



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

202 253

(11) (B 1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 22 05 78
(21) PV 3329-78

(51) Int. Cl.³

C 12 Q 1/70

(40) Zveřejněno 30 04 80
(45) Vydáno 31 01 83

(75)
Autor vynálezu POLÁK JAROSLAV Ing., HOROMĚŘICE

(54) Zjednodušený postup sérodiagnózy rostlinných virů

Vynález se týká sérologické diagnózy (určování) virů v rostlinách a řeší rychlé zjišťování zdravotního stavu rostlin.

Dosud známé postupy sérologické diagnózy rostlinných virů (např.: Corbett, M.K., Sisler, H.D.: Plant Virology. University of Florida Press. Gainesville, 1964, s. 211-252; Jermoljev, E., Pozděna, J.: Sérologie rostlinných patogenů. Akademia, nakl. ČSAV, Praha, 1972; Kado, C.I., Agraval, H.O.: Principles and techniques in plant virology. Van Nostrand Reinhold Company. New York, 1972, s. 295-528; Novák, J.B.: Zemědělská fytopatologie, díl I. ČAZV v SZN, Praha, 1959, s. 580-595.) jsou založeny na tom, že se ze zkoušené rostliny, nebo její části (listu a pod.) musí získat šťáva a v ní se pomocí antiséra zjišťuje přítomnost viru. Tyto postupy jsou pracné, náročné na potřebu živé práce, přístrojů i spotřebu energie. Podle aplikace rostlinného extraktu a antiséra je ve výzkumu známo několik metod sérologické diagnózy. V zemědělské praxi se však v současnosti využívají dvě metody: 1. Precipitační kapková metoda a její modifikace, kdy se získaný extrakt před inkubací s antisérem musí odstředit. Tato metoda se používá i v ČSSR ve šlechtění a kontrole zdravotního stavu rostlin. 2. Metoda radiální difuze v agaru, kdy se extrakty z rostlin nemusí odstřeďovat, avšak pracnost metody se zvyšuje přípravou agarových ploten s jamkami. Precipitační reakce se pak musí inkubovat jeden až tři dny.

U obou těchto metod je znám postup, kdy není třeba z rostlin získávat šťávu, extrakt. V případě postupu založeném na precipitaci v kapkách je popis v práci: Richter, J.: Ein serologischer Tauchtest für den Nachweis pflanzenpathogener Viren. Zbl. Bakt. Abt. II,

Bd. 126, 1971, s. 560-563. Postup založený na radiální difuzi v agaru je popsán v práci: Richter, J., Polák, J.: Serologischer Nachweis des Gurkenmosaik-Virus unter Verwendung vereinfachter Präzipitationsteste. Arch. Phytopathol. u. Pflanzenschutz, 11, 1975, s. 297-300. Protože však metody precipitační kapkové, i radiální difuze v agaru jsou málo citlivé (prokáže se jimi nejvýše koncentrace viru 0,5-0,1 mg/ml), nemají na nich založené postupy, kdy není třeba rostlinu homogenizovat a získávat šťávu, praktický význam, a jsou spíše zvláštností v případech extrémně vysoké koncentrace viru v rostlině.

V nedávné době byla vypracována metoda, která zvyšuje sto až tisícinásobně citlivost sérologické reakce. Umožňuje to senzibilizace antisér latexovou suspenzí. Precipitační reakce se tak převádí na aglutinační. Tato sérologická metoda bývá označována jako latexový test. Z literatury je známo několik modifikací tohoto testu. Pro praktické využití je vhodné uspořádání reakcí v kapkách. Ve všech případech je však nutno rostlinu homogenizovat a získanou šťávu odstředit, pak teprve lze stanovit přítomnost viru. Přihlašovaný vynález využívá vysoké citlivosti latexového testu ke zjišťování virů v rostlinách bez potřeby jejich homogenizace, získání a odstřeďování šťávy.

Příklady dosud používaných postupů sérologické diagnózy rostlinných virů:

- 1) Z části zkoušené rostliny (např. z listu) se vymačká na lisu šťáva. Při homogenizaci se přidává obvykle pufr.
- 2) Získaný homogenát se krátce odstředí (5 až 20 minut) na odstředivce při 1000 až 10 000 g.
- 3) Kapka supernatantu se smíchá na podložním sklíčku mikroskopu s kapkou antiséra.
- 4) Reakce se inkubuje 10 až 60 minut ve vlhké komoře, aby se zabránilo vysychání kapek.
- 5) Výsledek se vyhodnotí v temném poli mikroskopu při malém zvětšení (12x až 60x).

Tento postup se používá ve šlechtění a kontrole zdravotního stavu odrůd bramboru. V jednotlivých státech ve světě se realizuje ročně i několik milionů zkoušek. Použitím antisér senzibilizovaných latexem by bylo možno nahradit namáhavé hodnocení pod mikroskopem vizuelní bonitací a zvýšit citlivost sérologických zkoušek. Zároveň by se snížila spotřeba antisér.

Zlepšený postup při aplikaci antisér senzibilizovaných latexem: ad 1), 2): beze změny.

- 3) Kapka supernatantu se smíchá v jamce podložního sklíčka s kapkou senzibilizovaného antiséra.
- 4) Reakce se inkubuje 10 až 40 minut na třepačce, která zároveň funguje jako vlhká komora.
- 5) Výsledek se vyhodnotí vizuelně na černém pozadí.

Nedostatkem zlepšeného postupu je, že zůstává nutnost homogenizace rostliny a odstřeďování získané šťávy.

Sérologická metoda t.zv. ELISA testu (enzym linked immuno-sorbent assay). Metodu vypracovali pro kvantitativní stanovení imunoglobulinu Engvall, E., Perlmann, P.: Enzym-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry, 8, 1971, s. 871-874. Vhodnost testu pro stanovení rostlinných virů zjistili první Voller, A., Bidwell, D.E., Bartlett, A.: Enzyme immunoassays in diagnostic medicine: theory and

practice. Bulletin of the World Health Organization, 53, 1976, s. 55-65.

Postup ELISA testu:

- 1) Specifické protilátky antiséra (7S-immunoglobulinová frakce) se adsorbují na povrch jamek speciálních mikro-ELISA desek.
- 2) Jamky se několikrát promyjí speciálním roztokem.
- 3) Do jamek se napipetují vzorky obsahující virus (v různém zředění) a inkubují se přes noc. Vzorky se získají podobným postupem, jako je uvedeno v prvním příkladu (ad 1), 2)/.
- 4) Opakuje se postup 2).
- 5) Do jamek se napipetuje enzymem značený 7S imunoglobulin. Inkubuje se 4 až 5 hodin při teplotě 37 °C.
- 6) Opakuje se postup 2).
- 7) Do jamek se napipetuje enzymový substrát ve speciálním pufru, a inkubuje se při pokojové teplotě.
- 8) Reakce se zastaví za 60 až 100 minut, i déle, a vyhodnotí měřením na fotometru.

Výhodou ELISA testu je jeho vysoká citlivost. Podle uveřejněných sdělení je přibližně 10x citlivější než latexový test, mnohá sdělení však uvádějí jen malé zvýšení citlivosti oproti latexovému testu, pracnost, a někdy dokonce lepší výsledky s latexovým testem (např. diagnóza andean potato latent viru - Koenig, R., Bode, O., Casper, R., in: Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft in Berlin und Braunschweig, Jahresbericht 1977).

Nevýhodou ELISA testu je jeho pracnost a nákladovost. Kromě několika speciálních pufrů jde o řadu chemikálií ve velmi čisté formě. Nejdůležitější potřebné chemikálie: diethanolamin, polyvinylpyrrolidon, tween 20, vaječný albumin, hovězí sérový albumin, glutaraldehyd, DEAE celulóza, p-nitrofenylfosfát, alkalinní fofatáza. Metoda vyžaduje i použití dalších přístrojů a pomůcek (speciální mikro-ELISA desky, přesné automatické mikropipety, lis na přípravu rostlinných extraktů, odstředivka, exikátor, termostat, fotometr).

Výše uvedené nedostatky dosud známých postupů sérologické diagnózy rostlinných virů, zejména pracnost, jsou odstraněny postupem sérodiagnózy rostlinných virů podle vynálezu, jehož podstatou je způsob určování virů, kdy se využívá vysoké citlivosti antisér senzibilizovaných latexem ke smáčení řezů rostlinou, nebo její části, v kapce vody, vodného roztoku, nebo přímo senzibilizovaného antiséra. Virové částice z poraněných buněk a buněčné šťávy na řezu se dostanou do kapky a po inkubaci s antisérem se prokáže jejich přítomnost vyhodnocením přítomnosti aglutinátu.

Zjednodušeným postupem sérodiagnózy rostlinných virů se ušetří lidská práce spojená s homogenizací rostliny (její části), s úpravou homogenátu a jeho odstřeďováním. Ušetří se náklady na přístroje, nezbytné při používání dosavadních postupů, jako je elektrický lis na homogenizaci rostlin a odstředivka na úpravu homogenátu. Ušetří se elektrická energie nezbytná k provozu těchto přístrojů. V řadě případů se ušetří práce a chemikálie na přípravu pufrů nezbytných při homogenizaci rostlinných pletiv.

Předložený vynález je možno využít zejména při šlechtění, zlepšování a udržování zdravotního stavu a výnosů kulturně pěstovaných rostlin v rámci zemědělských podniků, ale

i při řešení výzkumných úkolů k rychlému určení virových chorob rostlin. Sérologické zkoušky je možno rozšířit i na ty plodiny a rostliny, u nichž se dosud neprováděly.

Příklady provedení

Způsob podle vynálezu byl vyzkoušen ke zjišťování X-viru bramboru, M-viru bramboru a viru skvrnitosti karafiátu.

Všechna antiséra jsme senzibilizovali stejnou metodou. Při frakcionaci antisér jsme vycházeli z práce: Wetter, C., Quantz, L., Brandes, J.: Vergleichende Untersuchungen über die Rotkleeadermosaik-Virus und das Erbsenstrichel-Virus. *Phytopath. Z.*, 44, 1962, s. 151-169; při vlastní senzibilizaci pak z práce: Schade, C.: Der Nachweis des Virus der Nekrotischen und der Chlorotischen Ringfleckkrankheit in Kirschen mit dem Latextest als Schnellmethode. *Arch. Pflanzenschutz*, 7, 1971, s. 207-216. Gama globulínovou frakci jsme připravili vysrážením antiséra dialýzou proti 25 % roztoku síranu amonného 3 hodiny za chladu na magnetické míchače. Po odstředění 30 minut při 1000 g jsme sediment rozpustili ve fyziologickém roztoku s přísadou 0,02 % azidu sodného (v 1/10 původního objemu antiséra). Po dialýze přes noc proti fyziologickému roztoku při pokojové teplotě jsme antisérum zředili do hodnoty titru puřem 0,05 M Tris-HCl, pH 7,2. Senzibilizaci jsme provedli latexovou suspenzí pro RF-test ČSSR výroby. Suspenzi jsme nejprve zředili 1:15 fyziologickým roztokem. Antisérum jsme smíchali se zředěnou suspenzí v poměru 1:1 a senzibilizovali třikrát po dobu 30 minut za občasného promíchání. Po každé senzibilizaci jsme suspenzi odstředili 30 minut při 5 000 g, sediment rozpustili do původního objemu v 0,05 M Tris-HCl s přísadou 2 % jednoprocentního roztoku polyvinylpyrrolidonu. Nakonec jsme sediment rozpustili v 0,05 M Tris-HCl s 0,01 % azidu sodného, v jedné čtvrtině původního objemu, a získali tak senzibilizované antisérum. Senzibilizovaná antiséra uchováváme při teplotě 4 °C.

1. Zjišťování X-viru bramboru v bramboru a tabáku.

Z rostliny bramboru jsme odřízli 5 cm dlouhý výhonek. V kapce destilované vody nakápnuté v jamce podložního sklíčka jsme smočili plochu řezu stonkem na několik vteřin. Provedli jsme druhý příčný řez výhonkem 2 cm od vrcholu a opět smočili v kapce. Přidali jsme kapku senzibilizovaného antiséra a třepali 20 minut na třepače. Přítomnost aglutinátu jsme vyhodnotili vizuálně.

Jako kontrolu jsme použili latexový test, kdy jsme z téhož odříznutého výhonku vymáčkali na elektrickém lisu šťávu, na 1 g rostlinné hmoty jsme přidali 5 ml destilované vody. Homogenát jsme odstředili 10 minut při 8 700 g. Kapku supernatantu jsme nakápli do jamky podložního sklíčka, přidali kapku senzibilizovaného antiséra, třepali 20 minut na třepače a aglutinaci vyhodnotili vizuálně.

Zkoušeli jsme rostliny bramboru inokulované X-virem, u nichž infekce dosud nebyla prokázána a zdravé rostliny bramboru. Z 15ti rostlin bramboru inokulovaných X-virem jsme zjednodušeným postupem sérodiagnózy prokázali virus ve 14 rostlinách a kontrolním postupem, při kterém se z rostlin získává šťáva, jsme virus prokázali ve 13 rostlinách. Zkoušky

zdravých rostlin zjednodušeným i stávajícím postupem byly negativní.

Podobně jsme zjišťovali i X-virus bramboru v tabáku. V kapce destilované vody jsme smáčeli řez listem tabáku. V rostlinách tabáku infikovaných X-virem jsme virus ve všech zkouškách zjednodušeným postupem sérodiagnózy prokázali.

2. Zjišťování M-viru bramboru v bramboru.

M-virus bramboru jsme zjišťovali zjednodušeným postupem sérodiagnózy obdobně jako X-virus bramboru. Řez výhonkem rostliny jsme smáčeli v kapce 0,01 M veronal - 0,007 M fosfátovém pufru s přísadou 0,007 M EDTA a 0,01 M cysteinhydrochloridu, pH 7,0. Podobně i v kontrolním postupu byla destilovaná voda nahrazena tímto pufrem. Zkoušeli jsme 20 rostlin bramboru infikovaných M-virem bramboru. Ve všech rostlinách jsme virus prokázali zjednodušeným i kontrolním testem. Při zkoušce zdravých rostlin bramboru nedošlo v žádném případě k aglutinaci.

3. Zjišťování viru skvrnitosti karafiátu v rostlinách karafiátu.

Virus skvrnitosti karafiátu jsme zjišťovali zjednodušeným postupem sérodiagnózy v rostlinách šesti různých odrůd karafiátu.

Z rostlin karafiátu jsme odřízli výhonek přibližně 4 cm dlouhý. Flochu řezu jsme smočili na několik vteřin v kapce destilované vody, nakápnuté v jamce podložního sklíčka. Provedli jsme druhý příčný řez vrcholkem výhonku, t.j. 4 až 6ti vrcholovými listy, a opět smočili v kapce. Přidali jsme kapku senzibilizovaného antiséra proti viru skvrnitosti karafiátu a třepali 20 minut na třepačce. Přítomnost aglutinátu jsme vyhodnotili vizuálně.

Jako kontrolu jsme použili latexový test, kdy jsme z téhož odříznutého výhonku vymáčkali na elektrickém lisu šťávu. Na 1 g rostlinné hmoty jsme přidali 5 ml dříve uvedeného veronal-fosfátového pufru, pH 5,5. Homogenát jsme odstředili 10 minut při 8 700 g. Supernatant jsme zředili 1:10 destilovanou vodou. Kapku zředěného supernatantu jsme nakápli do jamky podložního sklíčka, přidali kapku senzibilizovaného antiséra proti viru skvrnitosti karafiátu, třepali 20 minut na třepačce a aglutinaci vyhodnotili vizuálně.

Celkem jsme vyzkoušeli 50 rostlin karafiátu. Zjednodušeným testem jsme virus prokázali ve 48 rostlinách, kontrolním testem ve 49 rostlinách.

P ř e d m ě t v y n ě l e z u

Způsob sérodiagnózy rostlinných virů, s využitím vysoké citlivosti antisér senzibilizovaných latexem vyznačující se tím, že se plocha řezu rostliny nebo její části smáčí v kapce vody, nebo vodného roztoku pufru, anebo přímo senzibilizovaného antiséra tak, aby se virové částice z poraněných buněk a buněčné šťávy na řezu dostaly do kapky a po inkubaci s antisérem se dokáže jejich přítomnost vyhodnocením přítomnosti aglutinátu.