



národní
úložiště
šedé
literatury

Metodika diagnostiky ApMV, ACLSV a ASGV v odrůdách a podnožích jabloně a hrušně pomocí ELISA

Svoboda, Jiří; Polák, Jaroslav
2010

Dostupný z <http://www.nusl.cz/ntk/nusl-113413>

Dílo je chráněno podle autorského zákona č. 121/2000 Sb.

Tento dokument byl stažen z Národního úložiště šedé literatury (NUŠL).

Datum stažení: 17.10.2021

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní nusl.cz .



Jiří Svoboda a Jaroslav Polák

**METODIKA DIAGNOSTIKY APMV, ACLSV A ASGV
V ODRŮDÁCH A PODNOŽÍCH JABLONĚ A
HRUŠNĚ POMOCÍ ELISA**

CERTIFIKOVANÁ METODIKA PRO PRAXI



Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
2010

Autoři: Ing. Jiří Svoboda, Ph.D. a doc. Ing. Jaroslav Polák, DrSc.

Název: Metodika diagnostiky ApMV, ACLSV a ASGV
v odrůdách a podnožích jabloně a hrušně pomocí ELISA

Vydal: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
Drnovská 507, 161 06 Praha 6 - Ruzyně

Redakce a tisk: Powerprint s.r.o., Zikova 538/19, 160 00 Praha-Dejvice

Náklad: 20 výtisků

Vyšlo v roce 2010

Vydáno bez jazykové úpravy

Kontakt na autora: jiri.svo@vurv.cz

Odborný oponent: Ing. Petr Svoboda, CSc., Chmelařský institut s.r.o.,
Kadaňská 2525, 438 46 Žatec

Oponent ze státní správy: Ing. Karel Říha, ÚKZÚZ Brno, Hroznová 63/2,
603 00 Brno-Pisárky

Smlouva o uplatnění metodiky byla uzavřena dne 31. prosince 2010 s RNDr.
Jaroslavem Staňou, CSc., ředitelem ÚKZÚZ Brno,
Hroznová 63/2, 603 00 Brno-Pisárky

Metodika byla schválena Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem
zemědělským pod č.j. 496-18/KÚ/2010

Metodika vznikla za finanční podpory Ministerstva zemědělství České
republiky a je výstupem řešení výzkumného záměru MZe ČR 0002700604

Autor fotografií: Ing. Jiří Svoboda, Ph.D.

Obr. na titulní straně: letorost jabloně odrůdy Rubín s příznaky ApMV

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2010

ISBN: 978-80-7427-057-4

Metodika diagnostiky ApMV, ACLSV a ASGV v odrůdách a podnožích jabloně a hrušně pomocí ELISA

Anotace:

Přítomnost virů mozaiky jabloně (ApMV), chlorotické skvrnitosti jabloně (ACLSV) a žlábkovitosti kmene jabloně (ASGV) se podle EPPO metodiky stanovuje v odrůdách a podnožích jabloně a hrušně vyhodnocením příznaků po přenosu na dřevinné indikátory. Toto hodnocení trvá minimálně dva až tři roky. U většiny infikovaných stromů se jedná o bezpříznakovou formu onemocnění, takže nelze usuzovat na přítomnost viru na základě výskytu příznaků na listech zkoumaných stromů. Proto bylo vypracováno a v praxi uplatněno sérologické, imunoenzymatické stanovení pomocí ELISA jako spolehlivá a specifická metoda zjištění přítomnosti ApMV, ACLSV a ASGV ve stromech jabloně a hrušně pro systém certifikace zdravotního stavu výsadbového materiálu ovocných dřevin, a pro další diagnostické účely. K diagnostice uvedených virů jádrovín je možno použít komerčně vyráběné protilátky různých výrobců. Výsledky dlouholetého výzkumu diagnostiky těchto virů včetně přípravy specifických protilátek na pracovišti virologie VÚRV, v.v.i. Praha prokazují vhodnost metody ELISA pro detekci jmenovaných virů ve specifickém ročním období při použití určité tkáně stromu. Vypracované metodické postupy umožňují spolehlivou detekci virů jádrovín a jsou určeny pro laboratoře státních kontrolních a dozorových institucí, ÚKZÚZ, SRS, laboratoře zajišťující systém certifikace ovocných dřevin a další rostlinolékařské diagnostické laboratoře.

Footnote:

The presence of *Apple mosaic virus* (ApMV), *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) and *Apple stem grooving virus* (ASGV) is tested in apple and pear cultivars and rootstocks according to the EPPO recommendation by evaluating symptoms on woody indicators after the transmission by grafting. This method requires two or three years of planting. A majority of infected trees is symptomless, that is why viruses on tested trees can not be determined by evaluating symptoms. Therefore the procedures of the serological testing by ELISA as reliable and specific methods were worked out and optimised for the detection of ApMV, ACLSV and ASGV in apple and pear trees. The procedures are useful especially for the established system of the certification of the healthy state of a planting material of fruit trees. To perform ELISA, commercial antiserum from different producers can be used. Results of research obtained in Crop Research Institute, Prague approved the suitability of ELISA for the detection of these viruses in a specific tree tissue during a specific vegetation period. Developed methodological procedures are appropriate especially for the state control and supervision laboratories, for laboratories engaged in the certification system of pome fruit trees, and for another laboratories of plant health.

Obsah

I.	Cíl metodiky	3
I.1.	Úvod do problematiky virových chorob jabloně a hrušně	3
I.1.1.	ApMV	4
I.1.2.	ACLSV	5
I.1.3.	ASGV	6
I.2.	Cíl předkládané metodiky	7
II.	Vlastní popis metodiky	8
II.1.	Diagnostika ApMV pomocí ELISA	8
II.1.1.	Vlastní výzkum	8
II.1.2.	Odběr a příprava vzorků	11
II.1.3.	Metodický postup detekce	11
II.1.4.	Vyhodnocení výsledků	12
II.2.	Diagnostika ACLSV	13
II.2.1.	Vlastní výzkum	13
II.2.2.	Odběr a příprava vzorků	13
II.2.3.	Metodický postup detekce	14
II.2.4.	Vyhodnocení výsledků	15
II.3.	Diagnostika ASGV	16
II.3.1.	Vlastní výzkum	16
II.3.2.	Odběr a příprava vzorků	16
II.3.3.	Metodický postup detekce	17
II.3.4.	Vyhodnocení výsledků	18
II.4.	Komplexní diagnostika ApMV, ACLSV a ASGV	18
II.4.1.	Odběr a příprava vzorků	18
II.4.2.	Metodický postup detekce	19
II.4.3.	Vyhodnocení výsledků	20
III.	Srovnání novosti postupů	21
IV.	Popis uplatnění certifikované metodiky	21
V.	Ekonomické aspekty	21
VI.	Seznam použité související literatury	23
VII.	Seznam publikací, které předcházejí metodice	25

I. Cíl metodiky

I.1. Úvod do problematiky virových chorob jabloně a hrušně

Virus mozaiky jabloně - *Apple mosaic virus* (ApMV), virus chlorotické skvrnitosti jabloně - *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) a virus žlábkovitosti kmene jabloně - *Apple stem grooving virus* (ASGV) jsou rozšířeny ve stromech jabloně a hrušně po celém světě (Plant Viruses Online, 2010) a působí značné ekonomické ztráty (Desvignes, 1999). Jejich přítomnost v infikovaných stromech nelze s výjimkou ApMV, a to jen u některých odrůd, hodnotit pozorováním příznaků, neboť se neprojevují žádnými zjevnými příznaky. Infekce stromů jabloně i hrušně viry ACLSV, ASGV i ApMV většiny odrůd je latentní, avšak škodlivost uvedených virů je hospodářsky významná. Tyto viry jsou snadno přenosné infikovaným množitelským materiálem, rouby, očky a vegetativně množenými podnožemi. Infikované stromy nelze žádným dostupným způsobem uzdravit a v některých případech se stávají pro své okolí (ApMV, přenos pylem) zdrojem šíření nákazy. Eradikace, tj. likvidace nemocných stromů, je prakticky neuskutečnitelná. Podle námi publikovaných údajů je v České republice infikováno ACLSV více než 95 % stromů jabloně a dalšími dvěma viry ApMV a ASGV více než polovina pěstovaných stromů. Většinou se jedná o směsné infekce dvěma, nebo všemi třemi viry. Škodlivost směsných infekcí je vysoká, zahraniční údaje prokazují více než 40% ztráty výnosu, i kvality. Vzhledem k tomu, že v podmínkách ČR jsou jádroviny zpravidla infikovány ne jedním, či dvěma, ale i třemi až čtyřmi „latentními“ viry, přicházíme každoročně o nejméně 40 %, spíše více produkce jablek a hrušek. Infekci jmenovanými viry lze předcházet používáním zdravého certifikovaného množitelského materiálu vypěstovaného v ovocných školkách. Dosud platný systém EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) používá k diagnostice virů ovocných dřevin dřevinných indikátorů a vyžaduje dobu trvání testu nejméně dva roky (EPPO, 1991). Biologický test je povinný v případě testování matečných stromů, roubových matečnic odrůd a podnoží. Vedle toho je doporučeno použití imunoenzymatické metody ELISA (Clark a Adams, 1977) jako rychlé a spolehlivé diagnostické metody, která je oproti biologickému testu nejen nesrovnatelně rychlejší, ale i výrazně levnější. Pro běžnou terénní diagnostiku virů jádrovin prováděnou orgány a laboratořemi státní správy, ÚKZÚZ, SRS je sérologická metoda ELISA plně postačující. Rozhodující je nalezení vhodné tkáně stromu a výběr vhodného testovacího období pro odběr vzorků k dosažení vysoké spolehlivosti a citlivosti testu, protože koncentrace těchto virů se během roku mění. Podle některých prací je vyšší v první polovině roku (Fuchs, 1982; Matic *et al.*, 2008). Publikované údaje bylo nutno

upřesnit a stanovit pro podmínky České republiky. Ve virologické laboratoři VÚRV, v.v.i. jsme vypracovali originální postupy diagnostiky uvedených virů pomocí ELISA (např. Polák *et al.*, 1997; Polák a Zieglerová, 2001; Kundu *et al.*, 2003), postupy purifikace virů a přípravy specifických antisér v době, kdy komerční protilátky nebyly k dispozici. V současné době každý výrobce protilátky, ELISA soupravy udává doporučený metodický postup testu. Ačkoli se vlastní postupy diagnostiky udávané jednotlivými výrobci od sebe a od našich originálních postupů výrazně neliší, přesto může docházet k rozdílům ve výsledcích. Tyto rozdíly spočívají jak v odlišnostech metodického postupu, tak v kvalitě dané konkrétní protilátky. Kvalita protilátek jednotlivých výrobců může kolísat, proto doporučujeme nejkvalitnější výrobce komerčních protilátek jako jsou např. Loewe Biochemica GmbH, Německo nebo Bioreba AG, Švýcarsko. Vedle toho námi vypracované originální postupy určují optimální období pro spolehlivou diagnostiku daného viru a specifikují nejvhodnější rostlinné tkáně pro odběr vzorků. Kromě metody ELISA lze také s úspěchem použít molekulárně biologické metody, které jsou však podstatně dražší a zdaleka ne všechny diagnostické laboratoře jsou vybaveny potřebnými přístroji a zkušenostmi. Pro čtvrtý latentní virus jabloně a hrušně, *Apple stem pitting virus* (ASPV) dosud neexistuje komerčně vyráběná protilátka, i když byla s úspěchem připravena pro vlastní potřebu v jedné japonské výzkumné laboratoři. Pro diagnostiku tohoto viru je vedle biologického testu možno použít molekulární test RT-PCR. Z ekonomického i praktického hlediska doporučujeme, aby si laboratoře státní správy zadávaly diagnostiku tohoto viru pomocí RT-PCR v některé z českých laboratoří virologického výzkumu, především na rezortním pracovišti VÚRV, v.v.i. Praha-Ruzyně. V případě molekulární diagnostiky se mohou vyskytnout falešně pozitivní reakce, které jsou při imunoenzymatickém stanovení jen velmi výjimečné. Srovnávací testy osmi renomovaných evropských výzkumných laboratoří prokázaly, že stanovení rostlinných virů pomocí ELISA je stále nejspolehlivější diagnostickou metodou.

I.1.1. ApMV

Virus mozaiky jabloně, *Apple mosaic virus* (ApMV) může způsobit mozaiku na listech jabloně. Tento virus patří do rodu *Ilarvirus*, čeleď *Bromoviridae* (Roossinck *et al.*, 2005) a napadá stromy jabloně po celém světě. Isometrické částice jsou pleomorfní, 25 a 29 nm v průměru. Poprvé byl zjištěn na růži a jabloni v USA (White, 1928; Bradford a Joley, 1933). ApMV je přenosný roubováním, očkovaním, a také mechanicky. Vedle toho je přenosný (pravděpodobně) pylem, což je zvlášť významné pro jeho šíření v přírodě. Není přenosný

semenem. Není znám žádný vektor ApMV. Virus mozaiky jabloně je ve světě velmi rozšířený virus infikující nejen stromy jabloně, ale také peckoviny jako jsou broskvoně, mandloně a meruňky (Matic *et al.* 2008), dále pak rostliny chmele a mnoho druhů čeledi *Rosaceae* (Plant Viruses Online, 2010). Pro své široké rozšíření a značnou škodlivost je běžně k dispozici komerčně vyráběné antiserum pro detekci ApMV pomocí ELISA.

ApMV se může projevit u mladých bujně rostoucích infikovaných stromů nebo po hlubokém zmlazovacím řezu staršího stromu nepravidelnými žlutými až bílými skvrnami na některých listech (Obr.1). Většinou však nejsou patrné žádné příznaky, většina odrůd jabloně je ApMV infikována latentně. Virus je velmi snadno přenosný infikovaným množitelským materiálem při roubování a očkování. V České republice je značně rozšířen, zamoření některých jabloňových sadů dosahuje 55 % (Svoboda a Polák, 2010).

I.1.2. ACLSV

Virus chlorotické skvrnitosti jabloně, *Apple chlorotic leafspot virus* (ACLSV) byl poprvé zjištěn na jabloni v USA (Mink a Shay, 1959) a byl charakterizován jako latentní, mechanicky přenosný virus jabloně. ACLSV byl nejprve zařazen jako *Closterovirus*, později byl z tohoto rodu vyčleněn a je typickým zástupcem rodu *Trichovirus*, čeleď *Betaflexiviridae* (Martelli *et al.*, 1994). Je to mechanicky přenosný virus (Cropley, 1963), který napadá stromy jabloně (Kirkpatrick a Lindner, 1964) a hrušně, kde byl zjištěn u 20-27 % testovaných stromů (Varveri a Bem, 1995). Infikuje též stromy různých druhů peckovin, kde způsobuje pseudošarku. Není přenosný semeny a není znám žádný vektor viru. Přenos endorylamoidními hád'átky (Fritzsche a Kegler, 1968) nebyl potvrzen. Přenáší se infikovaným množitelským materiálem.

Nedlouho po biologické charakterizaci ACLSV byl tento virus purifikován (Sequeira a Lister, 1969; Saksena a Mink, 1969) klarifikací homogenátu z infikovaných rostlin bentonitem s následnou ultracentrifugací na hustotním sacharózovém gradientu a byly proti němu připraveny specifické protilátky. Purifikační postup byl zdokonalen použitím iontů hořčíku pro stabilizaci struktury částic ACLSV během purifikace (Lister a Hadidi, 1971; Bar-Josph *et al.*, 1974, Fuchs a Merker, 1985). Podmínky pro stanovení a diagnostiku ACLSV pomocí ELISA zkoumali především Flegg a Clark (1979), Dettienne *et al.*, (1980), Fuchs (1981). ACLSV je přítomen v infikovaných stromech nerovnoměrně a v nízké koncentraci, což znesnadňuje spolehlivou diagnostiku.

Babović a Delibašić (1986) zjišťovali přítomnost ACLSV v květech různých odrůd jabloně v Jugoslávii. Výskyt viru kolísal od 40 do více než 90 % zkoušených stromů. Podobně i Lemmetty (1989) zjistila, že ve Finsku infekce jabloňových sadů zpravidla přesahuje 90 %. Roubové matečnice odrůd jabloně a hrušně a matečnice podnoží jádrovin testovali na přítomnost ACLSV v Řecku Varveri a Bem (1995). V jednotlivých matečnicích bylo ACLSV infikováno 29 až 100 % stromů jabloně a 20 až 27 % stromů hrušně. Virus nevyvolává na infikovaných stromech jabloně a hrušně žádné příznaky. V České republice je rovněž silně rozšířen.

I.1.3. ASGV

Virus žlábkovitosti kmene jabloně, *Apple stem grooving virus* (ASGV) patří do rodu *Capillovirus*, čeleď *Betaflexiviridae* (Yosikawa *et al.*, 1992). Má flexibilní vláknité částice velikosti 600 až 700 nm x 12 nm (Brunt *et al.*, 1996). Je rozšířen v bezpříznakové formě ve stromech jabloně (Nemeth, 1986). Není znám žádný vektor viru. Infikuje stromy jabloně, neinfikuje hrušně, *Pyrus communis* a je přenášen a šířen roubováním a očkovaním. Směsné infekce ASGV s ApMV nebo ACLSV vedou k výraznému snížení produkce plodů a často i k předčasnému úhynu stromů (Campbell, 1963). ASGV je rozšířen po celém světě a infikuje mnoho odrůd jabloně, a v komplexu s dalšími tzv. latentními viry dochází k vysoké škodlivosti. Např. v Číně bylo prokázáno (Wu *et al.*, 1998), že směsná infekce ASGV a ACLSV je ve stromech jabloně přítomna v 80-100 % a snížení výnosu oproti zdravým stromům dosahuje až 40 %.

V minulosti byly pro diagnostiku ASGV používány dřevinné indikátory, kultivar jabloně Virginia Crab (např. De Sequeira, 1967), nebo *Pyronia veitchii*, inkubační doba je však minimálně šest měsíců. Později našli Howell a Mink (1995) indikátor *Malus micromalus*, klon GMAL 273, který na infekci reaguje během dvou až třech týdnů. Pro diagnostiku ASGV mohou být použity též bylinné indikátory, mechanický přenos na *Chenopodium quinoa* a *Phaseolus vulgaris*. Imunoenzymatické stanovení ASGV pomocí ELISA poprvé použili Fuchs *et al.* (1979).

Rozšíření ASGV dosahuje v České republice více než 50 % stromů jabloně.

I.2. Cíl předkládané metodiky

Hlavním cílem této metodiky je navržení metody rychlé a spolehlivé detekce virových patogenů jabloně a hrušně, ACLSV, ApMV, a ASGV pomocí ELISA, nejen vlastního postupu diagnostiky, ale i stanovení optimálního období pro odběr vzorků a rostlinných pletiv s nejvyšší koncentrací daného viru. Praktickým cílem metodiky je její uplatnění v diagnostických laboratořích institucí státní kontroly a dozoru, v rámci systému certifikace zdravotního stavu výsadbového materiálu jádrovin a produkce viruprostých rostlin, včetně včasného vyloučení infikovaného rostlinného materiálu. Tato metodika vznikla na základě výzkumu financovaného výzkumným záměrem MZE 0002700604 Ministerstva zemědělství České republiky.

II. Vlastní popis metodiky

Diagnostika ApMV, ACLSV a ASGV ve stromech jabloní a hrušní byla po řadu let předmětem výzkumu na pracovišti virologie VÚRV, v.v.i Praha. Především byla zkoumána optimální doba odběru a vhodnost rostlinného materiálu pro odběr vzorků a spolehlivou detekci uvedených virů. V návaznosti na určení tkáně stromu s nejvyšší koncentrací virového patogena bylo hledáno optimální roční období pro nejvyšší citlivost stanovení. Použity byly jak metody sérologické (ELISA), tak i molekulárně biologické (RT-PCR). Výsledky obou metod byly porovnávány a vypracována optimální metoda pro rychlé stanovení uvedených virů.

II.1. Diagnostika ApMV pomocí ELISA

II.1.1. Vlastní výzkum

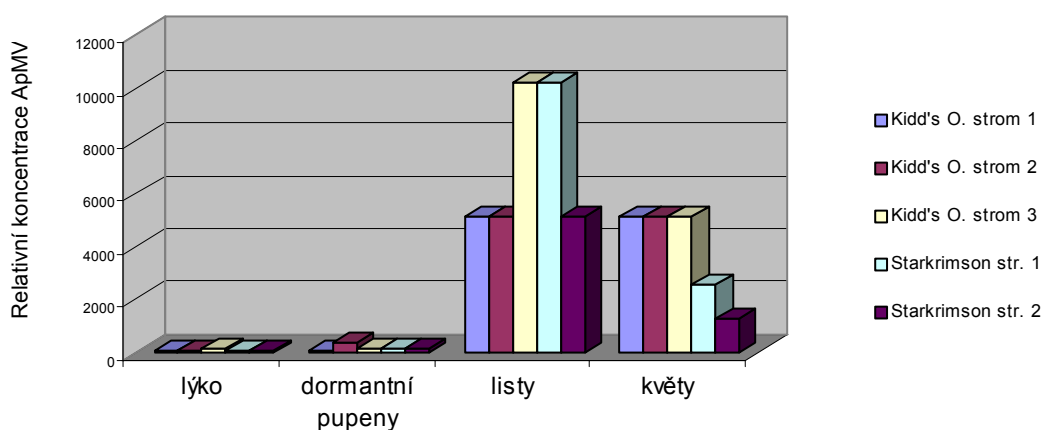
V letech 2006-2008 byl výskyt viru mozaiky jabloně ověřován vyšetřením 472 stromů jabloně ve vybraných produkčních sadech Čech (Chelčice, Horoměřice, Loukovec, Mělník, Slaný) a Moravy (Brno-Starý Lískovec, Strachotín, Velké Bílovice, Velké Němčice) a byl zjištěn podíl infikovaných stromů od 2 % v nové výsadbě v sadu Velké Bílovice, do 55 % v sadu Slaný (Svoboda a Polák, 2010). V nových výsadbách se začíná pozitivně projevovat skutečnost, že je jednak dovážen viruprostý výsadbový materiál ze zahraničí, jednak se začíná vysazovat certifikovaný školkařský materiál vypěstovaný v rámci českého systému produkce viruprostých odrůd.

Pro nalezení nejvhodnější tkáně a ročního období pro stanovení přítomnosti ApMV ve stromech jabloně bylo vybráno pět bezpříznakových stromů jabloně (odrůda Kidd's Orange - 3 stromy a odrůda Starkrimson - 2 stromy) pozitivních na ApMV v produkčním sadu Ekofrukt Slaný. Přítomnost viru ve stromech byla zjištěna pomocí ELISA a potvrzena RT-PCR. Z těchto stromů byly v průběhu roku opakovaně odebírány vzorky různých tkání (pupeny, listy, květy a lýko) a byla v nich pomocí ELISA stanovena relativní koncentrace viru (titr viru), tj. nejvyšší ředění vzorku, které ještě dává v ELISA pozitivní reakci. Titr viru byl zjišťován proto, aby byly stanoveny druh tkáně a období roku, kdy je v odebraných vzorcích maximální koncentrace viru, a tím i nejvyšší spolehlivost stanovení. Titr viru je přímo úměrný koncentraci obalového proteinu viru, takže relativní koncentrace obalového proteinu viru je převrácenou hodnotou titru viru (Svoboda a Polák, 2010). Na základě porovnání relativních koncentrací lze posoudit relativní obsah viru v příslušné tkáni v daném období.

Nejprve byly odebrány dormantní pupeny pěti vybraných stromů v listopadu, protože Matic *et al.* (2008) publikovali nejspolehlivější stanovení ApMV (v peckovinách) pomocí ELISA právě z dormantních pupenů. Pro porovnání obsahu viru v jednotlivých tkáních byly v dubnu odebrány vzorky listů, okvětních plátek a lýka z vybraných jabloňových stromů, protože naopak Torrance a Dolby (1984) uvádějí, že vhodné období pro stanovení ApMV ve stromech jabloně je na jaře od dubna do června. Neprodleně po každém provedeném odběru vzorků tkání byl v nich stanoven titr viru pomocí ELISA. Srovnání vypočtených relativních koncentrací obalového proteinu ApMV v jednotlivých jabloňových tkáních testovaných stromů je znázorněno na Obr.2. Na obrázku je vidět, že zatímco pupeny a lýko měly nízkou relativní koncentraci ApMV, takže některé vzorky byly v ELISA dokonce negativní, v listech a květech byla relativní koncentrace viru vysoká. Listy byly vybrány jako vhodnější tkáň jabloně ke vzorkování než květy, protože jsou k dispozici po delší část roku a nepodléhají tak rychle zkáze po odběru. Proto výzkum pokračoval hledáním nejvhodnějšího ročního období pro vzorkování listů. Stanovené relativní koncentrace viru v listech jabloně odebraných v různém ročním období ukazuje Obr.3. Z výsledků je patrné, že nejvyšší relativní koncentrace ApMV v listech jabloně byla zjištěna v dubnu a od této doby postupně klesala, až byla v červenci většina vzorků v ELISA negativní. Závěrem provedeného výzkumu lze konstatovat, že nejvhodnější tkáň pro stanovení přítomnosti ApMV ve stromech jabloně jsou mladé listy v období květu a okvětní plátky.

Obrázek 2

Relativní koncentrace obalového proteinu ApMV v různých tkáních stromu jabloně



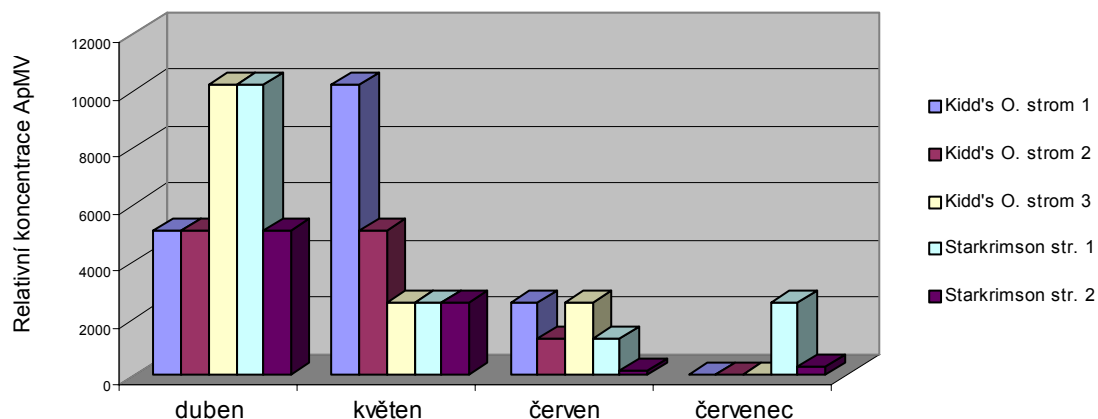


Obrázek 1

List jabloně odrůdy Rubín se zjevnými příznaky přítomnosti ApMV

Obrázek 3

Relativní koncentrace obalového proteinu ApMV v listech jabloně během 1. poloviny vegetačního období



II.1.2. Odběr a příprava vzorků

V období od počátku rašení v měsíci dubnu až do květu jabloně se odebere nejméně ze čtyř různých míst koruny testovaného stromu po jednom mladém listu. Také je možné vzít okvětní plátky v době květu jabloní. Z takto vzniklého směsného vzorku se odváží průměrný vzorek 0,5 g, který obsahuje přibližně stejný díl původně odebraných listů. Použití směsného vzorku zajišťuje správné vzorkování při nerovnoměrně rozmístěném viru v hostitelské dřevině. Vzorky je možno skladovat v ledničce při teplotě 2-8 °C do jednoho týdne bez ovlivnění výsledku testu.

II.1.3. Metodický postup detekce

Do mikrotitrační ELISA desky se nejprve napipetuje po 0,2 ml protilátek zředěných potahovacím pufrům pH 9,6 podle návodu výrobce. Protilátky v mikrotitrační desce se inkubují 4 hodiny při 37 °C, potom se 4x promyjí promývacím roztokem. Během probíhající inkubace se v třecí misce zhomogenizuje odvážený vzorek listů nebo okvětních plátků s 10 ml extrakčního pufru pH 7,4 (v poměru 1:20). Z každého vzorku se pipetuje po 0,2 ml suspenze do dvou jamek mikrotitrační desky, tj. ve dvou opakováních. Na každou desku se současně se vzorky pipetuje do dvou jamek po 0,2 ml suspenze negativní a pozitivní kontroly (dodává výrobce diagnostické soupravy) a jako blank samotný extrakční pufr. Deska se vzorky se

inkubuje přes noc při 4 °C a následně se promyje pětkrát promývacím roztokem. Potom se pipetuje po 0,2 ml protilátek konjugovaných alkalickou fosfatázou zředěných extrakčním pufrem pH 7,4 podle návodu výrobce. Deska s konjugátem se inkubuje 4 hodiny při 37 °C, potom se 5x promyje promývacím roztokem. Nakonec se do každé jamky pipetuje po 0,2 ml substrátu. Jako substrát se použije čerstvě rozpuštěný 0,1% 4-nitrofenylfosfát sodný v substrátovém pufru pH 9,8. Mikrotitrační deska se inkubuje při laboratorní teplotě mimo dosah přímého slunečního záření.

Příprava roztoků pro stanovení ApMV pomocí ELISA

- 1) potahovací pufr pH 9,6: 1,59 g Na₂CO₃ a 2,93 g NaHCO₃ se rozpustí v destilované vodě, doplní se na jeden litr destilovanou vodou a pH se upraví pomocí HCl nebo NaOH na hodnotu 9,6
- 2) promývací roztok: 8,0 g NaCl, 2,9 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O, 0,2 g KH₂PO₄, 0,2 g KCl a 0,5 ml Tween 20 se rozpustí v destilované vodě, doplní se na jeden litr destilovanou vodou a pH se upraví pomocí HCl nebo NaOH na hodnotu 7,2 - 7,4
- 3) extrakční pufr pH 7,4: 20 g polyvinyl pyrrolidonu (K10 - K40), 2 g hovězího albuminu a 0,1 g NaN₃ se rozpustí v promývacím roztoku, doplní se na jeden litr promývacím roztokem a pH se upraví pomocí HCl nebo NaOH na hodnotu 7,4
- 4) substrátový pufr pH 9,8: 97 ml diethanolaminu a 0,2 g MgCl₂ x 6 H₂O se rozpustí v destilované vodě, doplní se na jeden litr destilovanou vodou a pH se upraví pomocí HCl na hodnotu 9,8.

II.1.4. Vyhodnocení výsledků

Výsledek imunoenzymatického testu se odečte na ELISA readeru po jedné až dvou hodinách po přidání substrátu při vlnové délce 405 nm (doba odečtu se průběžně kontroluje a hodnotí se, až když je žluté zbarvení pozitivních reakcí zřetelné). Vzorek je považován za pozitivní, resp. daný strom, z něhož vzorek pochází, je považován za infikovaný ApMV, když průměrná hodnota absorbancí obou jeho jamek je nejméně třikrát vyšší než průměrná hodnota absorbancí negativní kontroly. Pokud je však hodnota absorbance vzorku nízká a pohybuje se v rozmezí tří až šestinásobku průměrné hodnoty zdravé kontroly, imunoenzymatický test se opakuje s nově odebraným vzorkem. Hodnota absorbance pozitivní kontroly diagnostické soupravy fy Loewe dosahuje obvykle po jedné hodině $A_{405} > 1,6$ a hodnoty absorbancí vzorků pozitivních na ApMV nejméně $A_{405} > 0,5$ při hodnotě absorbance negativní kontroly $A_{405} < 0,01$.

II.2. Diagnostika ACLSV pomocí ELISA

II.2.1. Vlastní výzkum

V letech 1994-1996 byl v ČR prováděn průzkum rozšíření ACLSV ve vybraných sadech a soukromých zahradách. Polák at al. (1997) testovali 42 odrůd jabloně ve čtyřech intenzivních sadech a 30 stromů 25 různých odrůd jabloně ve dvou soukromých zahradách. Téměř 100 % testovaných stromů bylo infikováno ACLSV. V roubových matečnicích a množárnách jabloně byl ACLSV zjištěn jen výjimečně v šesti odrůdách, nebyl zjištěn v žádné odrůdě hrušně. Rozšíření viru ve stromech hrušně v produkčních sadech bylo stanoveno v letech 2004-2005 ve třech vybraných okresech (Praha-východ, Kolín a Kladno). Polák a Svoboda (2006) vyšetřili celkem 126 stromů hrušně a zjistili 28 stromů infikovaných ACLSV. Nejvyšší výskyt viru zjistili v okrese Kladno - 35 %, nejnižší v okrese Kolín - 3 %.

II.2.2. Odběr a příprava vzorků

Odběr vzorků pletiv jabloně pro stanovení ACLSV by vzhledem k nízké koncentraci a nepravidelnému výskytu v pletivech stromů měl být prováděn v období intenzivního růstu tj. v květnu, v době květu, nebo v červnu, kdy ještě venkovní teploty nedosahují extrémů blízcích se hodnotám blízkým 30 °C používaných při termoterapeutickém ozdravování virózních rostlin. Nejvhodnější pro diagnostiku ACLSV jsou vzorky mladých listů a okvětní plátky. Z výše uvedených důvodů je nejvhodnější diagnostika v čerstvém rostlinném materiálu, nejdéle do jednoho týdne po odběru vzorků. Vzorky se odebírají náhodně po jednom výhonu, ze čtyř míst po obvodu koruny, tzn. 4 výhony tvoří jeden vzorek z testovaného stromu. Vzorky se uchovávají v chladničce při 2-8 °C. K provedení testu se odebere po jednom listu ze střední části výhonu. Získané směsné vzorky listů se použijí pro provedení imunoenzymatického testu ELISA ihned, nebo je lze zmrazit a uchovávat při teplotě -26 °C, nebo nižší, a použít k diagnostice ACLSV později. Také je možné použít okvětní plátky v době květu jabloní. Ze vzniklého směsného vzorku se odváží průměrný vzorek 0,5 g, který obsahuje přibližně stejný díl (tj. po jedné čtvrtině z každého výhonu) původně odebraného rostlinného materiálu. Použití směsného vzorku zajišťuje správné vzorkování při předpokladu nerovnoměrně rozmístěného viru v hostitelské dřevině. Vzorky je možno skladovat v ledničce v mikrotenových sáčcích při teplotě 2-8 °C do jednoho týdne bez ovlivnění výsledku testu.

II.2.3. Metodický postup detekce

Do mikrotitrační desky pro ELISA se napipetuje do všech 96 jamek po 0,2 ml protilátek zředěných potahovacím pufrům pH 9,6 podle návodu výrobce. Pokud by se testovalo méně vzorků napipetují se protilátky jen do příslušného počtu jamek, vždy včetně blanku, negativní a pozitivní kontroly. Protilátky v mikrotitrační desce se inkubují 4 hodiny při 37 °C, potom se 4x promyjí promývacím roztokem. Během inkubace protilátek se ve třecí misce zhomogenizují odvážené vzorky čerstvých, nebo zmražených listů nebo okvětních plátků po 0,5 g s 10 ml (nebo 0,3 g se 6 ml) extrakčního pufru pH 7,4 (v poměru 1:20). Vlastní homogenizaci vzorků lze provést různými způsoby:

- 1) Ručně pomocí tloučku v třecí misce.
- 2) Ručním homogenizátorem (např. fy Bioreba AG, Švýcarsko), kdy je vzorek s pufrům umístěn v polyetylenovém sáčku.
- 3) Elektrickým homogenizátorem (např. HOMEX 6, fy Bioreba AG, Švýcarsko), kdy je vzorek s pufrům umístěn v polyetylenovém sáčku.

Z každého vzorku se pipetuje po 0,2 ml suspenze do dvou jamek mikrotitrační desky, tj. ve dvou opakováních. Na každou desku se současně se vzorky pipetuje do dvou jamek po 0,2 ml suspenze negativní a pozitivní kontroly (dodává výrobce soupravy) a jako blank samotný extrakční pufr. Deska se vzorky se inkubuje přes noc při 4 °C ve vlhkém boxu nebo jinak chráněná před vysycháním a kontaminací, a následně se pětkrát promyje promývacím roztokem. Potom se pipetuje po 0,2 ml protilátek konjugovaných alkalickou fosfatázou, které jsou zředěny extrakčním pufrům pH 7,4 podle návodu výrobce. Deska s konjugátem se inkubuje 4 hodiny při 37 °C, potom se 5x promyje promývacím roztokem. Nakonec se do každé jamky pipetuje po 0,2 ml substrátu. Jako substrát se použije čerstvě rozpuštěný 0,1% 4-nitrofenylfosfát sodný v substrátovém pufrům pH 9,8. Mikrotitrační deska se inkubuje při laboratorní teplotě mimo dosah přímého slunečního záření. Výsledek imunoenzymatického testu se odečítá na ELISA readeru nejdříve po půl hodině, zpravidla po jedné až dvou hodinách (doba odečtu se průběžně kontroluje a hodnotí se, kdy je žluté zbarvení pozitivních reakcí zřetelné) po přidání substrátu při vlnové délce 405 nm. Vzorek je považován za pozitivní, resp. daný strom, z něhož vzorek pochází je považován za infikovaný ACLSV, pokud průměrná hodnota absorbance obou jeho jamek je nejméně třikrát vyšší než průměrná hodnota absorbancí negativní kontroly. Hodnota absorbance pozitivní kontroly z kitu fy Loewe Biochemica, (SRN), nebo Bioreba (Švýcarsko) by měla být po jedné hodině inkubace $A_{405} > 1,5$. Výrobci udávají hodnotu ještě vyšší. Uvedený postup vychází z dlouholeté experimentální zkušenosti a precizní výzkumné činnosti. Pokud je třeba šetřit na spotřebě

některých roztoků, lze mikrotitrační desky promývat v souladu s návody výrobců pouze třikrát. Kritické promytí však následuje po konjugátu, jehož nevymyté stopy mohou vést k falešně pozitivním výsledkům nebo celá deska dává pozitivní reakci bez ohledu na vzorek či kontrolu. V Holandsku, VÚ Wageningen např. používají k promývání mikrotitračních desek pouze vodu tekoucí z kohoutku veřejné sítě. Tato voda má ovšem pH vyšší než 7,0, zatímco v našich podmínkách má voda z veřejné sítě většinou nízké pH, takže takovou praktiku nelze obecně doporučit.

Složení a příprava roztoků pro provedení ELISA testu na stanovení ACLSV je stejné jako při stanovení přítomnosti ApMV (kap. II.1.3).

II.2.4. Vyhodnocení výsledků

Hodnocení výsledků se provádí podle uvedeného postupu v metodice detekce ACLSV (kap. II.2.3). Pokud je však hodnota absorbance vzorku nízká a pohybuje se v rozmezí tří až šestinásobku průměrné hodnoty zdravé kontroly, imunoenzymatický test se opakuje s nově odebraným vzorkem. V případě ACLSV, kdy se virus v rostlinných pletivech vyskytuje v nízké koncentraci a je ve stromu rozmístěn nerovnoměrně, může snadno dojít k „falešně“ negativním výsledkům. Při testech prováděných ve VÚRV, v.v.i. Praha se hodnoty absorbance vzorků ze zdravých stromů pohybují kolem 0,03, jsou i nižší. Pokud jsou při opakovaném stanovení naměřeny hodnoty absorbance 0,09 a více, resp. přes 0,1, je strom ACLSV infikovaný. Na tomto místě je nutno upozornit na skutečnost, že mikrotitrační desky od různých výrobců poskytují různé hodnoty absorbance nejen negativní kontroly, ale samotného pufru (blank) bez vzorku. V laboratořích VÚRV, v.v.i. se nejvíce osvědčily desky fy NUNC, Dánsko. Mají vysokou adsorpční schopnost a rychle se na nich odečítají výsledky. Pokud dosáhne negativní kontrola např. hodnotu 0,06, za infikované můžeme považovat jen ty vzorky, jejichž hodnota absorbance přesahuje 0,18. Ve všech mezních situacích je třeba test opakovat. V případě diagnostiky ACLSV hodnota absorbance pozitivních vzorků málokdy přesahuje 1,0. Většinou se pohybuje kolem 0,4 až 0,6, hodnoty 0,2 však nejsou výjimkou. Použití protilátek od fy Loewe, Biochemica nebo Bioreba AG je zárukou spolehlivých výsledků diagnostiky ACLSV. V minulosti byly na pracovišti virologie VÚRV, v.v.i. Praha připraveny vlastní protilátky anti-ACLSV, které poskytovaly v ELISA plně srovnatelné výsledky s výše uvedenými komerčními protilátkami. Pro diagnostické laboratoře bez experimentálních zkušeností patří diagnostika ACLSV k nejvíce rizikovým, proto je třeba jí věnovat největší pečlivost a pozornost.

II.3. Diagnostika ASGV pomocí ELISA.

II.3.1. Vlastní výzkum

ASGV byl zjištěn pomocí ELISA v 57 % testovaných stromů (Polák a Zieglerová, 2001), pomocí RT-PCR byl zjištěn v 44 % testovaných stromech (Kundu, 2003). ASGV je široce rozšířen i v intenzivních sadech jabloně. Některé kultivary jsou 100% infikovány, na druhé straně bylo zjištěno několik málo kultivarů ASGV prostých. Pozitivně se tak projevuje odběr roubů z ASGV prostých matečních stromů a v posledních letech i realizace systému certifikace zdravotního stavu ovocných dřevin v České republice.

V průzkumu provedeném před deseti lety (Polák a Zieglerová, 2001) prakticky nebyly zjištěny rozdíly v rozšíření ASGV ve starších, dvacetiletých výsadbách a nových intenzivních výsadbách v plné produkci (sedmiletá a osmiletá výsadba). Ve dvacetileté výsadbě, lokalita Horoměřice byl ASGV prokázán ve všech devíti hodnocených kultivarech jabloně: Český ráj, Discovery, Golden Delicious, Idared, James Grieve, Mantet, Spartan, Stark Earliest a Vista Bella. Z tohoto souboru testovaných odrůd jabloně byly všechny testované stromy odrůd James Grieve, Spartan a Stark Earliest ASGV infikovány. Přítomnost ASGV byla prokázána celkem v 57 % testovaných stromů devíti odrůd. Ve dvacetileté intenzivní výsadbě na lokalitě Litoměřice-Gízov byl ASGV prokázán v devíti z deseti testovaných odrůd: Bohemie, Gloster, Golden Delicious, Goldspur, Idared, Mc Intosh, Melrose, Rubín a Spartan; pouze v odrůdě Jonagold nebyl zjištěn. Ve dvacetileté výsadbě na lokalitě Tismice byl ASGV zjištěn v odrůdě Rubín, nebyl prokázán v odrůdě Elstar. V patnáctileté výsadbě Loučeň-Studce byla přítomnost ASGV prokázána v odrůdě Gloster, virus nebyl zjištěn v odrůdě Zvonkové. V osmileté intenzivní výsadbě na lokalitě Tismice byla přítomnost ASGV prokázána ve všech třech testovaných kultivarech Gloster, Idared a Starkrimson. V sedmileté intenzivní výsadbě jabloní na lokalitě Křinec-Sovenice byl ASGV zjištěn ve všech dvanácti testovaných odrůdách: Bohemie, Elstar, Golden Delicious, Idared, James Grieve Red, Jonagold, Jonagored, Ontario, Průsvitné, Rubín, Šampion a Vanda. Celkem byl ASGV stanoven ve více než 50 % stromů jabloně testovaných v intenzivních výsadbách.

II.3.2. Odběr a příprava vzorků

Odběr vzorků pletiv jabloně pro stanovení ASGV lze provádět v různých ročních obdobích. Pro spolehlivou detekci ASGV jsou nejvhodnější tři období:

- 1) V zimě od konce listopadu do konce ledna.
- 2) V předjaří v březnu.

3) Na jaře v dubnu a květnu, poté co se na stromech objeví listy.

V prvních dvou obdobích se odebírá náhodně po jednom výhonu ze čtyř míst po obvodu koruny, tzn. 4 výhony tvoří jeden vzorek z testovaného stromu. Vzorky se uchovávají v chladné místnosti při cca 4 °C v igelitových sáčkích nebo ve vlhkém písku, aby nevyschly. Koncem března se přemístí do pokojové teploty, seříznou se spodní konce výhonů až na živé pletivo a nechají se vyrašit listy. K provedení testu se odebírají listy z horních částí výhonů tak, aby bylo vzato z každého výhonu přibližně stejné množství listů. Takto vzniklý směsný vzorek se pak použije pro stanovení. Při odběru výhonů ve třetím období, kdy již vyrašily mladé listy, se postupuje při přípravě vzorků stejně s tím, že mladé listy jsou ihned k dispozici pro provedení testu. Získané vzorky listů lze použít pro provedení imunoenzymatického testu ELISA bezprostředně po odběru nebo je lze zamrazit při teplotě -26 °C nebo nižší, a použít k diagnostice ASGV později. Také je možné použít okvětní plátky v době květu jablek. Ze vzniklého směsného vzorku se odváží průměrný vzorek 0,5 g, který obsahuje přibližně stejný díl původně odebraného rostlinného materiálu (tj. po jedné čtvrtině z každého výhonu). Použití směsného vzorku zajišťuje správné vzorkování při nerovnoměrně rozmístěném viru v hostitelské dřevině. Vzorky je možno skladovat v ledničce v mikrotenových sáčkích při teplotě 2-8 °C do jednoho týdne bez ovlivnění výsledku testu.

II.3.3. Metodický postup detekce

Homogenizace vzorků, jejich pipetování a pipetování příslušných roztoků do ELISA desek, inkubace a promývání desek se provádí stejně jako v případě stanovení ACLSV (kap. II.2.3). Výsledek imunoenzymatického testu se odečítá na ELISA readeru nejdříve po půl hodině, zpravidla po jedné až dvou hodinách (doba odečtu se průběžně kontroluje a hodnotí se, kdy je žluté zbarvení pozitivních reakcí zřetelné) po přidání substrátu při vlnové délce 405 nm. Vzorek je považován za pozitivní, resp. daný strom, z něhož vzorek pochází je považován za infikovaný ASGV, pokud průměrná hodnota absorbance obou jeho jamek je nejméně třikrát vyšší než průměrná hodnota absorbancí negativní kontroly. Hodnota absorbance pozitivní kontroly z kitu fy Loewe Biochemica, (SRN), nebo Bioreba (Švýcarsko) by měla být po jedné hodině inkubace $A_{405} > 1,5$. Výrobci udávají hodnotu ještě vyšší.

Složení a příprava roztoků pro provedení ELISA testu na stanovení ASGV je stejné jako při stanovení přítomnosti ApMV (kap. II.1.3).

II.3.4. Vyhodnocení výsledků

Hodnocení výsledků se provádí podle postupu uvedeném v metodice detekce ASGV (kap. II.3.3). Pokud je však hodnota absorbance vzorku nízká a pohybuje se v rozmezí tří až šestinásobku průměrné hodnoty zdravé kontroly, imunoenzymatický test se opakuje s nově odebraným vzorkem. Při testech prováděných ve VÚRV, v.v.i. Praha se hodnoty absorbance vzorků ze zdravých stromů pohybují kolem 0,03, jsou i nižší. Pokud jsou při opakovaném stanovení naměřeny hodnoty absorbance 0,09 a více, resp. přes 0,1, je strom ASGV infikovaný. Upozornění na podstatné rozdíly v naměřených hodnotách při použití mikrotitračních desek od různých výrobců platí obecně i při stanovení ASGV. Pokud má pak negativní kontrola např. hodnotu 0,06, za infikované lze považovat jen ty vzorky, jejichž hodnota absorbance přesahuje 0,18. Ve všech mezních situacích je třeba test opakovat. Pokud hodnota absorbance samotného pufru (blank) přesahuje 0,1, je něco v nepořádku (např. kontaminovaná mikrotitrační deska), a výsledky diagnostiky nemusí být spolehlivé. Je nutno hledat příčinu zvýšeného pozadí. V případě diagnostiky ASGV hodnota absorbance pozitivních vzorků často přesahuje 1,0. Většinou se pohybuje nad 0,5. Použití protilátek od fy Loewe, Biochemica nebo Bioreba AG je zárukou spolehlivých výsledků diagnostiky ASGV.

Ve výzkumu i v diagnostice pro praxi prováděné ve ve VÚRV, v.v.i. Praha byly vždy používány bez problémů protilátky od těchto komerčních výrobců a ani pro výzkumné účely nebylo nikdy třeba připravovat vlastní protilátky k ASGV.

II.4. Komplexní diagnostika ApMV, ACLSV a ASGV

II.4.1. Odběr a příprava vzorků

Pro komplexní stanovení všech tří sledovaných virů jádrovin ApMV, ACLSV a ASGV současně z jednoho odebraného vzorku je nutné odebírat vzorky v období optimálním pro všechny tři testované viry tj. v období intenzivního růstu v době květu jádrovin v dubnu a květnu. Nejvhodnější pro diagnostiku jsou vzorky mladých listů a okvětní plátky. Z výše uvedených důvodů je nejvhodnější diagnostika v čerstvém rostlinném materiálu, nejdéle do jednoho týdne po odběru vzorků. Vzorky se odebírají náhodně po jednom výhonu, ze čtyř míst po obvodu koruny, tzn. 4 výhony tvoří jeden vzorek z testovaného stromu. Vzorky se uchovávají v chladničce při 2-8 °C nejdéle jeden týden. K provedení testu se odebere po jednom listu ze střední části každého výhonu. Ze vzniklého směsného vzorku se odváží průměrný vzorek 0,5 g, který obsahuje přibližně stejný díl listu z každého výhonu původně odebraného rostlinného materiálu. Při použití okvětních plátků k testu se odebere z každého

výhonu stejný počet okvětních plátků. Použití smíšeného vzorku zajišťuje správné vzorkování při předpokladu nerovnoměrně rozmístěného viru v hostitelské dřevině.

II.4.2. Metodický postup detekce

Nejprve se do tří mikrotitračních ELISA desek napipetuje postupně do každé desky do všech 96 jamek po 0,2 ml ApMV, ACLSV a ASGV protilátek zředěných potahovacím pufrem pH 9,6 podle návodu výrobce. Tak se připraví tři samostatné ELISA desky každá pro stanovení jednoho viru. Pokud by se testovalo méně vzorků napipetují se protilátky jen do příslušného počtu jamek, vždy včetně blanku, negativní a pozitivní kontroly. Protilátky v mikrotitračních deskách se inkubují 4 hodiny při 37 °C, potom se 4x promyjí promývacím roztokem. Během inkubace protilátek se zhomogenizují odvážené vzorky listů nebo okvětních plátků po 0,5 g s 10 ml (nebo 0,3 g se 6 ml) extrakčního pufru pH 7,4 (v poměru 1:20). Vlastní homogenizaci vzorků lze provést různými způsoby:

- 1) Ručně pomocí tloučku v třecí misce.
- 2) Ručním homogenizátorem (např. fy Bioreba AG, Švýcarsko), kdy je vzorek s pufrem umístěn v polyetylenovém sáčku.
- 3) Elektrickým homogenizátorem (např. HOMEX 6, fy Bioreba AG, Švýcarsko), kdy je vzorek s pufrem umístěn v polyetylenovém sáčku.

Z každého vzorku se pipetuje po 0,2 ml suspenze do dvou jamek každé mikrotitrační desky, tj. ve dvou opakováních vždy do stejné polohy na každé desce podle zvoleného pipetovacího schématu. Na každou desku se současně se vzorky pipetuje do dvou jamek po 0,2 ml suspenze negativní a pozitivní kontroly příslušného testovaného viru (dodává výrobce soupravy) a jako blank samotný extrakční pufr. Desky se vzorky se inkubují přes noc při 4 °C ve vlhkém boxu nebo jinak chráněné před vysycháním a kontaminací, a následně se pětkrát promyjí promývacím roztokem. Potom se pipetuje do každé desky po 0,2 ml protilátek konjugovaných alkalickou fosfatázou (opět příslušných podle stanovovaného viru na dané desce), které jsou zředěny extrakčním pufrem pH 7,4 podle návodu výrobce. Desky s konjugátem se inkubují 4 hodiny při 37 °C, potom se 5x promyjí promývacím roztokem. Nakonec se do každé jamky všech desek pipetuje po 0,2 ml substrátu. Jako substrát se použije čerstvě rozpuštěný 0,1% 4-nitrofenylfosfát sodný v substrátovém pufru pH 9,8. Mikrotitrační desky se inkubují při laboratorní teplotě mimo dosah přímého slunečního záření. Výsledek imunoenzymatického testu se odečítá na ELISA readeru nejdříve po půl hodině, zpravidla po jedné až dvou hodinách (doba odečtu se průběžně kontroluje a hodnotí se, kdy je žluté zbarvení pozitivních reakcí zřetelné) po přidání substrátu při vlnové délce 405 nm.

Příprava roztoků pro stanovení ApMV, ACLSV a ASGV pomocí ELISA

- 1) potahovací pufr pH 9,6: 1,59 g Na₂CO₃ a 2,93 g NaHCO₃ se rozpustí v destilované vodě, doplní se na jeden litr destilovanou vodou a pH se upraví pomocí HCl nebo NaOH na hodnotu 9,6
- 2) promývací roztok: 8,0 g NaCl, 2,9 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O, 0,2 g KH₂PO₄, 0,2 g KCl a 0,5 ml Tween 20 se rozpustí v destilované vodě, doplní se na jeden litr destilovanou vodou a pH se upraví pomocí HCl nebo NaOH na hodnotu 7,2 - 7,4
- 3) extrakční pufr pH 7,4: 20 g polyvinyl pyrrolidonu (K10 - K40), 2 g hovězího albuminu a 0,1 g NaN₃ se rozpustí v promývacím roztoku, doplní se na jeden litr promývacím roztokem a pH se upraví pomocí HCl nebo NaOH na hodnotu 7,4
- 4) substrátový pufr pH 9,8: 97 ml diethanolaminu a 0,2 g MgCl₂ x 6 H₂O se rozpustí v destilované vodě, doplní se na jeden litr destilovanou vodou a pH se upraví pomocí HCl na hodnotu 9,8.

II.4.3. Vyhodnocení výsledků

Vzorek je považován za pozitivní, resp. daný strom, z něhož vzorek pochází je považován za infikovaný ApMV, ACLSV nebo ASGV pokud průměrná hodnota absorbance obou jeho jamek v příslušné ELISA desce je nejméně třikrát vyšší než průměrná hodnota absorbancí negativní kontroly na dané desce. Hodnota absorbance pozitivní kontroly z kitu fy Loewe Biochemica, (SRN), nebo Bioreba (Švýcarsko) by měla být po jedné hodině inkubace $A_{405} > 1,5$. Pokud je však hodnota absorbance vzorku nízká a pohybuje se v rozsahu tří až šestinásobku průměrné hodnoty zdravé kontroly, imunoenzymatický test je nutno opakovat s nově odebraným vzorkem. Pokud jsou při opakovaném stanovení naměřeny hodnoty absorbance opět minimálně v rozsahu tří až šestinásobku průměrné hodnoty zdravé kontroly, je strom infikován příslušným virem. Mikrotitrační desky od různých výrobců poskytují různé hodnoty absorbance nejen vzorku, ale i negativní kontroly a blanku, a proto by se měly používat desky jen od jednoho vyzkoušeného výrobce. V laboratořích VÚRV, v.v.i. se nejvíce osvědčily desky fy NUNC, Dánsko. Mají vysokou adsorpční schopnost a rychle se na nich odečítají výsledky po napipetování substrátu.

III. Srovnání novosti postupů

„Metodika diagnostiky ApMV, ACLSV a ASGV v odrůdách a podnožích jabloně a hrušně pomocí ELISA“ obsahuje prvně publikované originální postupy spolehlivé diagnostiky třech latentních virů jabloně a jednoho (ACLSV) viru hrušně. Originální postupy diagnostiky ApMV, ACLSV a ASGV byly vypracovány na základě dlouhodobého výzkumu stanovení těchto virů pomocí ELISA ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby v.v.i., Praha-Ruzyně. Zkoumáno bylo zejména nejvhodnější roční období pro stanovení těchto virů v České republice, tj. období s nejvyšší koncentrací viru v rostlinách a nejvhodnější druh rostlinného pletiva pro stanovení viru. Vlastní postupy imunoenzymatického sérologického testu odpovídají postupům uváděným komerčními výrobci protilátek a kitů ELISA s doporučeními pro získání nejspolehlivějších výsledků a upozorněními na možné problémy, které se mohou při imunoenzymatickém stanovení virů jádrovin vyskytnout. Kromě původních vědeckých prací, publikovaných v angličtině, obsahujících dílčí výsledky výzkumu a rozšíření jednotlivých virů v České republice, nebyly kompletní metodické postupy diagnostiky ApMV, ACLSV a ASGV a komplexní podrobné návody v češtině dosud publikovány.

IV. Popis uplatnění certifikované metodiky

Certifikovaná metodika je určena pro ÚKZÚZ Brno, SRS Praha, Ministerstvo zemědělství, odbor rostlinných komodit, a pro systém certifikace zdravotního stavu výsadbového materiálu jádrovin realizovaný v technických izolátech VŠÚO Holovousy a v prostorových izolátech pro jádroviny.

V. Ekonomické aspekty

Zavedení postupů diagnostiky latentních virů jabloně, ApMV, ACLSV a ASGV pomocí ELISA, uvedených v metodice, nepředpokládá další náklady. Uživatelé, tj. ÚKZÚZ Brno, SRS Praha, VŠÚO Holovousy, resp. státní systém (MZe ČR) certifikace zdravotního stavu výsadbového materiálu jádrovin, vč. ozdravování a získávání viruprostých odrůd jabloně a hrušně, mají fungující diagnostické laboratoře, které provádějí diagnostiku uvedených virů podle postupů předepsaných příslušnými komerčními výrobci protilátek a kitů

ELISA. Předkládané postupy diagnostiky vzniklé experimentální činností ve VÚRV v.v.i. Praha-Ruzyně specifikují optimální dobu odběru vzorků v podmínkách ČR, a rostlinné pletivo vhodné pro spolehlivou diagnostiku latentních virů jaderovin. Na základě experimentálních výsledků výzkumu upozorňují na možné problémy a předkládají konkrétní řešení problémů, které se mohou v průběhu diagnostiky virů vyskytnout. Realizace metodiky povede ke zvýšení spolehlivosti praktické diagnostiky virů jabloně a hrušně v České republice.

Ekonomické přínosy spolehlivé diagnostiky virů jaderovin se projeví u cílového uživatele, pěstitelů ovoce sdružených v Ovocnářské unii ČR. Ekonomické přínosy jsou vyjádřeny v hodnotě zvýšené produkce konzumních jablek. Jabloně se v roce 2010 pěstovaly na ploše 9.026 ha, plocha intenzivních sadů jabloní stagnuje, průměr za léta 2006-2010 je 9.058 ha. Výnos dosáhl v roce 2010 celkem 13,51 t/ha a byl podprůměrný, průměr za léta 2006-2010 je 15,77 t/ha. Průměrná cena u producentů konzumních jablek dosáhla v roce 2010 7.900,- Kč/t. Škodlivost virů jaderovin nebyla dosud v ČR zkoumána, proto je nutno se opírat o zahraniční údaje výzkumu, které uvádějí snížení výnosů o 40%, pokud jsou stromy jabloně infikovány směsnou infekcí dvěma viry. Podle výsledků našeho výzkumu je většina výsadeb infikována minimálně dvěma, většinou i třemi viry najednou. Proto je v případě pěstování viruprostých odrůd zvýšení výnosů o 40 % reálné. Pokud se podaří ozdravit jen 50 % sadů, resp. vysadit 4500 ha nových sadů viruprostými odrůdami, stoupne výnos na této ploše z 15 t/ha na 21 t/ha, což představuje zvýšení produkce o 27.000 t ročně. Při realizační ceně 7.900,- Kč/t dosáhne přínos 213.300.000,- Kč. Diagnostika se na procesu ozdravování a zvýšení výnosů ozdravených odrůd podílí cca 10 %. Kdybychom počítali pouze s pětiprocentním přínosem diagnostiky na ozdravení sadů, dosáhne ekonomický přínos pro uživatele 10,7 mil. Kč ročně. Z uvedeného výpočtu jsou zřejmé vysoké rezervy, které jsou na úseku ozdravování výsadeb ovocných dřevin, resp. naléhavá potřeba systému certifikace, získání a pěstování viruprostých stromů jabloně a hrušně.

VI. Seznam použité související literatury

- Babović M.V., Delibasić G.P., 1986: Appearance and distribution of chlorotic leafspot virus on different apple cultivars. *Acta Hort.* 193: 81-89.
- Bar-Joseph M., Hull R., Lane L.C., 1974: Biophysical and biochemical characterization of apple chlorotic leafspot virus. *Virology* 62: 563-566.
- Bradford F.C. Joley L., 1933: Infectious variegation in the apple. *J. Agr. Res.* 46: 901-908.
- Brunt A.A., Crabtree K., Dallwitz M.J., Gibbs A.J., Watson L., 1996: *Viruses of Plants*. CAB int., Wallingford, UK: 105-108.
- Campbell A.I., 1963: The effect of some latent virus infections on the growth and cropping of apples. *J. Hort. Sci.* 38: 15-19
- Clark, M. F., Adams, A. N., 1977: Characteristic of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant virus. *J. Gen. Virology* 34: 475-483.
- Cropley R., 1963: The association of a sap transmissible virus with apple chlorotic leafspot. *Plant Dis. Repr.* 47: 165-167.
- Fritzsche R., Kegler H., 1968: Nematoden als Vektoren von Viruskrankheiten der Obstgehölze. *Tagungsber. DAL DDR, Berlin* 97: 289-295.
- De Sequeira O.A., 1967: Studies on a virus causing stem grooving and graftunion abnormalities in Virginia Crab apple. *Ann. Appl. Biol.* 60: 59-66.
- Desvignes J.C., 1999: *Virus Diseases of Fruit Trees*. Ctifl, Paris: 150-151.
- Dettienne G., Delbos R., Dunez J., 1980: Use and versatility of the immunoenzymatic ELISA procedure in the detection of different strains of an apple chlorotic leafspot virus. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* 15: 39-45.
- Flegg C.L., Clark M.F., 1979: The detection of apple chlorotic leaf spot virus by a modified procedure of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Ann. Appl. Biol.* 91:61-65.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) 1991/2975. Scheme for the production of certified virus-free or virus-tested fruit trees and rootstocks.
- Fuchs E., 1981: Serological detection of apple chlorotic leaf spot virus (CLSV) and apple stem grooving virus (SGV) in apple trees. *Acta Hort.* 94: 69-73.
- Fuchs E., 1982: Studies of the development of concentration of Apple chlorotic leaf spot virus (CLSV) and Apple stem grooving virus (SGV) in apple trees. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* 17 (1-2): 23-27.
- Fuchs E., Merker D., 1985: Partielle Reinigung des chlorotischen Blattfleckungs - Virus des Epfels (apple chlorotic leaf spot virus) und Antiserum Herstellung. *Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz* 21: 101-110.

- Fuchs E., Merker D., Kegler H., 1979: Der Nachweis des Chlorotischen Blattfleckungs-Virus Des Apfels (apple chlorotic leaf spot virus), des Stammfurchungs-Virus (apple stem grooving virus) und des Tomatenzwergebush-Virus (tomato bushy stunt virus) mit dem ELISA. Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz 15: 421-424.
- Howell W.E., Mink G.I., 1995: *Malus micromalus* clone GMAL 273: A new woody plant indicator for rapid detection of apple stem grooving virus. Acta Hort. 386: 439-443.
- Kirkpatrick H.C., Linder R.C., 1964: A mechanically transmissible virus latent in apple. Phytopathology 54: 229 – 232.
- Lemmetty A., 1989: Isolation and purification of apple chlorotic leaf spot virus and its occurrence in finnish orchards. Acta Hort. 235: 177-180.
- Lister R.M., Hadidi A.F., 1971: Some properties of apple chlorotic leaf spot virus and their relation to purification problems. Virology 45: 240-251.
- Martelli G.P., Candresse T., Namba S., 1994: Trichovirus, a new genus of plant viruses. Arch. Virol. 134, 451-455.
- Matic S., Sanchez-Navarro J. A., Mandic B., Myrta A., Pallas V., 2008: Tracking three ilarviruses in stone fruit trees throughout the year by ELISA and tissue-printing hybridization. J. Plant Pathol. 90: 137-141.
- Mink G.I., Shay J.R., 1959: Preliminary evaluation of some Russian apple varieties as indicators for apple viruses. Suppl. Plant Dis. Repr. 254: 13.
- Nemeth M., 1986: Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees. Akademiai Kiado, Budapest.
- Plant Viruses Online, 2010: [www document]. [cit. 22. 11. 2010]. Dostupné na: <http://pvo.bio-mirror.cn/sppindex.htm>.
- Roossinck M. J., Bujarski J, Ding S. W., Hajimarad R., Hanada K, Scott S, Tousignant M., 2005: *Bromoviridae*. In: Fauquet C. M., Mayo M. A, Maniloff J., Desselberger U., Ball L. A. (eds.), Virus Taxonomy. Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 1049-1058. Elsevier/Academic Press, Amsterdam, The Netherlands.
- Saksena K.N., Mink G.I., 1969: Purification and properties of apple chlorotic leaf spot virus. Phytopathology 59: 84-88.
- Sequeira O.A., Lister R.M., 1969: Purification and relationships of some filamentous viruses from apple. Phytopathology 59: 1740-1749.
- Torrance L., Dolby C. A., 1984: Sampling conditions for reliable routine detection by enzyme-linked immunosorbent assay of three ilarviruses in fruit trees. Annals Appl. Biology 104: 267-276.
- Varveri C., Bem F., 1995: Viruses of stone and pome fruit mother-tree plantations in Greece. Acta Hort. 386: 431-438.

White R.P., 1928: Plant Dis. Repr. 12: 33.

Wu J.R., Zhang D.M., Chen S.Y., Wang X.F., Wang W.H., 1998: Comparison of three ELISA methods for the detection of apple chlorotic leaf spot virus and apple stem grooving virus. Acta Hort. 472: 55-59.

Yosikawa N., Sasaki E., Kato M., Takahashi T., 1992: The nucleotide sequence of *Apple stem grooving Capillovirus* genome. Virology 191: 98-105.

VII. Seznam publikací, které předcházely metodice

Hassan M., Myrta A., Polák J., 2006: Simultaneous detection and identification of four pome fruit viruses by one-tube pentaplex RT-PCR. J. Virol. Methods 133: 124-129.

Kundu J.K., 2003: The occurrence of *Apple stem pitting virus* and *Apple stem grooving virus* within field-grown apple cultivars evaluated by RT-PCR. Plant Protect. Sci. 39: 88-92.

Kundu J.K., Svoboda J., Polák J., 2003: Detection of Apple stem grooving virus from different tissues of apple trees throughout the year. Plant Protect. Sci. 39: 93 - 96.

Polák J., Svoboda J., 2006: The reliability of detection and the distribution of Apple *chlorotic leaf spot virus* in pears in the Czech Republic. Hort. Sci. (Prague) 33: 7-10.

Polák J., Zieglerová J., Bouma J., 1997: Diagnosis and distribution of apple chlorotic leafspot virus in pome fruits in the Czech Republic. Hort. Sci. (Prague) 24: 89 - 94.

Polák J., Zieglerová J., 2001: Distribution of *Apple stem grooving virus* in apple trees in the Czech Republic. Plant Protect. Sci. 37: 1-4.

Svoboda J., Polák J., 2010: Relative concentration of *Apple mosaic virus* coat protein in different parts of apple tree. Hort. Sci. (Prague) 37: 22-26.