

DIAGNOSTIKA A MOLEKULÁRNA CHARAKTERISTIKA VÍRUSU *Plum pox virus*

JÚLIUS ROZÁK^a a ZDENKA GÁLOVÁ^b

^a Oddelenie všeobecnej a karanténnej diagnostiky, Ústredný kontrolný a skúšobný ústav poľnohospodársky Bratislava, Osada 281, 044 57 Haniska pri Košiciach, ^b Katedra biochémie a biotechnológie, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovensko
julius.rozak@gmail.com; Zdenka.Galova@uniag.sk

Došlo 26.1.15, prepracované 12.8.15, prijaté 26.11.15

Kľúčové slová: *Prunus*, molekulárna diagnostika, polymérová reťazová reakcia, vírus, biodiverzita

Obsah

1. Úvod
2. Molekulárna charakteristika vírusu *Plum pox virus*
3. Symptomatické prejavy vírusu *Plum pox virus*
4. Metódy diagnostiky vírusu *Plum pox virus*
 - 4.1. Biologická diagnostika
 - 4.2. Imunochemické metódy diagnostiky
 - 4.3. Molekulárna diagnostika
5. Biodiverzita vírusu *Plum pox virus*
6. Záver

1. Úvod

Plum pox virus (ďalej PPV) je jednovláknový RNA vírus o dĺžke 660–770 nm s obsahom 7 % RNA. Je zložený z takmer 10 000 nukleotidov, ktoré sú obalené jednovrstvovým proteínovým plášťom označovaným ako obalový proteín¹ („coat protein“; CP). Systematicky sa zaraďuje do rodu *Potyvirus* a čeľade *Potyviridae*. Hlavným spôsobom prenosu vírusu je predovšetkým vegetatívne rozmnožovanie ovocných drevín, pri ktorom sa používajú infikované rastlinné časti. Ďalej je to prenos voškami a obchodom, kedy môžu byť infikované ovocné stromy transportované na veľké vzdialenosti².

Vírus napadá hospodársky významné dreviny rodu *Prunus*, z ktorých najvýznamnejšími druhmi sú slivky (*Prunus domestica*), broskyne (*Prunus persica*), marhule (*Prunus armeniaca*), čerešne (*Prunus avium*) a višne (*Prunus cerasus*). Na týchto ovocných druhoch spôsobuje nebezpečnú chorobu kôstovín – šarku sliviek. Negatívne ovplyvňuje kvalitu a kvantitu produkcie a celkový rast stromov. Plody sú deformované, obsahujú menej cukru a zvyčajne predčasne opadávajú³. Vírus spôsobuje výrazné

straty na hektárových úrodách, ktoré pri senzitivných odrodách môžu dosiahnuť až 95 % (cit.⁴). Ďalej negatívne vplyva na vitalitu ovocných stromov a spôsobuje ich predčasné odumieranie, čím sa znižuje ekonomická efektívnosť ich pestovania. Jedinec infikovaný vírusom PPV sa stáva trvalým zdrojom tohto vírusu a predstavuje potenciálnu hrozbu pre jeho prenos na okolité zdravé rastliny. Preto jedinou cestou, ako eliminovať infekciu týmto vírusom v poraste ovocných drevín, je presná, rýchla a cenovo prijateľná diagnostika, ktorá odhalí infikované jedince v poraste⁵.

Hlavným spôsobom ochrany proti šíreniu vírusu PPV pri zakladaní ovocných sádov je používanie zdravého, bezvírozného výsadbového rastlinného materiálu a dodržiavanie izolačných vzdialeností od potenciálnych zdrojov nákazy. Takéto bezvírozné ovocné výpestky určené pre výsadbu ovocných sádov je možné zabezpečiť len pravidelným testovaním materských rastlín, z ktorých sa získava základný množiteľský materiál ako sú očka, vrúbky a podpníky⁶.

Hlavným prínosom diagnostiky je preto testovanie východiskových genetických zdrojov, z ktorých sa získava množiteľský materiál, čím sa zabezpečí dostatok bezvírozného rozmnožovacieho materiálu pre pestovateľskú prax. Diagnostikou sa takto eliminuje hlavný zdroj infekcie vírusom PPV, ktorým sú infikované materské rastliny. Ochrana pred šírením vírusu PPV v porastoch ovocných drevín je založená na fyto-sanitárnych opatreniach zameraných na likvidáciu vektorov, ktoré tieto vírusy prenášajú, odstraňovanie infikovaných stromov a vysádzanie rezistentných odrôd, ktoré sa vyznačujú rôznym stupňom odolnosti. Napr. z odrody slivky „Stanley“ boli získané transgénne klony, z ktorých najvyšší stupeň rezistencie k PPV vykázal klon C5. Po jeho mnohoročnom sledovaní v poľných podmienkach bola potvrdená jeho odolnosť ku kmeňom PPV-D, PPV-M a PPV-Rec. V súčasnosti sa pre tento klon používa názov „HoneySweet“ a využíva sa v šľachtení nových odolných odrôd a podpníkov sliviek⁷.

2. Molekulárna charakteristika vírusu *Plum pox virus*

Systematicky sa PPV zaraďuje do rodu *Potyvirus* a čeľade *Potyviridae*. Je to jednovláknový vírus kyjovitého tvaru o dĺžke 660 až 770 nm a šírke 12,5 až 20 nm s obsahom 7 % RNA. Je zložený z 9786 nukleotidov, ktoré sú obalené jednovrstvovým obalovým proteínovým plášťom označovaným ako obalový proteín (CP), ktorý je usporiadaný špirálovite okolo jednovláknovej ssRNA s pozitívnou polaritou. Genomická RNA vírusu PPV má na 5'-konci VPg proteín („viral protein genome-linked“) a dlhý polyproteínový reťazec je na 3'-konci ukončený

obalovým proteínom⁸. Tento polyproteín je štiepený tromi proteínazami, ktoré kódujú vírus za vzniku desiatich proteínov: P1, HCPro, P3 a 6K1, CI, 6K2, NIa a VPg, NIa a Pro, NIb a CP. Tieto bielkoviny majú rozličné úlohy pri vírusovej infekcii a interakcii medzi vírusom a hosťiteľom⁹. Determinant patogenity pre infekciu bylinných hosťiteľov bol izolovaný v P3 a 6K1 a drevitých hosťiteľov v P1 a v obalovom proteíne (CP)¹⁰. Nukleotidové zmeny v P3 a 6K1 kódujú sekvencie, ktoré sú spájané s adaptáciou na *N. clevelandii*. Poukazuje sa na zodpovednosť proteínu P1 za adaptáciu PPV na hosťiteľa. Tomuto proteínu sa pripisuje aj vplyv na silu virulencie, rýchlosť množenia a jeho symptomaticku¹¹.

3. Symptomatické prejavy vírusu *Plum pox virus*

Symptomatické prejavy ochorenia sú variabilné a závisia od druhu hosťiteľskej rastliny a kmeňa vírusu. Sú tiež ovplyvňované priebehom počasia. Pri chladnejšej jari a neskorom nástupe leta sú prejavy ochorenia výraznejšie a naopak vysoká teplota v lete brzdí rozmnožovanie a rozširovanie vírusu v pletivách hosťiteľa¹². Pri slivkách sa príznaky ochorenia prejavujú najmä na listoch a plodoch, pričom na listoch vznikajú žltozelené škvrny, krúžky alebo ornamentálne kresby. Okraje škvŕn nie sú ostro ohraničené. Príznaky sú na napadnutých jedincoch viditeľné už od mája daného vegetačného obdobia. Pri väčšine odrôd sa v lete vplyvom vysokých teplôt intenzita príznakov znižuje¹³. Na marhuliach a broskyniach sú badať príznaky na listoch, plodoch a kôstkach. Na listoch vznikajú svetlozelené škvrny, krúžky alebo pružky, ktoré široko lemujú hlavnú žilnatinu. Na plodoch sa v období zrelosti prejavujú mramorovité kresby. Na kôstkach marhúľ sú typické svetlozelené až žlté škvrny alebo krúžky¹⁴.

4. Metódy diagnostiky vírusu *Plum pox virus*

4.1. Biologická diagnostika

Výhodou biologickej diagnostiky je jej citlivosť, nakoľko ak je vo vzorke živý vírus, tak sa počas sledovania v bioindikátore namnoží, čím sa zvyšuje jeho koncentrácia a podporí sa tak tvorba symptomatických prejavov. Na druhej strane jej nevýhodou je ak vírus z rôznych dôvodov v bioindikátore stratil virulenciu. V takom prípade biologická diagnostika nedokáže správne detegovať sledovaný vírus. Ďalšou nevýhodou biologickej diagnostiky je jej pracovná, časová a finančná náročnosť, ktorá spočíva v príprave a starostlivosti o bioindikátory. V prípade infekcie testovacej vzorky viacerými vírusmi je negatívom biologickej diagnostiky neschopnosť detegovať naraz tieto vírusy. V takom prípade symptomaticka vykazovaná bioindikátormi zodpovedá prítomnosti dominantného vírusu. Preto biologická diagnostika nemôže byť hlavnou diagnos-

tickou metódou, ale súčasťou viacerých detekčných metód. Bioindikátory sa často používajú na uchovávanie vírusov na ďalšie experimenty¹⁵.

Na biologickú diagnostiku vírusu PPV sa používajú bylinné a drevité bioindikátory. Sú to rastliny, ktoré výrazne reagujú na infekciu sledovaným patogénom. Ako bylinné indikátory sa používajú *Chenopodium foetidum* a *Nicotiana clevelandii*. Tieto indikátory sú inokulované vo fáze kľúčnych listov inokulom, ktoré sa pripraví zo šťavy mladých symptomatických listov, kvetov alebo kôry. Nanáša sa na mladé listky indikátorových rastlín, ktorých pokožka bola narušená abrazívom. Pri pozitívnych vzorkách sa príznaky objavujú vo forme deformácii listov, výhonkov a škvŕnami na listoch¹⁶. Hlavným drevitým indikátorom, ktorý sa používa na biologickú diagnostiku PPV, je *Prunus persica* cv. GF 305. Diagnostika na tomto indikátore spočíva v jeho inokulovaní očkami, ktoré sa získavajú z testovaných rastlín. Používa sa dvojité očkovanie do tvaru písmena T alebo pomocou Forketovho očkovania. Vyhodnotenie sa robí v týždenných intervaloch, pričom sa sledujú deformácie a farebné zmeny listov¹⁷.

4.2. Imunochemické metódy diagnostiky (Sérologická diagnostika)

Pri sérologickej diagnostike sa používa enzýmová imunoanalýza ELISA („enzyme linked immuno sorbent assay“) test, ktorého podstatou je väzba medzi antigénom a špecifickou protilátkou, ktorá prebieha v jamkách mikrotitračných platničiek. Pre samotné testovanie sa používa približne 0,5 g čerstvého rastlinného materiálu, ktorý sa po odobraní udržuje v chlade. Najčastejšie sa používajú listy, ale môžu sa používať aj iné časti rastlín, ako sú púčiky, kôra alebo kvetné lupene¹⁸. Testovaný rastlinný materiál sa vloží do špeciálnych plastových sáčkov a pridáva sa fosfátový tlmivý roztok. Vzorky sa homogenizujú, pričom sa získava substrát, ktorý sa použije pri samotnom ELISA teste. Pri diagnostike PPV sa najčastejšie používa nepriama metóda ELISA testu¹⁹, kedy sa monoklonálna protilátka pre PPV 5B-IVIA napipetuje do jamiek mikrotitračnej platničky. Následne sa pridáva substrát (čo je vzorka) obsahujúci antigén. Po premytí mikrotitračnej platničky, ktorým sa odstránia nenaviazané zložky, sa pridá konjugát, čo je protilátka značená enzýmom. Vytvorí sa komplex, ktorý sa preukáže v podobe farebného produktu. Intenzita zafarbenia poukazuje na pozitívitu vzorky a je priamo úmerná k množstvu antigénu. Dôležitý je termín odberu, kedy ako najvhodnejšie sa uvádzajú jarné mesiace pred príchodom vysokých letných teplôt. Táto metóda sa odporúča pri skriningovom testovaní veľkého počtu vzoriek. Jej výhoda spočíva v jednoduchosti, rýchlosti a prijateľnej cene²⁰.

Ďalšou využívanou sérologickou metódou je DAS-ELISA („double antibody sandwich indirect ELISA“). Pri tejto metóde je protilátka viazaná na pevnom povrchu mikrotitračnej platničky, ku ktorej sa pridáva vzorka, ktorá obsahuje antigén a následne konjugát. Vytvorí sa komplex za vzniku farebného produktu, ktorý sa najčastejšie analy-

zuje spektrofoticky na základe fluorescencie. Touto metódou je možné zistiť koncentráciu detegovaného vírusu v pletivách rastlín. Výhodou DASI-ELISA testu je jej jednoduchosť, rýchlosť a spoľahlivosť, pokiaľ je uskutočnená v jarných mesiacoch. Nevýhodou tejto metódy je nízka spoľahlivosť detekcie vírusu PPV zo vzoriek odobraných v zime²¹.

Na detekciu PPV sa využíva aj metóda TAS-ELISA („triple antibody sandwich ELISA“), ktorá sa od DASI-ELISA líši v používaní monoklonálnej protilátky MABs, ktorá umožňuje väčšiu schopnosť detekcie jednotlivých kmeňov vírusu PPV. Pri tejto metóde nedochádza ku krížovej reakcii so zdravými rastlinami²².

Ďalšou imunochemickou metódou, ktorá umožňuje detekciu vírusu PPV, je imunochromatografický test založený na použití monoklonálnej protilátky mABs. Táto protilátka spolu s konjugátom, ktorý tvorí protilátka s koloidným zlatom („colloidal gold“; CG), vytvára spolu s PPV viriónmi komplex, ktorý sa preukáže v podobe farebného produktu²³.

Jednou z metód, ktorá sa používa pri diagnostike vírusu PPV je aj metóda bimolekulárnej fluorescenčnej komplementácie (BiFC), ktorá je založená na základe rekonštrukcie monomerného červeného fluorescenčného proteínu (mRFP). Interagujúci proteínový komplex môže byť vizualizovaný v živých bunkách. Keď sú k jednému z interagujúcich proteínov pripojené sekvencie približne jednej polovice monomerného červeného fluorescenčného proteínu (mRFP) a k druhému interagujúcemu proteínu druhá polovica mRFP sekvencie, dochádza k tvorbe fluorescenčného signálu. Táto metóda bola optimalizovaná pre vyhľadanie interakcií medzi proteínmi vírusov z čeľade *Potyviridae* s desiatimi proteínmi PPV. Na základe týchto interakcií je možné pomocou fluorescenčného signálu mikroskopicky detegovať prítomnosť PPV vo vzorkách²⁴.

4.3. Molekulárna diagnostika

Pri spracovaní tejto kapitoly boli použité validované metódy a protokoly EPPO (cit.²⁵) a diagnostické protokoly pre detekcie PPV (cit.²⁶). Na molekulárnu diagnostiku vírusu PPV sa využíva metóda PCR spojená s reverznou transkripciou označovaná ako RT-PCR („reverse transcription – polymerase chain reaction“), ktorá umožňuje amplifikáciu RNA. Prvým krokom je izolácia RNA z tkaniva napr. infikovaných listov. Na matrici RNA sa potom pomocou enzýmu reverznej transkriptázy syntetizuje komplementárne vlákno DNA („complementary DNA“; cDNA), ktoré sa následne amplifikuje pomocou PCR s dvoma špecifickými primermi P₁ (5'-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3') a P₂ (5'-CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3')²⁷. Ich cieľom amplifikácie je obalový proteín, ktorý je súčasťou genómu PPV. Výhodou RT-PCR je vysoká citlivosť vyznačujúca sa schopnosťou detekcie nízkych koncentrácií vírusu PPV v rastlinnom pletive. Nevýhoda reverznej transkriptázy je jej termolabilita a prítomnosť enzýmov degradujúcich RNA (RNáz). Na potlačenie termolability sa dnes používa termostabilná

Tth DNA – polymeráza, ktorá je schopná previesť RNA do DNA pri teplote 72 °C. Aby nedošlo k degradácii RNA pôsobením RNáz, je potrebné pri manipulácii so vzorkami používať rukavice. Na spracovanie vzoriek sa používa voda zbavená RNáz, čo sa realizuje pôsobením inhibítora RNáz – diethylpyrokarbonátu (DEPC). Na odstránenie RNáz z povrchu laminárneho boxu a náradia sa používa sprej „RNase Away“ a vzorky sa pri spracovaní ukladajú na ľad. Izolovanú RNA je potrebné hneď spracovať alebo zmraziť a skladovať pri teplote –70 °C. Na analýzu PCR produktu sa používa elektroforéza v agarózovom géli za prítomnosti ethidium bromidu, ktorý je však karcinogénny. Konečná vizualizácia prebieha pod UV lampou, pričom sa používa pozitívna a negatívna kontrola. Ak je PCR produkt na úrovni pozitívnej kontroly, analyzovanú vzorku označujeme ako pozitívnu. V prípade použitia primerov P₁ a P₂ je dĺžka PCR produktu 243 bp.

V súčasnosti nachádzajú uplatnenie modifikované metódy RT-PCR. „Immunocapture PCR“ (IC-PCR) je metóda kombinujúca PCR a ELISA (cit.²⁸). Pri tejto metóde sa do mikroskúmavky nanáša PPV – špecifická monoklonálna protilátka 5B-IVIA a inkubuje sa 3 hodiny pri teplote 37 °C. Mikroskúmavky sa premývajú dvakrát sterilným PBS-Tween („washing buffer“). Následne sa opäť dvakrát vypláchnu s vodou zbavenou RNáz. Ďalej sa pipetuje rastlinný extrakt z testovaných rastlín. Inkubuje sa 2 hodiny pri teplote 37 °C. Po premytí sa do nich pipetuje premix (reakčná zmes) pre PCR spolu so špecifickými primermi. Následne prebieha samotná PCR reakcia. Táto metóda s použitím monoklonálnej protilátky 5B-IVIA bola validovaná v kruhových testoch s presnosťou detekcie PPV 82 % (cit.²⁹). Pri použití IC-PCR s 5B-IVIA v zimných mesiacoch sa udáva 95,8 % pravdepodobnosť správneho pozitívneho výsledku. Jej výhodou je rýchlosť reakcie a jej vysoká spoľahlivosť pri detekcii vírusu PPV zo vzoriek, ktoré boli odobrané v zimných mesiacoch³⁰.

Ďalšou metódou je „co-operational amplification RT-PCR“ (Co-RT-PCR). Ide o typ RT-PCR, ktorý využíva tri alebo štyri špecifické primery v jednej reakcii: P₁ (5'-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3'), P₂ (5'-CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3'), P₁₀ (5'-GAG AAA AGG ATG CTA ACA GGA-3'), P₂₀ (5'-AAA GCA TAC ATG CCA AGG TA-3')³¹. Vyznačuje sa vysokou citlivosťou. Táto metóda je citlivejšia ako RT-PCR s použitím primerov P₁ a P₂ a bola validovaná v kruhových testoch s úspešnosťou 94 % (cit.³²).

„Print capture PCR“ (PC-PCR) je test, ktorý umožňuje rýchlu a citlivú detekciu PPV z infikovaných rastlín bez potreby drvenia vzoriek³³. Čerstvé časti detegovaných listov alebo stoniek sú lisované na Whatman 3MM papier. Takéto odtlačky môžu byť spracované priamo alebo sa uskladňujú pri izbovej teplote až do 1 mesiaca bez negatívneho efektu na amplifikáciu nukleových kyselín. Pre PC-PCR sa stvorček papiera s odtlačkom rastlinného pletiva umiestni do mikroskúmaviek za prídania 120 µl 0,5 % Tritonu X100 s následným premiešaním a ponechaním na dvojminútovú inkubáciu pri izbovej teplote. V ďalšej fáze sa 100 ml extraktu preniesie do mikroskúmaviek, kde bol

nanesený uhličitanový pufr a 5B IVIA monoklonálnej protilátky. Tento extrakt je inkubovaný 2 hodiny pri 37 °C a následne dvakrát premytý PBS pufrom. Po pridaní primerov a premixu nasleduje jednokroková RT-PCR. PC-PCR metóda je jednoduchá, rýchla, lacná a veľmi citlivá s možnosťou použitia aj pre iné vírusové fytopatogény³⁴.

Ďalšou metódou je drt-PCR („direct real-time PCR“). Ide o priamu real time PCR, ktorá využíva maceráciu surového supernatanu získaného z listov testovanej rastliny v pufrí, ktorý bol vyvinutý špeciálne pre tento účel. Používa špecifické primery a TaqMan sondy, ktoré dokážu detegovať viaceré kmene vírusu PPV (PPVC-D, PPV-M, PPV-C, PPV-EA a PPV-W). Pri porovnaní tejto metódy s metódou ELISA bola dokázaná sto až tisícnásobne vyššia citlivosť a schopnosť detegovať PPV v skorších štádiách infekcie³⁵.

Jednou z novších metód je NASBA-FH. Ide o metódu založenú na amplifikácii sekvencií nukleových kyselín spojených s prietokovou hybridizáciou. Metóda je vhodná na detekciu molekúl RNA a je desaťkrát citlivejšia ako Co-RT-PCR a tisíckrát citlivejšia ako RT-PCR (cit.²⁹).

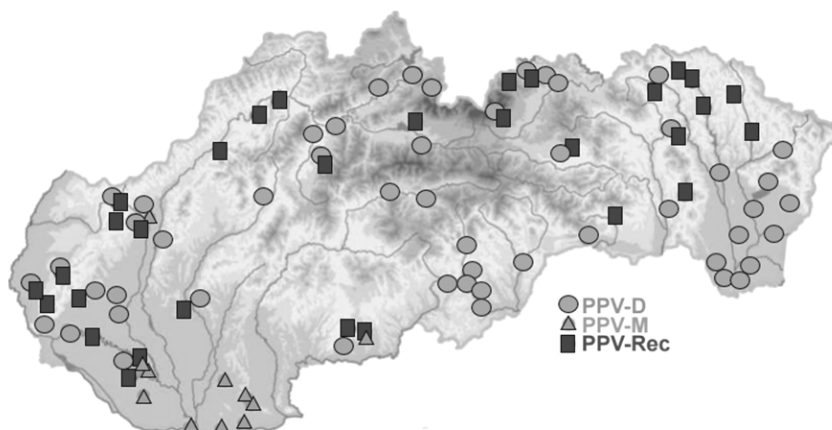
Ďalšou možnosťou na detekciu *Plum pox virus* je metóda Real-time RT-PCR, pri ktorej je patogén detegovaný a kvantifikovaný ešte počas reakcie, pričom umožňuje sledovať prírastky DNA počas každého cyklu. Zistenie prítomnosti nami sledovaného patogéna spočíva v zaznamenaní fluorescenčného signálu po každom cykle do kriviek, čo umožňuje priame sledovanie priebehu reakcie a výsledky sa zaznačujú do kriviek v reálnom čase. Ako fluorescenčné činidlá sa v prípade detekcie PPV používajú špecifické sondy, čo sú fluorescenčné značené a synteticky pripravené sekvencie nukleotidov, ktoré sú zodpovedajúce k hľadanému úseku. Používané primery a TaqMan sondy pre detekcie PPV sú Forward primer (5'-CCA ATA AAG CCA TTG TTG GAT C-3'), Reverse primer (5'-TGA ATT CCA TAC CTT GGC ATG T-3'), TaqMan sonda (5'-FAM-CTT CAG CCA CGT TAC TGA AAT GTG CCA-TAMRA-3')³⁶.

Pri detekcii viacerých vírusových patogénov naraz sa používa metóda multiplex RT-PCR (mRT-PCR), pri ktorej sa do reakčnej zmesi pridáva niekoľko párov primerov, čo umožňuje detegovať niekoľko génov naraz v jednej reakčnej zmesi. Hlavnou výhodou je úspora nákladov a času na diagnostiku³⁷.

K novým metódam patrí aj metóda nazývaná „High-throughput“. Pri tejto metóde sa využívajú priame spôsoby spracovania rastlinného materiálu určeného k testovaniu prítomnosti PPV. Umožňuje rýchle testovanie pomocou real-time RT-PCR, pri ktorej extrakt z testovaných rastlín sa nanesie na nylonovú membránu alebo Whatman 3MM papierový filter. Takto sa môže skladovať alebo použiť na ďalšie spracovanie³⁰.

Medzi ďalšie nové metódy detekcie vírusu PPV patrí aj metóda Apmlify RT®, ktorá využíva reverznú transkripciu a rekombináciu polymerázovej amplifikácie (RPA), čo je izotermická alternatíva k PCR. Pri tomto teste všetky reakcie prebiehajú pri konštantnej teplote 37–42 °C, čím odpadá potreba použitia termocykléra. Výsledky testu sa zaznamenávajú v reálnom čase pomocou prenosného fluorescenčného zariadenia. Hlavný prínos tohto testu spočíva v jeho rýchlosti. Celý test od prípravy vzorky po výsledok môže byť kompletný do 20 min a môže byť prevádzaný jednoducho v laboratórnych aj poľných podmienkach. Je schopný detegovať všetky doteraz známe kmene PPV³⁸.

Novo vyvíjané molekulárne technológie sa označujú ako metódy ďalšej generácie NGS („next generation sequencing“). Vychádzajú zo Sangerovej metódy sekvenovania DNA, ktorá je od svojho objavenia zlepšovaná a automatizovaná. Patrí sem sekvenovanie syntézou, ktoré umožňuje sekvenovanie jednotlivých molekúl a dĺžka sekvenovaného úseku môže byť len okolo 32 nukleotidov³⁹. V súčasnosti sa na sekvenáciu DNA najčastejšie využíva metóda automatického sekvenovania s fluorescenčnými farbami a následnou laserovou detekciou. Používa sa k sekvenovaniu celého vírusového genómu, čo umožňuje stanoviť jeho primárnu štruktúru a lineárne usporiadanie



Obr. 1. Mapa s distribúciou kmeňov *Plum pox virus* na území SR⁴⁸

Tabuľka I
Primery používané pre detekciu jednotlivých kmeňov PPV^{36,43,49–51}

Metóda	Kmeň vírusu	Primery
RT-PCR	PPV	
RT-PCR	PPV-D PPV-M	P1 (5'-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3') PD (5'-CTT CAA CGA CAC CCG TAC GG-3') alebo PM (5'-CTT CAA CAA CGC CTG TGC GT-3')
	PPV-Rec	mD5 (5'-TAT GTC ACA TAA AGG CGT TCT C-3') mM3 (5'-CAT TTC CAT AAA CTC CAA AAG AC-3')
Co-RT-PCR	PPV-D PPV-M	PPV-D špecifická sonda: 5'-CTT CAA CGA CAC CCG TAC GGG CA-DIG-3' PPV-M špecifická sonda: 5'-ACC GCC TGT GCG TGC ACG T-DIG-3'
	Real time RT-PCR	PPV-D PPV-M
PPV-C PPV-EA PPV-W		P1 (5'-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3') PPV-U (5'-TGA AGG CAG CAT TGA GA-3') PPV-RR (5'-CTC TTC TTG TGT TCC GAC GTT TC-3')

jednotlivých dusíkatých zásad v relatívne krátkom čase⁴⁰. Táto metóda sa využíva aj na zistenie mutácií, ktoré vznikajú pri replikácii. Umožňuje odlišiť zmutované sekvencie DNA potomstva vírusov od genómu rodičov. Pomocou metód NGS je možné uskutočniť klasifikáciu jednotlivých izolátov vírusov získaných z rôznych geografických oblastí do jednotlivých kmeňov a následného zostavenia fylogenetického stromu. Sekvenovanie molekúl DNA sa využíva v diagnostike na určenie génov, ktoré podmieňujú patogenitu vírusu a naopak rezistenciu hostiteľa. Tieto poznatky sa využívajú v šľachtení rezistentných odrôd⁴¹. NGS umožňujú detekciu všetkých patogénov, ktoré sa nachádzajú v danej vzorke. Majú však obmedzenie pri vyhľadávaní podobnosti v sekvenovaných dátach, čo predlžuje čas potrebný na stanovenie diagnostického výsledku. Aby sa minimalizoval čas potrebný na spracovanie bioinformatických dát, boli navrhnuté tzv. e-sondy („e-probe diagnostic nucleic assay“), čo sú špecifické sekvencie pre určité patogény. Bola vyvinutá štatistická metóda stanovenia prítomnosti daného patogéna, v ktorej sa zaznamenáva detekčný signál e-sondy, ktorý sa porovnáva s Decoy súborom elektronických sond⁴².

5. Biodiverzita vírusu *Plum pox virus*

V súčasnosti poznáme 9 kmeňov vírusu *Plum pox virus*. Kmene PPV-M (Marcus), PPV-D (Diderón) a PPV-Rec (Recombinant) prevládajú v Európe a pokladajú sa za hlavné kmene⁴³. Medzi ďalšie kmene patria PPV-EA (El Amar) izolovaný v Egypte, PPV-C (Cherry) z Moldavska⁴⁴, kmeň PPV-CR (Cherry Russian), ktorý bol izolovaný z čerešni v Rusku⁴⁵, kmeň PPV-W (Winona 3174) izolovaný v Ontáriu v Kanade, kmeň PPV-T

(Turkey) pochádzajúci z Turecka⁴⁶ a ako posledný bol určený kmeň PPV-An (Albania) z izolátov PPV pochádzajúcich z Albánska⁴¹. Na Slovensku je známy výskyt kmeňov PPV-Rec, PPV-D a PPV-M. V Českej republike dominuje kmeň PPV-D, ktorý je menej patogénny a je ním infikovaných cca 95 % napadnutých stromov⁴⁷.

Na identifikáciu jednotlivých kmeňov *Plum pox virus* je možné použiť serologický alebo molekulárny test a sekvenáciu. Pri sérologických testoch sa používa DAS-ELISA so špecifickými protilátkami pre kmene C, D, EA, C, M. Pri molekulárnych testoch sa používajú špecifické primery pre jednotlivé kmene.

6. Záver

Metódy detekcie *Plum pox virus* zaznamenali v poslednom období veľký pokrok. V začiatkoch diagnostiky sa používali bioindikátory, na ktorých sa sledovali symptomatické prejavy vírusovej infekcie. Metódy sa postupne zdokonaľovali, pričom došlo k vývoju od biologických metód k imunochemickým za použitia testu ELISA až po dnešné molekulárne metódy s použitím RT-PCR, Real Time PCR a sekvenovania DNA. Súbor týchto metód sa používa na včasnú a presnú diagnostiku, čo nám umožňuje eliminovať zdroje vírusu z množiteľských porastov pomologických výsadiel a zo šľachtiteľských porastov ovocných drevín. Len prerušením kolobehu prenosu vírusu z infikovanej materskej rastliny na potomstvo môžeme získať vo výrobnom procese zdravý výsadbový materiál.

Práca vznikla vďaka podpore KEGA projektu č. 021SPU-4/2015 (100 %).

LITERATÚRA

1. García J. A., Glasa M., Cambra M., Candresse T.: *Mol. Plant Pathol.* 15, 226 (2014).
2. Németh M.: *Virus, Mycoplasma and Rickettsia diseases of fruit trees*. Akadémiai Kiadó, Budapest 1986.
3. Milošević T., Glisic I. P., Milošević N. T., Glisic I.: *Eur. J. Plant Pathol.* 126, 73 (2010).
4. Jarošová J., Polák J., Kumar J.: *Metodika molekulární detekce viru peckovín pomocí RT-PCR a multiplex – RT-PCR*. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha 2008.
5. Shors T.: *Understanding viruses*. Jones and Barlett Publishers, Sudbury 2009.
6. Malinowski T., Cambra M., Capote N., Zawadzka B., Gorris M. T., Scorza R., Ravelonandro M.: *Plant Dis.* 90, 1012 (2006).
7. Polák J., Kumar J., Jarošová J.: *Metodika hodnocení rezistence transgenní švestky, Prunus domestica L., klon C5 k viru šarky švestky a ke směsným infekcím s dalšími viry. Uplatněná certifikovaná metodika*. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Praha 2009.
8. Reichmann J. L., Láin S., García J. A.: *J. Gen. Virol.* 70, 2785 (1989).
9. Sochor J., Babula P., Adam V., Krska B., Kezek R.: *Viruses* 4, 2853 (2012).
10. Dalot s., Quiot-Dounne L., Sáenz P., Cervera M. T., García J. A., Quiot B.: *Phytopathology* 91, 159 (2001).
11. Pacheco R., García-Marcos A., Barajas D., Martíánez J., Tenllado F.: *Virus Res.* 165, 231 (2012).
12. García J. A., Cambra M.: *Plant Viruses* 1, 69 (2007).
13. Zacha V., Vanek G., Nováková J.: *Atlas chorób a škodcov ovocných drevín a viniča*. Vydavateľstvo Príroda, Bratislava 1989.
14. Polák J.: *Bull. OEPP* 36, 225 (2006).
15. Glasa M., Matisová J., Hričovský I., Kúdela O.: *Acta Virol. (Engl. Ed.)* 41, 341 (1997).
16. Šubr Z., Glasa M.: *Acta Virol. (Engl. Ed.)* 57, 217 (2013).
17. Adam M., Krška B.: *Metodika použití dřevinných indikátorů pro zjištění přítomnosti virů ACLSV; ApMV; PDV; PNRSV; PPV*. Záhradnícka fakulta, Brno 2005.
18. Adam M.: *Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín, Piešťany, 23.-24. november 2005*, Zborník z 12. odborného seminára (Užik M., ed.), s. 139, Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany, 2005.
19. Cambra M., Asensio M., Gorris M. T., Pérez E., Camarasa E., García J. A., Moya J. J., López-Abella D., Vela C., Sanz A.: *Bull. OEPP* 24, 569 (1994).
20. Dickinson M.: *Molecular Plant Pathology*. BIOS Scientific Publisher, London 2003.
21. Hilgert I., Cikánek D., Krisořová H., Karesová R., Navrátil M.: *Hybridoma* 12, 215 (1993).
22. Németh M., Kölber M.: *Acta Hort.* 130, 293 (1983).
23. Byzova N. A., Safenkova I. V., Chirkov S. N., Avdienko V. G., Guseva A. N., Mitrofanova I. V., Zherdev A. V., Dzantiev B. B., Atabekov J. G.: *Biochemistry Mosc.* 75, 1393 (2010).
24. Zilian E., Maiss E.: *J. Gen. Virol.* 92, 2711 (2011).
25. EPPO Standards. *Bull. OEPP* 34, 155 (2004).
26. International standards for phytosanitary measures. ISPM 27 Diagnostic protocols. DP2: *Plum pox virus* (2012).
27. Wetzel T., Candresse T., Ravelonandro M., Dunez J.: *J. Virol. Methods* 33, 355 (1991).
28. Wetzel, T. Candresse, T. Macquaire G., Ravelonandro M., Dunez J.: *J. Virol. Methods* 39, 27 (1992).
29. Olmos A., Bertolini E., Cambra M.: *J. Virol. Methods* 139, 111 (2007).
30. Capote N., Bertolini E., Olmos A., Vidal E., Martínez M. C., Cambra M.: *Int. Microbiol.* 12, 1 (2009).
31. Olmos A., Bertolini E., Cambra M.: *J. Virol. Methods* 106, 51 (2002).
32. Cambra M., Capote N., Olmos A., Bertolini E., Gorris M. T., Africander N. L., Levy L., Lenardon S. L., Clover G., Wright D.: *Acta Hort.* 781, 181 (2006).
33. Olmos A., Dasí M. A., Candresse T., Cambra M.: *Nucleic Acids Res.* 24, 2192 (1996).
34. López-Moya J. J., Fernández-Fernández M. R., Cambra M., García J. A.: *J. Biotechnol.* 76, 121 (2000).
35. Kim W. S., Stobbs L. W., Lehman S. M., James D., Svircev A. M.: *Can. J. Plant Pathol.* 30, 308 (2008).
36. Schneider W. L., Sherman D. J., Stone A. L., Damstege V. D., Frederick R. D.: *J. Virol. Methods* 120, 97 (2004).
37. Carbonell A., Dujovny G., García J. A., Valli A.: *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25, 151 (2012).
38. Zhang S., Ravelonandro M., Russell P., McOwen N., Briard P., Bohannon S., Vrient A.: *J. Virol. Methods* 207, 114 (2014).
39. Pushkarev D., Neff N. F., Quake S. R.: *Nat. Biotechnol.* 27, 847 (2009).
40. Kehoe M. A., Coutts B. A., Buirchell B. J., Jones R. A. C.: *PLoS One* 9 (2014).
41. Glasa M., Prihodko Y., Predajňa L., Nagyová A., Shneyder Y., Zhivaeva T., Šubr Z., Cambra M., Candresse T.: *Phytopathology* 103, 972 (2013).
42. Stobbe A. H., Schenider W. L., Hoyt P. R., Melcher U.: *Phytopathology* 104, 1125 (2014).
43. Glasa M., Matisová J., Kúdela O.: *Acta Virol. (Engl. Ed.)* 42, 226 (1998).
44. Predajňa L., Šubr Z., Candresse T., Glasa M.: *Virus Res.* 167, 112 (2012).
45. Mavrodieva V., James D., Williams K., Negi S., Varga A., Mock R., Levy L.: *Plant Dis.* 97, 44 (2013).
46. Glasa M., Predajňa L., Šubr Z.: *J. Plant Pathol.* 92, 267 (2010).
47. Polák J., Komínek P.: *Plant Prot. Sci.* 45, 144 (2009).
48. Kúdela O., Glasa M. *Inovativne prístupy v diagnostike rastlinných vírusov a ich prínos pre poľnohospodársku prax. V. slovenské rastlinolekárske dni Ochranou vód k dosiahnutiu ich priaznivého stavu, Nitra, 9. – 10. október 2013*. Slovenská rastlinolekárska spo-

- ločnost' a VÚVH, Nitra 2013. Uverejnené na <http://www.srsweb.sk/dokumenty/5RLD/2%20den/09%2040%20K%C3%BAdelo,O.%20SAV%20Bratislava%2010.10.pdf>, stiahnuté 20.6.2015.
49. Šubr Z., Pittnerova S., Glasa M.: *Acta Virol.* 48, 173 (2004).
 50. Olmos A., Cambra M., Dasi M. A., Candresse T., Esteban O., Gorrís M. T., Asensio M.: *J. Virol. Methods* 68, 127 (1997).
 51. Varga A., James D.: *J. Virol. Methods* 132, 146 (2006).

J. Rozák^a and Z. Gálová^b (^a*The Central Controlling and Testing Institute in Agriculture, Bratislava*, ^b*Slovak University of Agriculture in Nitra*): **Diagnosics and Molecular Characterization of *Plum pox virus***

Plum pox virus (PPV), the agent responsible for sharka disease, is the most important viral pathogen of stone fruit trees. The fruits of these fruit species are widely used in the processing industry, thus being economically very attractive. This viral disease significantly reduces the vitality of the fruit trees and the quantity and quality of fruits. The present review describes recent methods used for the identification and characterization of economically important *Plum pox virus*. Understanding the diversity of plant viruses is an essential step to design efficient management strategies to eliminate economical losses.