidové sekvencie vykazujúce antigenicitný potenciál.



Porovnanie vybratých polypetidov obalových proteínov ToMV.



Antigenicitný profil obalového proteínu patotypu PV-0135 ToMV.

Syntéza ToMV charakteristických oligopeptidov

Na základe softvérovo vyhodnotených informácií pripravíme dva až tri krátke (15-20 aminokyselinové) oligopeptidové fragmenty, ktoré majú najvyšší koeficient antigenicity. Tieto fragmenty poslúžia na imunizáciu pokusného zvieraťa v nasledujúcom kroku prípravy polyklonálnej protilátky.

Pre obalový proteín patotypu PV-0135 ToMV boli navrhnuté nasledovné oligopeptidy:

Epi 1:

NH2 – RFPGDVYKVYRYNAVLDC-COOH

Epi 2:

NH2-CESMSGLVWTSAPAS-COOH

Epitopy obalového proteínu patotypu PV-0135 ToMV

Uvedené antigénové determinanty boli modifikované buď na N-konci alebo C-konci peptidu cysteínom, aby zvýšili svoju antigenicitu, z dôvodu čo najvyššej imunochemickej odozvy boli takto modifikované epitopy konjugované na ovalbumín, resp. na KLH (keyhole limpet hemocyanin) proteín.

Imunizácia zvieraťa a izolácia protilátky

Tento krok sa vykoná na pracovisku, ktoré spĺňa požiadavky práce so živými pokusnými zvieratami, a taktiež vysoko sterilné podmienky pre prípravu protilátok. Pracovisku poskytneme epitopy oligopeptidov.

Izolácia proteínových lyzátov z infikovaných rastlín

Z infikovaných a kontrolných rastlín rajčiaka vyizolujeme celkové proteíny pomocou P-PER Plant Protein Extraction KIT (kat.č. 89803, Pierce, USA) ktorý je kompatibilný s enzymatickými technikami. Koncentrácia proteínov zmeriame spektrofotometricky, pomocou BCA protein assay kit (kat.č. 23225, Pierce, USA).

Stanovenie prítomnosti kapsidového proteínu ToMV pomocou imunodetekcie ELISA testom

1. Pripravenú polyklonálnu protilátku nariedime v pomere 1:10, resp. 1:100, 1:1000 v závislosti od

koncentrácie protilátky. Primárnu polyklonálnu protilátku nariedime pufrom nasledovného zloženia:

- 50 mM Na_2CO_3
- 50 mM $NaHCO_3$
- 0,02 % NaN_3
- pH 9.6

200 µl primárnej protilátky sa naväzuje na platničku (96 well Nunc Imuno Plates MaxiSorp f96) buď 4 hodiny pri 30°C alebo cez noc pri 4-6°C.

2. Vyklopením a súčasným zliatím odstránite roztok z jamiek. Nenaviazanú protilátku odstránime 2x premytím jamiek rozkom 1xPBS – Tween. Výsledný roztok ma nasledovné zloženie:

- 10 mM fosfátový tlmivý roztok (KH_2PO_4/Na_2HPO_4)
- 140 mM NaCl
- 3 mM KCl
- 0.05% Tween 20

3. Po vymytí jamiek sa nanesú jednotlivé vzorky, proteínové lyzáty (s presne stanovenou koncentráciou proteínov, odporúča sa približne rovnaká koncentrácia a celkové množstvo proteínu na jamku by malo byť 100

μg) nariedené na objem 200 μl extrakčným pufrom. Zloženie extrakčného pufru:

- 10 mM fosfátový tlmivý roztok (KH_2PO_4/Na_2HPO_4)
- 140 mM NaCl
- 3 mM KCl
- 0.05% Tween 20
- 2% PVP(PVP-15 polyvinylpyrrolidone)

Inkubácia prebieha cez noc pri 4°C.

4. Nasleduje vyklopenie a vymytie reakčnej zmesi. Každá jamka sa premyje 3x 200 μl roztokom 1xPBS – Tween.

5. Pridajte sekundárnu protilátku, odporúčame Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, AP conjugate (Pierce, kat.č.31340). Samozrejme, druh hostiteľského organizmu produkujúceho sekundárnu protilátku musí byť odlišný od hostiteľského druhu produkujúceho primárnu protilátku. Riedenie sekundárnej protilátky sa pohybuje v rozsahu 1:2 – 10000. Riediacim roztokom je tlmivý roztok nasledovného zloženia:

- 10 mM fosfátový tlmivý roztok (KH_2PO_4/Na_2HPO_4)
- 140 mM NaCl

- 3 mM KCl
- 0.05% Tween 20
- 2% PVP(PVP-15 polyvinylpyrrolidone)
- 0,2% egg albumin (Sigma A-5253)

Nasleduje inkubácia 2 – 4 hodiny pri 37°C.

6. Nasleduje vyklopenie a vymytie reakčnej zmesi. Každá jamka sa premyje 3x 200 µl roztokom 1xPBS – Tween

7. Pridajte 100 µl roztoku PNPP((p-nitrophenyl phosphate disodium salt, Pierce, kat. č. 37620) do každej jamky. Platnička sa inkubuje približne do sfarbenia susbstrátu, približne 30 minút.

8. Reakciu zastavíte pridaním 50 µl 2N NaOH do každej jamky.

9. Nasleduje meranie absorbancie pri 405 nm, špeciálnym spektrofotometrom tzv. ELISA readerom.

Western blotting analýza

1. Bunkové lyzáty separujeme pomocou SDS-PAGE a Western blotting analýzu vykonáme podľa Wan a kol. (2000), s tým rozdielom, že ako primárna protilátku použijeme anti-coat protein ToMV (na

základe nami navrhnutých epitopov), ktorá by mala rozpoznávať obalový proteín ToMV vírusu.

2. Vzorky zhomogenizujeme pomocou kvapalného dusíka a pridáme k nim lytický roztok obsahujúci (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0.02% NaN_3,
   0.1 % SDS, 1 $\mu g.ml^{-1}$ Aprotinin, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholát sodný, 100 $\mu g.ml^{-1}$ PMSF). Homogenáty opracujeme ultrazvukom pomocou prístroja Sonoplus HD-2070 (Bandelin, SRN), 5-krát v 2 sekundových intervaloch pri 50% výkone prístroja, vzorky sa rozdelia do alikvótov. Vo vzorkách spektrofotometricky zmeriame koncentráciu proteínov pri 562 nm na spektrofotometri Jenway (Genova, SRN) pomocou BCA, protein assay (Pierce, USA). Takto pripravené vzorky nanesieme na polyakrylamidový gél.

3. Proteíny separujeme v polyakrylmidovom géli obsahujúcom denaturačné činidlo dodecylsulfát sodný (SDS). Vzorky obsahujúce 50 µg celkových proteínov denaturujeme 5 minút pri 100°C vo vodnom kúpeli. Ku každej vzorke pred denaturáciou pridáme nanášací pufor, zásobný roztok 5x nanášacieho pufru, ktorý má nasledovné zloženie (10% SDS, 1 M Tris-HCl, pH 6.8, 14,3 M β-merkaptoetanol, 2 $mg.ml^{-1}$ Bromphenolblue, 6 g/10 ml, 75 ml močovina).

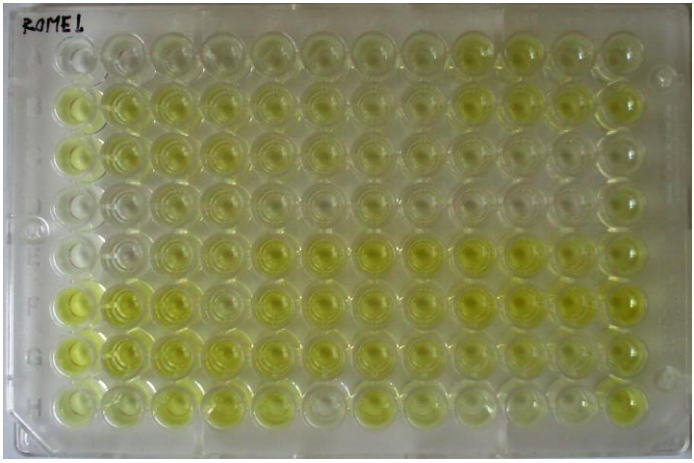
4. Vzorky nanesieme do zahusťovacieho 5% polykrylamidového gélu a následne separujeme v 10%, alebo 12% polyakrylamidovom géle za použitia elektroforetického pufru (Laemmli,1970). Elektroforetické delenie prebehne v aparatúre Miniprotean 3 Cell, Complete System (BioRad, USA), ako zdroj jednosmerného napätia použijeme Consort Mini E132 (Sigma Aldrich, USA).

5. Po SDS-PAGE, gél obsahujúci separované proteíny budeme inkubovať 3x5 minút v transferovom pufri pH 8,3 (39 mM glycín, 48 mM Tris, 0,037% SDS, 20% metanol). Na transfer použijeme nitrocelulózovú membránu (Amersham, USA), aparatúra Mini Trans-Blot Module (BioRad, USA) a zdroj jednosmerného napätia Consort Mini E132 (Sigma Aldrich, USA).

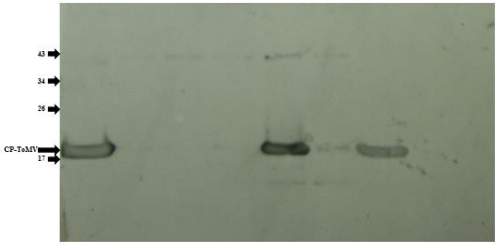
6. Proteíny naviazané na membráne necháme inkubovať s blokovacím roztokom (5% sušené mlieko, 2,5% inaktivované fetal calf serum, 97,5 ml roztoku TBS/Tween-20) 30 minút pri 37 °C za jemného miešania. TBS/Tween-20, pH 7,4 (8,76% NaCl, 1,212%, 0,5% Tween-20).

7. Pracovnú koncentrácia primárnej protilátky zoptimalizujeme, odporúčame štartovať riedením 1:500. Ako sekundárnu protilátku použijeme ECL Rabbit IgG, HRP-Linked $F(ab')_2$ Fragment (from donkey) (Amersham, Piscataway, NJ, USA),

v riedení 1:4000, ostatné roztoky a detekcia imunokomplexov vykonáme podľa (Schaefer a kol. 2005). Ako marker veľkosti molekulovej hmotnosti použijeme PageRuler™Plus prestained protein ladder (Fermentas, St.Leon-Rot, SRN).



Detekcia kapsidového proteínu vírusu mozaiky(PV – 0135 ToMV) prostredníctvom polyklonálnej protilátky



Detekcia kapsidového proteínu ToMV (PV-0135) prostredníctvom western blottingu

Transkriptomika

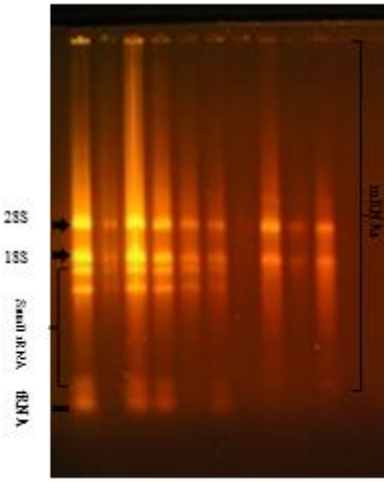
Reverzná PCR, Real-time PCR

1. Izolácia celkovej RNA

   RNA vyizolujeme z 1g rastlinných pletív prostredníctvom dvoch metodických postupov, prvým postupom bude izolácia prostredníctvom Trizol reagentu (Invitrogen, USA), druhým postupom bude izolácia komerčným kitom NucleoSpin RNA Plant (Macherey-Nagel, SRN).

2. Izolácia RNA prostredníctvom Trizol reagentu

   Rastlinný materiál zhomogenizujeme prostredníctvom kvapalného dusíka. Zhomogenizované pletivo extrahujeme pomocou Trizol reagentu a chloroformu, po centrifugácii odoberieme polárnnu fázu obsahujúcu RNA a precipitujeme ju vychladeným izopropanolom prostredníctvom centrifugácie. Proteínovú frakciu odstránime precipitáciou 75% etanolom. RNA sa rozpustí a kontaminanty genómovej DNA odstránime enzymatickou reakciou katalyzovanou DNázou I. Kvalitu RNA posúdime pomocou gélovej elektroforézy na základe celistvosti ribozomálnych RNA.



Kontrola integrity izolovanej totálnej RNA

3. Príprava reverzných transkriptov

K roztoku RNA pridáme enzým reverzná trasnkriptáza (RNA závislá DNA polymaráza), primer oligo dT, dNTP, RN-ázové inhibítory, reakcia prebieha pri 42°C a ukončí sa denaturáciou enzýmu pri 70 °C.

4. Semikvantitatívna polymerázová reťazová reakcia, real-time PCR

A. Navrhnutie primerov

Základom každej PCR a real time PCR je nevyhnutná štúdium a vykonanie analýzy skúmaných sekvencií nukleových kyselín. Sekvencia patotypu vírusu mozaiky rajčiaka PV-0135 je depozitovaná v databáze Genbank pod kódom AJ429084 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/5809676?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=2&RID=G8FHDRR801R).

```
ATGTCTTACTCAATCACTTCTCCATCGCAATT
TGTATTTTGGTCATCTGTATGGGCTGACCCTA
TAGAATTGTTAAATGTTTGTACAAGTTCGTTA
GGTAACCAGTTTCAAACACAGCAAGCAAGAAC
TACTGTTCAACAGCAGTTCAGCGAGGTGTGGA
AACCTTTCCCTCAAAGCACCGTCAGATTTCCT
GGCGATGTTTATAAGGTGTATAGGTATAATGC
AGTTTTAGATCCTCTAATTACCGCGTTGCTGG
GGACTTTCGATACTAGGAATAGAATAATCGAA
GTAGAAAACCAGCAGAGTCCGACAACAGCTGA
AACGTTAGATGCTACCCGCAGGGTAGACGACG
CTACGGTTGCAATCCGGTCTGCTATAAATAAT
TTAGTTAATGAACTAGTAAGAGGTACTGGACT
GTACAATCAGAATACTTTTGAAAGTATGTCTG
GGTTGGTCTGGACCTCTGCACCTGCATCTTAA
```

Porovnanie všetkých dostupných sekvencií mRNA kódujúcich obalový proteín ToMV

Pre úspešnú analýzu pomocou real time PCR je nevyhnutné, aby veľkosť amplifikovaného fragmentu génu bola v rozsahu 60 – 150 bp. Navrhnite primery

pomocou dostupných molekulárno – biologických softvérov. Primery pre real-time PCR:

Forward: 5´- CAGATTTCCTGGCGATGTTT-3´

Reverse: 5´- TCGGACTCTGCTGGTTTTCT-3´

Veľkosť amplikónu: 128 bp

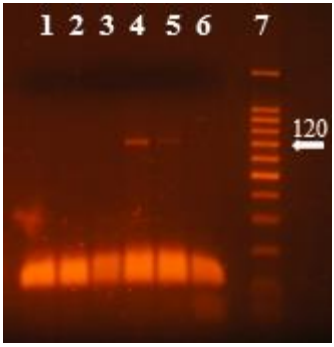
Real time PCR patrí medzi finančne náročné analýzy, preto je nevyhnutné overiť funkčnosť navrhnutých primerov a reakčných podmienok prostredníctvom klasickej PCR. Zloženie reakčnej zmesi je nasledovné:

komponent	**Master Mix for 1 reaction[µL]**	**Master Mix for 7reaction [µL]**
Sterile ddH_2O	14,2	99,4
10xPCR buffer	2	14
25mM $MgCl_2$ (final 2mM)	1,2	8,4
Primer Forward- ToMV-1F (1:10), 10pmol/µL	1	7
Primer Reverse- ToMV-1R (1:10), 10pmol/µL	1	7
10mM dNTP mix(final 0,2mM for each dNTP)	0,4	2,8
HotStar Taq(5U/µL)	0,2	1,4
RT	1	-

Amplifikačný cyklus a reakčné teploty:

95°C, 15min [(94°C-30sec,**50-62-60sec**,72°C-90sec)x40, 72°C-7min,očakávaná veľkosť produktu:128 bp

Ako templát sa využila pozitívna kontrola – reverzný transkript vírusu mozaiky rajčiaka, patotyp PV – 0135. Množstvo analyzovaného templátu bolo 20 ng. Množstvo templátovej nukleovej kyseliny bolo merané spektrofotometricky. Na separáciu fragmentov použite 1% agarózový gél, pri podmienkach 10v/cm vzdialenosti medzi elektródami.Výsledkok PCR overíme prostredníctvom klasickej agarózovej elektroforézy:



Dráha	1	2	3	4	5	6	7
Vzorka	Pozitívna kontrola						Ladder
Primer	ToMV						10bp Promega
Annealing Teplota[°C]	50	51,8	53,1	54,2	56,2	59,3	-

V uvedenom prípade boli najvhodnejšie podmienky reakcie pre detekciu fragmentu génu kódujúceho ToMV v dráhe č.4.

Metóda slúži na kvantifikáciu produktov polymerázovej reťazovej reakcie v reálnom čase. Real-time PCR, ktorej základom detekcie je fluorescenčný signál produkovaný úmerne počas amplifikácie PCR produktu, poskytuje rýchlu a presnú metódu pre determináciu špecifických DNA a RNA sekvencií. Real-time PCR vykonáme na prístroji ABI PRISM® 7000 od firmy Applied Biosystems pomocou „SYBR® Green“ farbičky (SYBR® Green I Masters Mix). Pri optimalizácii koncentrácie primerov použitých v real-time PCR vyskúšame 3 rôzne koncentrácie, a to 50, 500 a 1000 nM primeru na reakciu. Tieto koncentrácie primerov preveríme na kalibračnej krivke, kde ako štandardy použijeme rôzne množstvá vstupnej DNA (napr. 2,5; 25; 250; 2500 a 25000 pg). Najvhodnejšia koncentrácia primeru bude s najvyšším korelačným koeficientom kalibračnej krivky a správnosť výsledkov overíme prostredníctvom disociačnej krivky. Amplifikáciu rôzneho množstva vstupnej DNA overíme v agarózovom géli. Po ukončení optimalizácie real-time PCR reakcie pristúpime ku kvantifikácii neznámych vzoriek.

Záver

Predstavená metodická príručka je návodom na dôkaz prítomnosti rastlinného vírusu na genomickej, transkriptomickej a proteomickej úrovni. Hoci vírus mozaiky rajčiaka jedlého patrí medzi pomerne dosť preštudované vírusy, komerčne dostupná diagnostika je založená na detekcii prostredníctvom rôznych ELISA testov, ktoré majú nízku špecificitu s vysokým podielom falošných signálov. Prezentovaná metodická príručka predstavuje riešenie pre elimináciu falošných výsledkov a vieryhodnosť dosiahnutých v ELISA teste je podporená na transkriptomickej úrovni formou real time PCR reverzných transkriptov a na proteomickej úrovni pomocou vysokošpecifickej imunodetekcie prostredníctvom western blotting analýzy. Táto metodická príručka môže slúžiť ako algoritmus pre detekciu akéhokoľvek rastlinného vírusu, ktorého podstata je kódovaná na úrovni RNA. Táto štúdia vznikla vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Prenos efektívnych postupov selekcie a identifikácie rastlín do šľachtenia ITMS : 26220220142, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja a projektu MP a RR SR 2005 UO 27/050 02 06/050 02 06 a projektu APVV-14-0055.

Použitá literatúra

ADAMS, M.J. – ANTONIW, J.F. – KREUZE, J. 2009. Virgaviridae: a new family of rod-shaped plant viruses. *Arch Virol* 2009, vol. 154, p. 1967–1972.

ALAMÁSI, A - .HARSÁNYI, A. – GÁBORJÁNYI, A. 2001. Photosyntetic alterations of virus infected plants. *Acta Phytopathol Hun.* 2001, vol. 36, p. 15-29.

BALUŠKA, F – ŠAMAJ, J – NAPIER, R - VOLKMANN, D.1999. Maize calreticulin localizes preferentially to plasmodesmata in root apex. *Plant J.*1999, vol. 19, p 481–488.

BOEVINK, P – OPARKA, K.J. 2005. Virus-host interactions during movement process. *Plant Physiol*. 2005, vol. 138, p. 4–6.

BOONHAM, N. - WALSH, K. - SMITH, P. - MADAGAN, K. - GRAHAM, I. - BARKER, I. 2002. Detection of potato viruses using microarray technology: towards a generic method for plant viral disease diagnosis. *J. Virol. Methods*. 2002, vol. 108, p. 181–187.

BURNETTE, W.N. 1981. “Western Blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and

radioiodinated protein *Anal Ch.*1981, vol. 112, p.195-203.

CASTELLO, J.D. – ROGERS, S.O. - STRAMER, W.T. – CATRANIS, C.M. – MA, L. - BACH, G.D. - . ZHAO, Y. - SMITH, J.E. 1999. Detection of tomato mosaic tobamovirus RNA in ancient glacial ice. *Polar Biol.* 1999, vol. 22, p. 207-212.

CERKAUSKAS, R.F. 2005. "Tomato Diseases - Tomato Mosaic Virus (ToMV).", *Asian Vegetable Research and Development Center Report, AVRDC Publication 04-609*.

CITOVSKY, V. - ZAMBRYSKI, P.1991. How do plant virus nucleic acids move through intercellular connections. *Bio Essays*. 1991, vol. 13, p. 373-379

CLARKE, 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*. 1977, vol. 34, p. 475–483.

COMPTON, J. 1991. Nucleic acid sequence-based amplification *Nature*. 1991, vol. 350, p. 91-92.

CREAGER, A.N.H. - SCHOLTHOF K.B.G. – CITOVSKY, V. - SCHOLTHOF H.B. 1999. Tobacco Mosaic Virus: Pioneering Research for a Century. *Plant Cell*. 1999, vol. 11, p. 301-308.

FILLHART, R.C. – BACHAND, G.D. – CASTELLO, J.D. 1998. Detection of Infectious Tobamoviruses in

Forest Soils. *Appl Environ Microb*.1998, vol. 64, p. 1430-1435.

FRANKLIN, R.E. - KLUG, A. - HOLMES, K.C. 1956. X-ray diffraction studies of the structure and morphology of tobacco mosaic virus. In Ciba Foundation Symposium on The Nature of Viruses, G.E.W. Wolstenholme and E.C.P. Millar, eds (London, UK: Churchill Press), pp. 39–55.

GADANI, F – Mansky, L.M. – MEDICI, R. – MILLER, W.A. – HILL, J.H. 1990 Genetic engineering of plants for virus resistance. *Arch Virol*. 1990, vol. 115: 1-21.

GIBBS, A. 1999. Evolution and origins of tobamoviruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1999, vol. 354,p. 593-602.

GILLESPIE, T. – BOEVINK, P. – HAUPT, S. – ROBERTS, A.G. – TOTH, R. – VALENTINE, T. - CHAPMAN, S. – OPARKA, K.J. 2002. Movement protein reveals that microtubules are dispensable for the cell-to-cell movement of Tobacco mosaic virus. *Plant Cell*. 2002, vol. 14, p. 1207–1222.

GOELET, P. - LOMONOSOFF, G.P.- BUTLER, P.J.G.- AKAM, M.E. - GAIT, M.J.- KARN, J. 1982. Nucleotide sequence of tobaccomosaic virus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci*., 1982, vol. 79, p. 5818–5822.

GOLDBACH, R.- DE HAAN, P. 1994. RNA viral supergroups and the evolution of RNA viruses. In The

evolutionary biology ofviruses (ed. S. Morse) pp. 161-184. NewYork: Raven Press.

GOLEMBOSKI, D.B. - LOMONOSOFF, G.P. - ZAITLIN, M. 1990. Plants transformed with a tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus. *Proc. Natl Acad. Sci*.1990, vol. 87, p. 6311–6315.

HERMAN, E.M. 2000. In Methods in plant electron microscopy and cytochemistry, DASHEK, W.V (ed), Humana Press, New Jerse.2000, p . 247-262.

HESS, R.D. 2004. Routine Epstein-Barr Virus Diagnostics from the Laboratory Perspective: Still Challenging after 35 Years. *J Clin Microbiol*. 2004, vol. 42, p: 3381–3387.

HOLLINGS, M. – HUTTINGA, H. 1976. Tomato mosaic virus. Descriptions of plant viruses, no. 156. Commonwealth Mycological Institute/Association for Applied Biology, Kew, England.

CHEN, M.H. – TIAN, G.W. – GAFNI, Y. – CITOVSKY, V. 2005. Effects of calreticulin on viral cell-to-cell movement. *Plant Physiol.* 2005, vol. 138, p. 1866–1876.

ISHIKAWA, M. – OKADA, Y. 2004. Replication of tobamovirus RNA. *Proc. Jpn.Acad. Ser. B*, vol. 80, p. 215-224.

JACOBI, V. - BACHAND G.D. – HAMELIN, R.D – CASTELLO, J.D. 1998. Development of a multiplex immunocapture RT-PCR assay for detection and differentiation oftomato and tobacco mosaic tobamoviruses. *J Virol Methods*. 1998, vol.74, p. 167-178.

KAMENOVÁ, I.. - ADKINS, S. 2004. Transmission, in planta distribution, and management of Hibiscus latent Fort Pierce virus, a novel tobamovirus isolated from Florida hibiscus. *Plant Dis*. 2004, vol. 88, p. 674-679.

KLERKS, M.M - LEONE G.O:M, VERBEEK, M. - VAN DEN HEUVEL, J.F.J.M. – SCHOEN C.D. 2001. Development of a multiplex AmpliDet RNA for the simultaneous detection of Potato leafroll virus and Potato virus Y in potato tubers. *J Virol Methods*. 2001, vol, 93, p.115 – 125.

KOMODA, K.- MAWATARI, N. - HAGIWARA-KOMODA, Y.- NAITO, S. - ISHIKAWA, M. 2007. Identification of a Ribonucleoprotein Intermediate of Tomato Mosaic Virus RNA Replication Complex Formation. *J. Virol.* 2007, vol. 81, p. 2584-259.

KOONIN, E.V. – DOLJA, V.V. 1993. Evolution and taxonomy of positive- strand RNA viruses: implication of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1993, vol. 28, p.375–430

KRAGLER, F. – CURIN, M. – TRUTNYEVA, K. – GANSCH, A. – WAIGMANN, E. 2003. MPB2C, a

microtubule associated plant protein binds to and interferes with cell to cell transport of tobacco mosaic virus movement protein. *Plant Physiol*. 2003, vol. 132, p. 1870–1883.

LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970, vol. 227, p. 680-685.

LANCIOTTI, R.S. - KERST, A.J. 2001. Nucleic Acid Sequence-Based Amplification Assays for Rapid Detection of West Nile and St. Louis Encephalitis Viruses. *J. Clin. Microbiol*. 2001, vol. 39, p. 4506-4513.

LARTEY, R.T.- GHOSHROY, S. - CITOVSKY, V. 1998. Identification of an Arabidopsis thaliana mutation (vsm1) that restricts systemic movement of tobamoviruses. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 1998, vol. 11, p. 706–709.

LEE, G.P.M.B.E. - KIM, C.S. - CHOI, S.H, RAM, C.H. - KIM, S.U. - RYU, K.H. 2003 Plant virus cDNA chip hybridization for detection and differentiation of four cucurbit infecting Tobomoviruses. *J. Virol. Methods*. 2003, vol. 110, p. 19–24.

LETSCHERT, B. – GUNTER, A. - LESEMANN D.E. - WILLINGMANN P.- HEINZE, C.2002. Detection and differentiation of serologically cross-reacting tobamoviruses of economical importance by RT-PCR and RT-PCR-RFLP. *J Virol Methods*. 2002, vol. 106, p. 1-10.

LEWANDOWSKI, D.J. – DAWSON' W.O. 1999. TOBAMOVIRUSES Encyclopedia of Virology (Second Edition) pp. 1780-1783.

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.

LIU, J.Z. - BLANCAFLOR, E.B - NELSON, R.S. 2005. The tobacco mosaic virus 126- kilodalton protein, a constituent of the virus replication complex, alone or within the complex aligns with and traffics along microfilaments. *Plant Physiol*. 2005, vol. 138, p. 1853–1865.

MANDELES, S. – BRUENING, G.1968.Tobacco mosaic virus ribonucleic acid. *Biochem. Prep*.1968, vol. 12: 111-117.

MATTHEWS, R. E. F. 1991. ToMV infects tobacco plants systemically, causing mosaic symptoms, which are characterized by intermingled light and dark green regions. 1991. Plant virology, 3rd ed. Academic Press Ltd., London, England.

MAULE, A.J –HAVELDA, Z. 2008. *In Situ* Detection of Plant Viruses and Virus-Specific Products. *Methods in Molecular Biology*. 2008, vol 451, p. 201 -216.

MAXWELL, K. – JOHNSON, G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J Exp Bot*. 2000, vol. 51, p. 659-668.

MESHI, T. - WATANABE, Y., SAITO, T. – SUGIMOTO, A. – MAEDA, Z. - OKADA, Y. 1987. Function of the 30 kd protein of tobacco mosaic virus: involvement in cell-to-cell movement and dispensability for replication. EMBO J. 1987, vol. 6, p. 2557-2563.

McKINNEY, H 1929. Mosaic diseases in the Canary Islands, West Africa, and Gibraltar. *J Agric Res*. 1929, vol. 39, p. 557-578.

NELSON, R. S. - POWELL-ABEL, P. - BEACHY, R. N. - 1987. Lesions and virus accumulation in inoculated transgenic tobacco plants expressing the coat protein gene of tobacco mosaic virus. *Virology*. 1987, vol. 158, p.126-32.

NIU, Q.W. – LIN, S.S. – REYES, L.J. – CHEN, K.CH. -, WU, H.W. – YEH, S.D. – CHUA, N.H. 2006. Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance. *Nat Biotechnol.*2006, vol. 24, p: 1420-1428.

PALUKAITIS, P.- ZAITLIN, M. 1986. Tobacco mosaic virus: Infectivity and replication. In Plant Viruses. Vol. 2. The Rod- Shaped Plant Viruses, M.H.V. Van Regenmortel and H. Fraenkel-Conrat, eds (New York: Plenum Press), pp. 105–131.

PARES, R.D.- GUNN, L.V.- CRESSWELL, G.C. 1992. Tomato mosaic virus infection in a recirculating nutrient solution. *J. Phytopathol*. 1992, vol. 135, p. 192–198.

PARES, R.D. - GUNN, L.V. – KESKULA, E.N. 1996. The role of infective plant debris, and its concentration in soil, in the ecology of tomato mosaic tobamovirus, a non-vectored plant virus. *J. Phytopathol*. 1996, vol. 144, p. 147–150.

PINEDA, M – SAJNANI, C - BARO, M. 2010. Changes induced by the Pepper mild mottle tobamovirus on the chloroplast proteome of *Nicotiana benthamiana*. *Photosynth Res.* 2010, vol. 103, p. 31–45.

POWELL, C A. 1987. Detection of three plant viruses by dot-immunobinding assay *Phytopathology*. 1987, vol. 77, p. 306-309.

PRINS, M. - LAIMER, M. – NORIS, E. - SCHUBERT, J. - WASSENEGGER M. TEPFER, M. 2008. Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Mol Plant Pathol*. 2008, vol. 1, p. 73–83.

RIETZ, S. – PARKER, J.E. 2007. Plant diesease and defence. In: Encyclopedia of life sciences. John Wiley @ sons, Ltd.

RUZIN, S.E. 1999. Plant microtechnique and microscopy. New York Oxford, Oxford University press.

SEVIK, M. A. – KOSE-TOHUMCU, E. 2011. The ELISA analysis results in tomato(*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed health testing for Tobacco mosaic virus. *Zemdirbyste*. 2011, vol. 98, p. 301-306.

SHMUEL, W.- LUCAS, W.J. - DEOM, C.M.- BEACHY, R.N.1989. Movement Protein of Tobacco Mosaic Virus Modifies Plasmodesmatal Size Exclusion Limit. Science. 1989, vol. 246, p. 377-379.

SCHAEFER, L. - BABELOVA, A. - KISS, E., HAUSSER, H.J.- BALIOVA, M., KRZYZANKOVA, M. – MARSCHE, G. – YOUNG, M.F. - MIHALIK, D. – GOTTE, M.- MALLE, E. – SCHAEFER, R.M. – GRONE, H.J. 2005. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J Clin Invest*. 2005, vol 115, p. 2223–2233.

SCHOLTHOF, K.B.G. – SCHOLTHOF, H.B. - JACKSON, A.O. 1993. Control of Plant Virus Diseases by Pathogen-Derived Resistance in Transgenic Plants. *Plant Physiol* 1993, vol. 102, p. 7-12.

TAKEUCHI, S. - KAWADA, Y. - OKUNO, T. 2000. Detection of Tobamovirusesfromsoils by non-precoated indirect ELISA. *J Gen Plant Pathol*. 2000, vol. 66, p. 153-158.

TSUGITA, A. 1962. The proteins of mutants of TMV: Composition and structure of chemically evoked sequences. *J Mol. Biol*. 1962, vol. 5, p. 284-292.

VAN BECKHOVEN, J.R.C.M. - STEAD, D.E. - VAN DER WOLF, J.M. 2002. Detection of *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* by AmpliDet RNA, a new technology based on real time monitoring of

NASBA amplicons with a molecular beacon. *J Appl Microbiol*. 2002, vol. 93, p. 840–849.

VAN REGENMORTEL, M.H.V. - FAUQUET, C.M. - BISHOP, D.H.L. (Eds.), 2000. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report on Taxonomy of Viruses. Academic Press.

WAN, Y. – LIU, K. – WANG, D. - SHEWRY P.R. 2000. High-molecular-weight glutenin subunits in the Cylindropyrum and Vertebrata section of the *Aegilops* genus and identification of subunits related to those encoded by thw Dx alleles of common wheat. *Theor Appl Genet*. 2000, vol. 101, 879–884.

WATANBE, Y. - EMORI, Y. - OOSHIKA, I. - MESHI, T. - OHNO, T. - OKADA, Y. 1984. Synthesis of TMV-specific RNAs and proteins at the early stage of infection in tobacco protoplasts: Transient expression of the 30 K protein and its RNA. *Virology*. 1984, vol. 133, p. 18–24.

WYLIE, S.J. - WILSON, C.R., JONES, R.A.C. - JONES, M.G.K. 1993. A polymerase chain reaction assay for Cucumber mosaic virus in lupin seeds. *Aust. J. Agric. Res*. 1993, vol. 44, p. 41–51.

QU, J.- YE, J – FANG, R. 2007. Artificial MicroRNA-Mediated Virus Resistance in Plants. *J Virol*. 2007, vol. 81, p. 6690–6699.

ZAITLIN, M. 1976. More understanding is needed. *Phytopathology*. 1976, vol. 66, p. 382-383.

ZINNEN, T.M. - FULTON R.W. 1986. Cross-protection between sunn-hemp mosaic and tobacco mosaic viruses. *J Gen Virol*. 1986, vol. 167, p.1679-1697.

Iné zdroje:

cit.1 : http://viralzone.expasy.org/all_by_species/51.html (15.11.2012)

cit. 2: http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009 (23.1.2012)