



MOLEKULÁRNA DIAGNOSTIKA VYBRANÝCH VÍRUSOVÝCH PATOGENOV RAJČIAKA JEDLÉHO (*SOLANUM LYCOPERSICUM*) VYSKYTUJÚCICH SA NA ÚZEMÍ SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**Jana Tomašechová, Zdeno Šubr, Lukáš Predajňa, Nina Sihelská, Jozef Gubiš,
Ján Kraic, Daniel Mihálik, Miroslav Glasa**

Biomedicínske centrum SAV, Virologický ústav, Bratislava

NPPC - Výskumný ústav rastlinnej výroby, Piešťany

Fakulta prírodných vied, UCM, Trnava

Výskumný ústav vysokohorskej biológie, Žilinská univerzita, Žilina

Bratislava, 2019

Názov:

Molekulárna diagnostika vybraných vírusových patogénov rajčiaka jedlého (*Solanum lycopersicum*) vyskytujúcich sa na území Slovenskej republiky.

Autori:

Mgr. Jana Tomašechová ^{1, 3}

RNDr. Zdeno Šubr, CSc. ¹

Mgr. Lukáš Predajňa, PhD. ¹

RNDr. Nina Sihelská ¹

Ing. Jozef Gubiš, PhD. ²

Prof. RNDr. Ján Kraic, PhD. ^{2, 3}

Mgr. Daniel Mihálik, PhD. ^{2, 3, 4}

Ing. Miroslav Glasa, DrSc. ¹ (vedúci autorského kolektívu)

¹Biomedicínske centrum SAV, Virologický ústav, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava

²Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum – Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany

³Katedra biotechnológií, Fakulta prírodných vied UCM, Nám. J. Herdu 2, 91701 Trnava

⁴Výskumný ústav vysokohorskej biológie, Žilinská univerzita, Žilina

Oponent:

Ing. Jiban Kumar, PhD.

Výskumný ústav rastlinnej výroby, v.v.i., Praha, Česká republika

Počet strán: 27

Rok vydania: 2019

Vydavateľ: Biomedicínske centrum SAV, Dúbravská cesta 9, 84505 Bratislava

ISBN: 978-80-972111-4-1



Obsah

1. Význam rajčiaka jedlého	5
2. Vírusové patogény rajčiaka	6
2.1. Vírus Y zemiaka	7
2.2. Vírus mozaiky uhorky	8
2.3. Vírus M zemiaka	10
2.4. Vírus S zemiaka	10
2.5. Vírus mozaiky rajčiaka	11
3. Detekcia	12
4. Vlastný popis metodiky detekcie vírusov rajčiaka	13
4.1 Zber vzoriek	13
4.2. ELISA	13
4.3. RT-PCR	17
4.3.1. Izolácia celkovej RNA	17
4.3.2. Príprava komplementárnej DNA (cDNA)	17
4.3.3. PCR	18
Použitá literatúra	21

1. Význam rajčiaka jedlého

Rajčiak jedlý (*Solanum lycopersicum* L.) patrí medzi poľnohospodárske plodiny pestované a konzumované ľuďmi na celom svete (Friedman, 2013). Jeho plody sú všeobecne obľúbené na konzumáciu za surova aj v tepelne upravených pokrmoch, navyše obsahujú fytochemikálie dôležité pre zdravú výživu (fenolové zlúčeniny, karotenoidy, vitamíny, glykoalkaloidy) a prospešné pri prevencii rôznych degeneratívnych porúch (Chaudhary a kol., 2018).

Predpokladá sa, že rajčiaky pochádzajú z úpätí Ánd. Pestovanie žltých rajčiakov podobnej veľkosti ako dnešné je doložené v strednej Amerike už okolo roku 700 n.l. Domestikácia rajčiakov začala v Mexiku (Peralta a Spooner, 2007). V Európe boli prvýkrát pestované v roku 1544 ako okrasné rastliny (v tom čase boli považované za toxické), až neskôr boli používané na konzum. S rozvojom poľnohospodárstva a využívaním progresívnych agrotechnických postupov (zavlažovanie, využívanie agrochemikálií) sa zvýšila produkcia rajčiakov po celom svete. V deväťdesiatych rokoch 20. storočia vďaka pokrokom v biotechnológiách a pomocou genetických modifikácií získali rajčiaky lepšiu farbu, chuť, a taktiež sa začala zlepšovať ich skladovateľnosť a priaznivý obsah živín (Saavedra a kol., 2017).

V roku 2017 celosvetová produkcia rajčiakov dosiahla 170,8 milióna ton. Popredným producentom rajčiakov je Čína s približne 30% podielom celkovej produkcie, nasledujú India a USA. V Európskej únii tvorili rajčiaky v roku 2014 23 % celkovej produkcie čerstvej zeleniny. Z toho bola viac ako polovica rajčiakov produkovaných v Španielsku, Taliansku a Poľsku. Celosvetový vývoz rajčiakov v roku 2017 dosiahol 88 miliárd USD (FAOSTAT, 2017). Na Slovensku je približne 700 ha registrovaných plôch osadených rajčikom, k čomu treba pripočítať plochy ich častého pestovania v záhradách.

Rajčiaky sú pestované najčastejšie v poľných podmienkach, kde je ich rast ovplyvňovaný klimatickými zmenami, v poslednej dobe sa však veľká časť produkcie presúva do krytých skleníkových priestorov, kde sa negatívne vplyvy počasia eliminujú. V skleníkových podmienkach je taktiež možné zabezpečiť vyššiu kvalitu plodiny pre spotrebiteľa, najmä s ohľadom na ich výživové parametre, veľkosť, chuť a farbu. Optimálna denná teplota na pestovanie v skleníku je 21 až 27°C, zatiaľ čo nočná optimálna teplota sa pohybuje medzi 16 až 17°C. Ak teplota klesne pod 15°C, môžu sa vyskytnúť príznaky nedostatku živín, pretože rastliny nemôžu pri nižších teplotách absorbovať niektoré minerály (napr. zvlhnenie listov následkom nedostatku fosforu). Literatúra uvádza ako optimálnu relatívnu vlhkosť pre skleníkové rajčiaky 60-70 %. Optimálny rozsah pH pre živný roztok je 5,6-5,8 (Snyder, 1995).

Konzumácia rajčiakov má pozitívne účinky na ľudské zdravie. Sú známe protizápalové, anti-genotoxické, protimutagénne, antiproliferačné a chemopreventívne účinky (Rafi a kol., 2007; Scolastici a kol., 2007). Karotenoidy (lykopén) a vitamíny (kyselina askorbová a tokoferol) v rajčiakoch majú význam pri znižovaní oxidačného stresu a minimalizácii rizika rakoviny a kardiovaskulárnych chorôb (Sesso a kol., 2004). Lycopén a iné bioaktívne látky spôsobujú zastavenie bunkového cyklu a inhibujú rast mnohých nádorových bunkových línií. Viaceré štúdie *in vitro* ukázali ochranné účinky lykopénu získaného z rajčiakov proti rôznym druhom nádorových ochorení, ako aj vplyv na zníženie celkového cholesterolu (Gloria a kol., 2014; Levy a kol., 1995; Palozza a kol., 2010). Oxidačná modulácia lipoproteínov s nízkou hustotou (LDL) má veľký význam pri ochrane proti ateroskleróze a kardiovaskulárnym chorobám.

Spotreba paradajok nepriamoúmerne koreluje s rizikom zápalových porúch ako je ateroskleróza (Hazewindus a kol., 2014).

Fenolické zlúčeniny prítomné v rajčiakoch zahŕňajú fenolové kyseliny (kofeín, chlorogénne, sinapické, p-kumarické a ferulové kyseliny) a flavonoidy (kvercetín, rutín, kemferol a naringenín). Akumulácia flavonoidov v plodoch sa zvyšuje počas ich dozrievania. Kvercetín a kyselina chlorogénová sú najviac zastúpené flavonoidy v rajčiakoch (Sharma a kol., 2017). Množstvo aktívnych antioxidantov bolo vďaka špecifickým postupom väčšie pri priemyselne vyrábanej rajčinovej šťave než v prípade domáceho pretlaku (Tomas a kol., 2017).

Rajčiaky sú považované za bohatý zdroj vitamínu C, plody obsahujú aj vitamíny A, B, E. Štúdie odhalili, že obsah vitamínu C sa najskôr v priebehu dozrievania zvyšuje, následne pri prezrievaní mierne klesá (Marti a kol., 2018). Zo skupiny vitamínov B je prítomný tiamín, niacín, vitamín B6 a foláty. Vitamín E (alfa a beta tokoferol) je prítomný v menšom množstve ako iné vitamíny. Obsah vitamínov v rajčiakoch je ovplyvnený typom odrody a dobou zberu (Watada a kol., 1976).

2. Vírusové patogény rajčiaka

Oficiálnym jazykom taxonómie rastlinných vírusov je angličtina, pričom názvy vírusov zvyčajne opisujú niektorý z typických príznakov ochorenia a druh rastliny, z ktorej bol ten-ktorý vírus prvýkrát izolovaný. Z globálneho hľadiska patria medzi najvýznamnejšie vírusy ohrozujúce rajčiak vírus škvrnitého vädnutia rajčiaka (Tomato spotted wilt virus), vírus žltej kučeravosti listov rajčiaka (Tomato yellow leaf curl virus), vírus kríčkovitej zakrpatenosti rajčiaka (Tomato bushy stunt virus), vírus krúžkovitosti rajčiaka (Tomato ringspot virus), vírus mozaiky pepina (Pepino mosaic virus), alebo vírus hnedej vráskavosti plodov rajčiaka (Tomato brown rugose fruit virus). Hoci na Slovensku zatiaľ zistené neboli, dá sa očakávať, že globálne faktory či už ekonomického (obchod) alebo ekologického (zmena klímy) charakteru môžu časom spôsobiť rozšírenie ich výskytu. Z vírusov potenciálne alebo reálne nebezpečných v súčasnosti pre rajčiaky na našom území treba spomenúť najmä:

- Vírus Y zemiaka (Potato virus Y, PVY)
- Vírus mozaiky uhorky (Cucumber mosaic virus, CMV)
- Vírus M zemiaka (Potato virus M, PVM)
- Vírus S zemiaka (Potato virus S, PVS)
- Vírus mozaiky rajčiaka (Tomato mosaic virus, ToMV)

Bližšia charakterizácia týchto vírusov, ako aj špecifikácia diagnostických nástrojov na ich detekciu je prezentovaná v nasledujúcich kapitolách.

2.1. Vírus Y zemiaka

Vírus Y zemiaka (PVY) patrí do rodu *Potyvirus* z čeľade *Potyviridae* a je typovým predstaviteľom svojho rodu (Shukla a kol., 1994). Je to jeden z najdôležitejších rastlinných vírusov, ktoré negatívne ovplyvňujú produkciu zelenín a okopanín.

Vírusové častice (virióny) PVY majú tvar ohybných vlákien daný helikálnou symetriou. Genóm je tvorený jednovláknovou RNA pozitívnej polarite o veľkosti približne 9,7 kb, na 5' konci má naviazaný vírusový proteín VPg a na 3' konci je polyadenylovaná. Genóm obsahuje jeden otvorený čítací rámec, ktorý je exprimovaný ako veľký polyproteín štiepený následne tromi vlastnými proteázami na 10 zrelejších vírusových proteínov. Jeden ďalší proteín vzniká mechanizmom posunu čítacieho rámca. Kapsidový proteín má veľkosť asi 35 kDa.

PVY má širokú škálu hostiteľov, prirodzene infikuje rastliny prinajmenšom z deviatich čeľádí, vrátane papriky (*Capsicum* spp.), zemiaku (*Solanum tuberosum* ssp.), tabaku (*Nicotiana* spp.), rajčiaku (*Solanum lycopersicum*), niektoré okrasné rastliny (*Dahlia* spp., *Petunia* spp.). PVY infikuje bežne sa vyskytujúce hostiteľské buriny, ako je čakanka (*Cichorium intybus*), šalát kompasový (*Lactuca serriola*), púpava lekárska (*Taraxacum officinale*), kapsička pastierska (*Capsella bursa-pastoris*), ľuľok sladkohorký (*Solanum dulcamara*), ľuľok čierny (*Solanum nigrum*) a rôzne iné (*Datura* spp., *Physalis* spp., *Solanum dulcamara*, *S. nigrum*) (Jeffries, 1998; Kaliciak a Syller, 2009). Okruh experimentálnych hostiteľov zahŕňa 495 druhov zo 72 rodov, z toho 287 druhov v 14 rodoch *Solanaceae*, 28 druhov *Amaranthaceae*, 25 druhov *Leguminosae*, 20 druhov *Chenopodiaceae* a 11 druhov *Compositae* (Edwardson a Christie, 1997).

PVY bol prvýkrát pozorovaný na zemiakoch v roku 1931 (Smith, 1931) ako člen skupiny patogénov spojených s degeneráciou zemiakov v mnohých oblastiach sveta. Vírus je zodpovedný za pokles výnosov a kvality, pre zamedzenie šírenia choroby je potrebná dôsledná kontrola a certifikácia sadbového materiálu (Gray a kol., 2010). Vírus je totiž účinne prenosný vegetatívne rozmnožovateľským materiálom (pri zemiakoch hľuzy), prirodzenými prenášačmi sú okrem toho rôzne druhy vošiek. Neperzistentný spôsob prenosu (okamžite po krátkom nadobúdaní cicaní) takisto sťažuje jeho kontrolu (Scholthof a kol., 2011; Karasev a Gray, 2013).

Opatrenia na zníženie strát spôsobené vírusovými infekciami sú pomerne nákladné. Hoci šírenie vírusu môže byť kontrolované niekoľkými metódami, vrátane chemickej ochrany pred vírusovými vektormi, elimináciou infekčných zdrojov a pestovaním nových odrôd s vyššou odolnosťou (Kang a kol., 2005), tieto opatrenia nie sú vždy dostatočne efektívne. Odolné kultivary sa považujú za najekonomickejší a environmentálne prijateľný spôsob kontroly vírusového ochorenia zemiakov (Solomon-Blackburn a Barker, 2001).

PVY má značnú vnútrodruhovú diverzitu. Známych je viacero kmeňov vírusu, pričom v evolučnej histórii niektorých z nich hrala významnú úlohu homologická rekombinácia (Karasev a Gray, 2013). Ide o proces vzájomne kombinujúci časti genómu už existujúcich foriem vírusu, ktorý má vplyv na adaptabilitu patogéna (Karasev a kol., 2011). Tradične rozoznávame dve hlavné biologické skupiny PVY s odlišnou symptomatológiou na zemiakoch a niektorých líniiach tabaku. Sú to tzv. obyčajný kmeň (PVY^O) a nekrotický kmeň (PVY^N). Ďalšie kmene sú napr. PVY^C, PVY^E a PVY^Z (Karasev a Gray, 2013). Rekombinácia medzi skupinami PVY

viedla k vzniku nových skupín a kmeňov, napr. PVY^{NTN}, PVY^{N-Wi}, PVY^{N:O}, ktoré majú tendenciu rozširovať sa po celom svete. Detailné molekulárne prístupy umožnili charakterizovať a klasifikovať kmene PVY na základe charakteristík genómu (Lorenzen a kol., 2006; Chikh a kol., 2010), avšak niekedy bez jasného spojenia s ich biologickými vlastnosťami (Karasev a Gray, 2013). Takáto komplexná variabilita môže komplikovať správnu identifikáciu izolátov najmä sérologickými testami (Tian a kol., 2014).

Na zemiaku sa infekcia prejavuje rôzne intenzívnou mozaikou alebo pruhmi na listoch, či nekrózou. Listy opadávajú, až sa často vytvorí holý výhonok s olistenou špičkou. Nekrotické kmene spôsobujú aj nekrotické ochorenie zemiakových hľúz (Beczner a kol., 1984). PVY je celosvetovo rozšírený patogén aj pri iných ekonomicky významných plodinách, ako sú paprika, tabak a rajčiak. Na rastlinách papriky (*Capsicum* spp.), sa infekcia prejavuje miernou škvrnitosťou listov. Príznaky infekcie PVY na rajčiakoch môžu zahŕňať zvrásnenie mladých listov, nekrotické škvrny, mozaiky a často medzižilové žlté škvrny či mramorovanie listov (Abad a Jordá, 2000). Na plodoch rajčiaka vírus príznaky zvyčajne netvorí. Závažnejšie príznaky sa vyskytujú pri zmiešaných infekciách s inými vírusmi. Zatiaľ nie sú známe rezistentné odrody rajčiaka, zdrojom génov rezistencie by mohol byť divý rajčiak *Lycopersicon hirsutum* (Legnani a kol., 1995). Ochrana spočíva predovšetkým v eliminácii hmyzích prenášačov vírusu (ochranné textílie, skorá sadba mimo hlavnej sezóny množenia vošiek a pod.).

2.2. Vírus mozaiky uhorky

Vírus mozaiky uhorky (CMV), typový predstaviteľ rodu *Cucumovirus* bol prvýkrát pozorovaný v roku 1916 ako pôvodca ochorenia uhorky v USA. Odvtedy sa CMV zistil vo väčšine krajín sveta, prevažne v miernych zónach, ale čoraz častejšie aj v tropických krajinách. V mnohých prieskumoch infekcie rastlinných vírusov je CMV uvádzaný ako najrozšírenejší vírus (Ilman a kol., 1991). V poslednom desaťročí bol CMV identifikovaný ako pôvodca viacerých epidémií chorôb vrátane nekrózy spôsobenej na rajčinách v Taliansku (Gallitelli a kol., 1981), v Španielsku (Garcia-Arenal, 1981) a v Japonsku (Yoshida a kol., 1984). CMV má v rámci rastlinných vírusov najväčší rozsah prirodzených hostiteľov a počet identifikovaných hostiteľských druhov CMV sa neustále zvyšuje. V súčasnosti je to 775 druhov z 365 rodov z 85 čeľadí. Reálne číslo zahŕňa zrejme viac ako 800 druhov rastlín vrátane mnohých burín.

Existuje mnoho kmeňov CMV, líšiacich sa biologickými vlastnosťami (vykazujúcich rozdiely v príznakoch indukovaných v rôznych hostiteľských rastlinách). V rámci CMV rozoznávame tri podskupiny, IA, IB a II, pričom divergencia v nukleotidovej sekvencii medzi nimi dosahuje 25 % (Roossinck a kol., 1999). CMV sa tak preukázal ako vysoko adaptabilný vírus, s mimoriadnou kapacitou pre evolučnú zmenu. Z toho dôvodu predstavuje hrozbu pre poľnohospodárstvo na celom svete, ale aj ideálny model pre štúdium vývoja RNA vírusov.

Genóm CMV je rozdelený na tri segmenty jednovláknovej RNA s pozitívnou polaritou. Kóduje celkovo päť proteínov. Monocistronická RNA1 kóduje proteín 1a s metyltransferázovou a helikázovou aktivitou esenciálny pre replikáciu vírusu (Kadaré a Haenni, 1997; Rozanov a kol., 1992). RNA2 kóduje proteíny 2a (RNA polymeráza) a 2b (inhibitor post-transkripčného zhášania génov) (O'Reilly a Kao, 1998; Ding a kol., 1994; Brigneti a kol., 1998). RNA3 kóduje transportný proteín exprimovaný z 5' ORF a kapsidový proteín, ktorý je však exprimovaný zo

subgenómovej RNA4. Obidva sú potrebné pre pohyb vírusu v infikovanej rastline (Canto a kol., 1997).

S CMV bývajú často asociované satelitné RNA (satRNA). Sú to malé lineárne nekódujúce RNA, replikačne závislé od CMV (García-Arenal a Palukaitis, 1999). Prítomnosť satRNA môže mať dramatický vplyv na symptómy vyvolané CMV (Yoshida a kol., 1985). V niektorých prípadoch satRNA môže indukovať v paradajkách apoptózu, čo vedie k systémovej nekróze až prípadne k uhynutiu rastliny (Xu a Roossinck, 2000).

CMV je prenášaný najmenej 75 druhmi vošiek neperzistentným spôsobom (Palukaitis a kol., 1992) a pri viacerých hostiteľoch je prenosný aj osivom. Príznaky na rastlinách rajčiaka môžu byť podobné ako vyvoláva infekcia ToMV – rôzne intenzívne mozaiky na listoch, poruchy rastu vedúce k degenerácii listovej plochy a transformácii listov do tvaru úponkov.



Príznaky CMV infekcie na rajčiaku cv. Monalbo

2.3. Vírus M zemiaka

Vírus zemiaka M (PVM) patrí do rodu *Carlavirus* (čľaď *Betaflexiviridae*). Vlákňité vírusové častice (veľkosť 650-680 nm x 10-12 nm) obsahujú genóm tvorený jednovláknovou RNA pozitívnej polarity o veľkosti približne 8,5 kb s „čiapočkou“ na 5' konci a polyA chvostom na 3' konci, ktorý obsahuje šesť otvorených čítacích rámcov. Vírusová RNA je obalená kapsidovým proteínom o veľkosti 34 kDa (Zavriev a kol., 1991).

PVM je považovaný za jeden z najrozšírenejších ekonomicky závažných patogénov zemiakov. Môže spôsobiť zníženie produkcie o 15-45 % a niektoré odrody môžu byť v niektorých oblastiach až 100% infikované. PVM spôsobuje škvrny, mozaiku, zvlnenie a zvinovanie listov a zakrpatenie výhonkov. Tieto príznaky sú podobné ako pri infekcii inými bežnými vírusmi zemiakov vrátane vírusu zemiaka S, vírusu zemiaka X a bežného kmeňa PVY^O. Závažnosť symptómov sa líši v závislosti od kombinácie kultivarov zemiakov a izolátov PVM. Väčšina izolátov však infikuje rastlinu bez príznakov, prípadne môžu vyvolať veľmi miernu chlorózu a skrútenie listov. Pokiaľ sa PVM vyskytuje v komplexe s inými vírusmi (najmä PVS), symptómy sú zvyčajne výraznejšie.

V infikovaných bunkách sa nachádzajú inklúzie nepravidelného tvaru a vezikuly pozostávajúce z častí endoplazmatického retikula, obsahujúce ribozómy a vírusové častice. Virióny PVM sa vyskytujú v infikovaných rastlinách aj rozptýlené v cytoplazme nezrelých parenchýmových buniek alebo ako agregáty tvoriace parakryštály či pásikové telieska (Edwardson a Christie, 1997).

Vírus je prenosný voškami neperzistentným spôsobom. Paprika (*Capsicum annuum* a *C. frutescens*) je tiež prirodzeným hostiteľom vírusu, ako aj viaceré druhy burín vrátane *Datura metel*, *Fumaria officina* a *Solanum fernandezianum* (Valkonen a kol., 1992). Na rajčiaku sa PVM vyskytuje zvyčajne v komplexe s inými vírusmi (CMV, PVS, PVY). Nedávno bola na Slovensku zistená na rajčiakoch nová, pomerne divergentná forma PVM (Glása a kol., 2019).

2.4. Vírus S zemiaka

Vírus zemiaka S (PVS) taxonomicky zaraďujeme takisto do rodu *Carlavirus*. Vlastnosti viriónov a štruktúra genómu sú teda analogické ako pri PVM. To isté platí o jeho prenosnosti voškami.

PVS patrí medzi vyše 30 vírusových patogénov infikujúcich zemiaky v celosvetovom meradle. Na základe schopnosti systémovej infekcie (resp. indukcie lokálnych lézií) zástupcov rodu *Chenopodium* rozlišujeme dva kmene PVS, a to PVS^O (ordinary) a PVS^A (Andean). Biologické rozdiely medzi týmito kmeňmi sú pripisované sekvenčným odlišnostiam ich kapsidového proteínu a nukleotidy viažuceho 11K proteínu (Foster a Mills, 1992).

Infekcie prevažného množstva kultivarov zemiakov spôsobené väčšinou izolátov PVS bývajú bezpríznakové, alebo len s miernymi príznakmi na listoch ako je vráskavitosť, tmavnutie žilnatiny a hnednutie (bronzovatenie) listov, výnimočne pri citlivých odrodách dochádza k výraznejšiemu prejavu infekcie. V prípade zmesných infekcií s inými vírusmi ako vírus

zemiaku A či PVY však PVS synergisticky zvyšuje intenzitu prejavov ochorenia a môže viesť k 10-20% stratám na úrode.

Bolo popísaných mnoho izolátov PVS, ale rozdiely v ich biologických vlastnostiach sú ešte menej výrazné ako u príbuzného PVM (Kowalska, 1978). Samotný PVS (pokiaľ nie je v zmesi s inými vírusmi) zvyčajne spôsobuje bezpríznakovú infekciu (Manzer a kol., 1978). Na Slovensku bol PVS zistený v rajčiaku na viacerých lokalitách, išlo vo všetkých prípadoch o izoláty kmeňa PVS⁰ (Predajňa a kol., 2017).

2.5. Vírus mozaiky rajčiaka

Vírus mozaiky rajčiaka (ToMV) patrí do rodu *Tobamovirus* a je blízko príbuzný známemu vírusu mozaiky tabaku (TMV). Rozsah prirodzených hostiteľov nie je veľmi široký, ToMV infikuje viacerých zástupcov Ľulkovitých (*Solanaceae*) a mrlíkovitých (*Chenopodiaceae*). Medzi ekonomicky významné hostiteľe patria okrem rajčiaka najmä paprika, tabak a z okrasných rastlín petúnie (Hollings a Huttinga, 1976). ToMV patrí medzi vírusy, ktorých prenos nie je sprostredkovaný špecifickým prenášačom. Rozširuje sa mechanicky cez poranenia prostredníctvom šťavy z infikovaných rastlín, kritická je teda manuálna aj strojová manipulácia s rastlinami počas vegetatívnej fázy. S týmto spôsobom prenosu súvisí extrémna stabilita vírusu *in vitro*. ToMV sa efektívne prenáša aj semenom (ako povrchová kontaminácia osiva), pričom vírus sa dá eliminovať chemickým ošetrením osiva (Dombrovsky a Smith, 2017).

Viriónmi sú rigidné (neohybné) tyčinky s rozmermi asi 300 x 18 nm (Hollings a Huttinga, 1976). Genómom je jednovláknová RNA pozitívnej polarity s veľkosťou asi 6,5 kb s čiapočkou na 5' konci a so štruktúrou podobnou tRNA na 3' konci. Genóm kóduje dve formy replikačného proteínu (kratšiu a dlhšiu vďaka potlačeniu terminácie translácie) a ďalšie dva produkty (transportný 30K proteín a kapsidový proteín s veľkosťou 18 kDa), ktoré sa však exprimujú zo subgenomických RNA (Skulachev a kol., 1999). Typickými príznakmi sú svetlé a tmavé škvrny na listoch a rastové anomálie vedúce k vzhľadu podobnému papradiam. Aj na plodoch sa môžu objavovať žlté alebo nekrotické škvrny. Kmeňová diferenciácia izolátov je založená najmä na rôznej schopnosti prekonávať tri známe gény rezistencie *Tm-1*, *Tm-2* a *Tm-2²*, čo však nekoreluje s ich sérologickou príbuznosťou (Lanfermeijer a kol., 2005).



Porovnanie rastu zdravej (vpravo)
a ToMV-infikovanej rastliny rajčiaka

3. Detekcia

Negatívny vplyv rastlinných vírusov na celosvetovú poľnohospodársku produkciu je impulzom pre hľadanie efektívnych prostriedkov na zmiernenie, či zamedzenie šírenia vírusových nákaz. Využitie moderných metód biologického výskumu v šľachtiteľskej a pestovateľskej praxi zjednodušuje a zefektívňuje boj proti širokému spektru patogénov, vrátane rastlinných vírusov. V súčasnosti sa preto vďaka aplikovanému výskumu netreba spoliehať len na tradičné metódy fytopatológie, akými sú dodržiavanie prísnych karanténnych opatrení, eradikácia infekčných agens, rotácia plodín a využívanie certifikovaného rastlinného materiálu. K jedným z najdôležitejších nástrojov preventívnych opatrení na kontrolu rastlinných vírusov patrí rýchla a spoľahlivá diagnostika.

Spôľahlivá detekčná metóda musí mať vysoký pomer medzi pozitívnym signálom a pozadím (šumom). Nízky pomer vedie k nespoľahlivosti detekcie a v praxi spôsobuje, že napr. výrobca je poškodený na certifikácii svojich produktov, alebo naopak, zákazník kúpi produkt, ktorý je horšej akosti, než akú očakáva na základe certifikátu.

Vo všeobecnosti je usporiadanie každej detekčnej metódy vždy kompromisom medzi požiadavkami na dva určujúce parametre: citlivosť a špecifickosť. Diagnostická citlivosť je kvantitatívny parameter. Relatívnu citlivosť určuje pomer pozitívnych vzoriek zistených testom a všetkých pozitívnych vzoriek. Absolútna citlivosť je daná najmenším množstvom analyzovaných častíc/molekúl, ktoré je metóda schopná odhaliť. Na druhej strane špecifickosť je parametrom kvalitatívnym a definuje šírku spektra molekúl (vírusov) detekovaných daným postupom. Vysoká citlivosť nesie so sebou riziko falošne pozitívnych výsledkov, vysoká špecifickosť môže byť zasa spojená s falošnou negativitou (Parikh a kol., 2008). Preto je vysoký stupeň citlivosti potrebný v situáciách, kde falošne negatívne výsledky nemôžu byť tolerované a naopak falošne pozitívne výsledky sú akceptovateľné (napr. imperatívna eradikácia ochorenia). Vysoký stupeň diagnostickej špecifickosti je zasa potrebný pri testoch, kde falošne pozitívne výsledky nemožno na rozdiel od falošne negatívnych tolerovať (situácie, keď prípadné ochorenie možno kontrolovať bez väčších ekonomických strát alebo jeho výskyt obmedziť napr. obmenou sadiva a osiva).

Biologické detekčné metódy sú založené na analýze viditeľných špecifických príznakov na prirodzenom hostiteľovi, resp. na vhodných experimentálnych indikátorových (testovacích) rastlinách. Symptomatologické posúdenie infekcie na prirodzenom hostiteľovi môže byť z viacerých aspektov nepresné (vplyv abiotických faktorov na tvorbu príznakov, zmesná alebo latentná infekcia, fyziologické poškodenia zameniteľné s príznakmi vírusovej infekcie a pod.). Kontrolovaná infekcia citlivých testovacích rastlín sa v prípade bylenných hostiteľov prejaví tvorbou ľahko rozpoznateľných lokálnych alebo systémových príznakov zvyčajne 7-14 dní po inokulácii vírusom (Hull, 2009). Medzi často používané indikátorové rastliny patria rôzne druhy tabaku (*Nicotiana* spp.), mrlíku (*Chenopodium* spp.), uhorka (*Cucumis sativum*) a iné. Zavedenie indikátorových rastlín síce spresnilo symptomatologickú detekciu a je stále súčasťou certifikačných schém pre viacero vírusových druhov, naráža však na problém potreby nákladných a špecifických zariadení (špeciálne kultivačné miestnosti), vysokej náročnosti na prácu a takisto nespoľahlivosti a nejednoznačnosti interpretácie výsledkov.

Rutinná diagnostika s adekvátnymi parametrami (citlivosť, špecifickosť, možnosti kvantifikácie patogéna) je podmienená vývojom a optimalizáciou spoľahlivých detekčných metód,

identifikujúcich vírusy nielen podľa biologických prejavov, ale tiež v každom štádiu a forme ich interakcie s hostiteľom a tiež z aspektu ich genetickej variability. Z hľadiska čo najpresnejšej analýzy etiológie ochorenia je dôležité prejsť v oblasti detekcie od vyhodnocovania symptómov k popisu patogéna. Na úrovni infekčnej častice je to možné priamym pozorovaním vírusových patogénov v elektrónovom mikroskope. Mikroskopia umožňuje stanovenie morfológie častíc (napr. vlákna, tyčinky, ikozaedrálné častice) a je dôležitou doplnkovou metódou, avšak pre prácnosť, nákladnosť a malú výpovednú hodnotu je nevhodná pre rutinnú diagnostiku, obzvlášť väčšieho množstva vzoriek.

Keďže vírusy sa skladajú z nukleovej kyseliny a proteínového kapsidu, detekčné metódy môžeme rozdeliť podľa zamerania na analýzu jednej z týchto zložiek. Výber detekčných metód pre diagnostické účely je podmienený druhom diagnostikovaného patogéna a účelom diagnostikovania.

Sérologické metódy sú založené na reakcii antigénov bielkovinovej povahy so špecifickými protilátkami pripravovanými imunizáciou laboratórnych zvierat (prípadne dnes už syntetizovaných aj pomocou biotechnologických postupov). Pôvodne používané imunoprecipitačné metódy majú značné obmedzenia (nízka citlivosť, obmedzená použiteľnosť vzhľadom na štruktúru antigénu). V súčasnosti sa aplikujú predovšetkým rôzne varianty testu ELISA (enzýmová imunosorpčná analýza), ktorého princípom je imunochemická interakcia s jednou zložkou imobilizovanou na pevnú fázu a inou zložkou značenou kovalentne naviazaným enzýmom katalyzujúcim ľahko detekovateľnú reakciu (Clark a Adams, 1977).

Prednosťou ELISA je jednoduchosť, dostupnosť komerčných protilátok, možnosť kvantitatívneho stanovenia, citlivosť, možnosť automatizácie, operatívnosť (dá sa robiť aj v poľných podmienkach) a mimoriadna flexibilita (jednotlivé postupy sa dajú „ušiť na mieru“ podľa potreby). K tomu pristupuje aj pomerne malá finančná náročnosť laboratórneho vybavenia. Preto si test ELISA dodnes udržal popredné miesto medzi diagnostickými metódami. V súčasnosti sa v rutinej diagnostike využívajú ako polyklonálne, tak aj monoklonálne protilátky. Na povrch plastovej mikrotitračnej platničky, ktorá tvorí pevnú fázu, môže byť imobilizovaná buď špecifická protilátka, alebo samotný antigén (vzorka). Ako enzýmové značky sa používajú alkalická fosfatáza, prípadne chrenová peroxidáza, pre ktoré sú dostupné vhodné chromogénne (farbu meniace) substráty. Enzým je konjugovaný buď priamo so špecifickou protilátkou proti analyzovanému antigénu (priama ELISA), alebo s protilátkou proti tejto protilátke (nepriama ELISA). Vhodnou kombináciou vzájomne interagujúcich zložiek je možné doceliť vyššiu citlivosť aj špecificitu. Najbežnejšie používané formáty sú priama DAS-ELISA alebo nepriama ATA- či PTA-ELISA.

Novšie typy diagnostických testov sú založené na špecifickej detekcii a analýze genómových nukleových kyselín patogénov. Veľmi intenzívne sa v diagnostike využíva polymerázová reťazová reakcia (PCR) využívajúca enzým DNA polymerázu na predlžovanie špecifických úsekov DNA. Špecificita je zabezpečená ohraničujúcimi štartovacími miestami, na ktoré sa viažu krátke syntetické oligonukleotidy (primery). Cyklickým opakovaním striedania teplôt sa vďaka dvojvláknovému charakteru DNA jej množstvo v každom cykle reakcie zdvojnásobí, takže výsledkom je geometrickým radom zmnožený úsek DNA medzi primermi, čo je možné detekovať napr. elektroforézou (Joshi a Deshpande, 2010). Kombinácia PCR s reverznou transkripciou (RT-PCR) umožnila priamo diagnostikovať tiež viroidy a RNA vírusy (prevažná

väčšina rastlinných vírusov má genóm tvorený RNA). Citlivosť a špecificita metódy sa dá ďalej zvýšiť zavedením imunovychytávacej techniky (IC-RT-PCR), ktorá kombinuje obe analytické stratégie – imunochemickú a molekulárnobiologickú. Pri využití mikrotitračných platní výrazne stúpa aj kapacita metódy. PCR dosahuje veľmi dobrý pomer medzi pozitívnym signálom a pozadím. Samotná PCR nie je vlastne detekčnou procedúrou, pretože produkty PCR musia byť identifikované elektroforézou alebo molekulárnou hybridizáciou. Vzhľadom k citlivosti PCR je rizikovým faktorom krížová kontaminácia vzoriek, čo kladie vysoké nároky na správnu laboratórnu prax a podmienky pre vykonávanie testov.

Ďalšou technikou s veľkým potenciálom do budúcnosti je izotermálna amplifikácia (LAMP), ktorá sa síce problematickejšie optimalizuje, avšak pri dobrom nastavení vyniká vysokou citlivosťou aj špecifitou, rýchlosťou a jednoduchou analýzou výsledkov (Notomi a kol., 2015). V porovnaní s ELISA majú amplifikačné techniky porovnateľnú prácnosť a možnosť automatizácie, avšak výrazne vyššiu citlivosť (Candresse a kol., 1998).

Výhodou PCR (resp. RT-PCR) je možnosť následnej sekvenácie amplikónu za účelom získania poznatkov o genetickej variabilite vírusu identifikovaného v jednotlivých vzorkách. Pre samotnú optimalizáciu PCR je potrebné mať už k dispozícii aspoň parciálne sekvenčné dáta pre správny návrh detekčných primerov, množstvo vírusových sekvencií v dostupných databázach však neustále rastie. Keďže každý konkrétny vírus (kmeň/izolát) vplýva na citlivosť a účinnosť detekcie pomocou jednotlivých analytických techník, tak či tak najspoľahlivejšou metódou pre charakterizáciu izolátu je čiastočná alebo úplná sekvenácia jeho genómu (Candresse a kol., 1998). Takto získané genomické údaje umožňujú okrem zatriedenia izolátu do kmeňa aj fylogenetické analýzy a porovnanie ich molekulárnych odlišností od dovtedy známych údajov dostupných v sekvenčných databázach, napr. Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), prípadne vyvodenie záverov o geografickom pôvode a šírení daného patogéna. S postupným zavádzaním techník sekvenovania novej generácie možno očakávať už v najbližšej budúcnosti, že sekvenčná analýza sa stane takisto štandardným diagnostickým nástrojom (Barzon a kol., 2013).

4. Vlastný popis metodiky detekcie vírusov rajčiaka

4.1 Zber vzoriek

Zber vzoriek sme vykonávali v čase vegetačného obdobia (od konca mája do októbra), pričom koncentrácia vírusu v rastline sa môže sezónne znížiť v dôsledku vysokých letných teplôt. Intenzita príznakov je zvyčajne najvyššia počas najintenzívnejších rastových fáz. Na konci vegetačného obdobia sa na rajčiaku môžu prejavovať fyziologické poruchy, prípadne následky hubových ochorení, ktoré komplikujú a skresľujú vizuálne hodnotenie symptómov. Vzhľadom na to, že symptómy vírusovej infekcie nemusia byť v prípade všetkých odrôd rajčiakov jednoznačné alebo dokonca viditeľné, odoberané sú aj vzorky z rastlín na prvý pohľad bezpríznakových. Na testovanie prítomnosti vírusových patogénov sa odoberajú prevažne listy, ale ako vzorky môžu byť použité aj mladé výhonky, korene alebo plody (šupka). Kvôli zabezpečeniu reprezentatívnej vzorky odoberáme vzorky z rôznych častí rastliny (horná aj dolná etáž) z dôvodu možnej nerovnomernej distribúcie vírusu v rastline. Získané vzorky sú následne uložené do špeciálne značených plastových vreciek a buď sú okamžite spracované, prípadne krátkodobo uchovávané (1-3 dni pri 4°C) alebo rozdelené na alikvóty a zmrazené na nízku teplotu (-80°C), prípadne lyofilizované (časovo neobmedzené uchovávanie pri 4°C).

4.2. ELISA

Na stanovenie prítomnosti jednotlivých vírusov (PVY, CMV, PVS, PVM, ToMV) v rastlinných vzorkách sme použili komerčné protilátky, resp. kity (Bioreba) v usporiadaní DAS-ELISA (double antibody sandwich). Aplikovali sme konkrétny postup odporúčaný dodávateľom. Pri každom teste sme aplikovali pozitívnu a negatívnu kontrolu na každú platničku.

- i. Primárnu protilátku (IgG) zriedenú 1:1000 väzbovým roztokom sme aplikovali do jamiek mikrotitračnej platničky (Sarstedt) v objeme 100 µl na jamku. Väzba (coating) prebiehala počas 4-hodinovej inkubácie pri teplote 37°C vo vlhkej komore.
- ii. Platničku sme intenzívne 4-krát premyli premývacím roztokom.
- iii. Rastlinné vzorky sme homogenizovali s extrakčným roztokom v pomere 1:10-1:20. Po 100 µl homogenátu sme pridali do premytých jamiek platničky (každá vzorka v duplikáte). Inkubácia vzoriek prebiehala pri teplote 4-6°C cez noc.
- iv. Platničku sme intenzívne 4-krát premyli premývacím roztokom.
- v. Sekundárnu (enzýmom značenú) protilátku sme zriedili konjugátovým roztokom 1:1000 a aplikovali do premytých jamiek (100 µl na jamku). Nasledovala inkubácia pri teplote 37°C počas 4 hodín.
- vi. Platničku sme intenzívne 4-krát premyli premývacím roztokom.
- vii. Pripravili sme substrát rozpustením PNPP (para-nitrofenyl-fosfát) v substrátovom roztoku (1 mg/ml). Po aplikácii substrátu do jamiek platničky (100 µl na jamku) reakcia prebiehala v tme pri izbovej teplote (20-25°C). Farebnú reakciu sme kvantifikovali pomocou spektrofotometra meraním absorbie pri vlnovej dĺžke 405 nm, a to v časových intervaloch podľa potreby (zvyčajne opakované počas 30-

120 minút). Za pozitívne sme považovali vzorky s absorbanciou aspoň trikrát vyššou ako hodnoty získané pre negatívnu kontrolu (vzorky zo zdravých rastlín).

Zloženie roztokov používaných pri testoch DAS-ELISA:

väzbový roztok (pH 9,6):

1,59 g Na_2CO_3 ; 2,93 g NaHCO_3 ; 0,2 g NaN_3 – rozpustiť, upraviť pH a doplniť na 1000 ml destilovanou vodou

premyvací roztok PBS-T (pH 7,4):

8 g NaCl , 0,2 g KH_2PO_4 , 1,15 g Na_2HPO_4 ; 0,2 g KCl ; 0,5 ml Tween-20 – rozpustiť, upraviť pH a doplniť na 1000 ml destilovanou vodou

vzorkový roztok (pH 7,4):

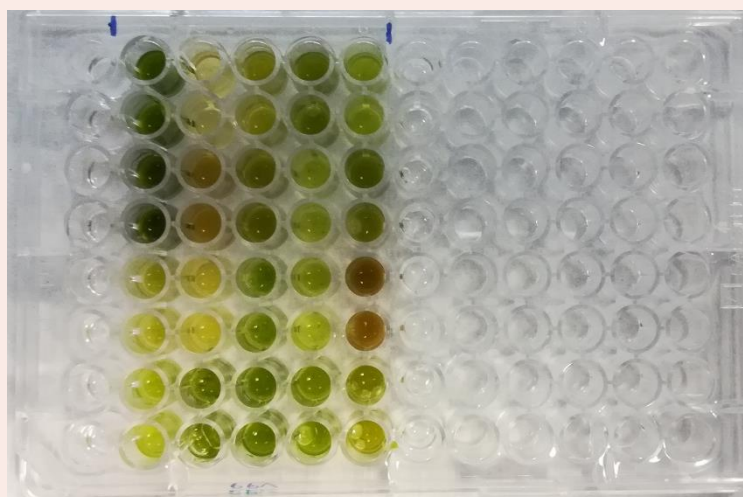
20 g PVP-40 (polyvinyl pyrrolidone) – rozpustiť v 1000 ml premyvacieho roztoku

konjugátový roztok (pH 7,4):

2 g hovädzieho sérumalbumínu – rozpustiť v 1000 ml vzorkového roztoku

Substrátový roztok (pH 9,8):

97 ml dietanolamínu; 0,2 g NaN_3 – rozpustiť, upraviť pH a doplniť na 1000 ml destilovanou vodou



4.3. RT-PCR

4.3.1. Izolácia celkovej RNA

Na izoláciu celkovej RNA zo vzorky sme použili komerčný kit NucleoSpin RNA Plant (Macherey Nagel). Pred samotnou izoláciou je potrebné všetky nástroje vysterilizovať a pracovný stôl vydezinfikovať kvôli prítomnosti RNáz, ktoré by mohli viesť k degradácii RNA. Z rovnakého dôvodu pri práci vždy používame jednorazové laboratórne rukavice. Vzorku o hmotnosti 0,1 g rozdrvíme v tretej miske s pomocou tekutého dusíka na jemný prášok. Následne rastlinný materiál lyzujeme pridaním 350 μ l lyzačného roztoku a 3,5 μ l 2-merkaptotanolu. Tento lyzačný roztok slúži aj na okamžitú inaktiváciu RNáz, ktoré sú prítomné prakticky vo všetkých biologických materiáloch. Princíp samotnej izolácie RNA prostredníctvom tohto kitu spočíva v použití dvoch centrifugačných minikolóniek. V prvom kroku je na redukcii viskozity a prečistenie lyzátu použitá filtračná minikolónka. Následne je filtrát prenesený na afinitnú minikolónku, kde dochádza k naviazaniu RNA na membránu a jej premývanie v niekoľkých krokoch. V poslednej časti je prečistená RNA eluovaná do 40-60 μ l vody bez prítomnosti RNáz a buď priamo použitá na prípravu cDNA alebo uskladnená pri teplote -80°C .

4.3.2. Príprava komplementárnej DNA (cDNA)

Ako primery pre reverznú transkriptázu sme využívali komerčne dodávané náhodné hexaméry (Promega) – hexanukleotidy s náhodným poradím báz, čo umožňuje ich nasadenie na rôzne úseky všetkých molekúl nukleových kyselín prítomných v reakčnej zmesi. Pripravená cDNA je teda komplexná a vhodná na amplifikáciu rôznymi špecifickými primermi v následnej PCR a popísaný postup je platný pre analýzu všetkých RNA vírusov.

Zloženie reakčnej zmesi pre reverznú transkripciu na jednu vzorku (výsledný objem 20 μ l):

3 μ l celkovej RNA (cca 100 ng/ μ l)
2 μ l zmesi primerov (náhodné hexaméry) (60 μ mol/l)
9 μ l H_2O

Zmes inkubujeme v termocykléri pri 70°C 10 min, chladíme 5 min pri 0°C a pridáme zvyšnú časť reakčnej zmesi o zložení:

4 μ l 5x koncentrovaného reakčného roztoku
1 μ l dNTP (každý o koncentrácii 10 mmol/l)
1 μ l AMV reverznej transkriptázy (10 U/ μ l)

Zmes inkubujeme v termocykléri 1 hodinu pri teplote 37°C .

Takto získanú cDNA používame ihneď ako templát pre jednotlivé špecifické PCR alebo ju uskladňujeme pri teplote -20°C .

4.3.3. PCR

Zmesi pre PCR zmiešavame vždy v čistom priestore a nástrojmi (pipetami) určenými iba pre túto činnosť, najlepšie v osobitnej miestnosti a používame mikropipetové špičky s filtrom pre elimináciu krížovej kontaminácie vzoriek. Popísaný postup a zloženie reakčnej zmesi (s výnimkou použitých primerov) boli identické pre všetky testované RNA vírusy. Konkrétne primery a produkty amplifikácie sú špecifikované nižšie v tabuľke.

Zloženie reakčnej zmesi na jednu vzorku (výsledný objem 25 μ l) :

5 μ l 5x koncentrovaného reakčného roztoku GoTaq Green
0,5 μ l dNTP (každý o koncentrácii 10 mmol/l)
1 μ l forward primer (10 μ mol/l)
1 μ l reverse primer (10 μ mol/l)
3 μ l cDNA (z predchádzajúceho kroku)
0,125 μ l GoTaq DNA polymeráza (5 U/ μ l)
14,375 μ l H₂O

Reakcia prebiehala v termocykléri za nasledovných podmienok :

úvodná denaturácia : 95°C, 2 min

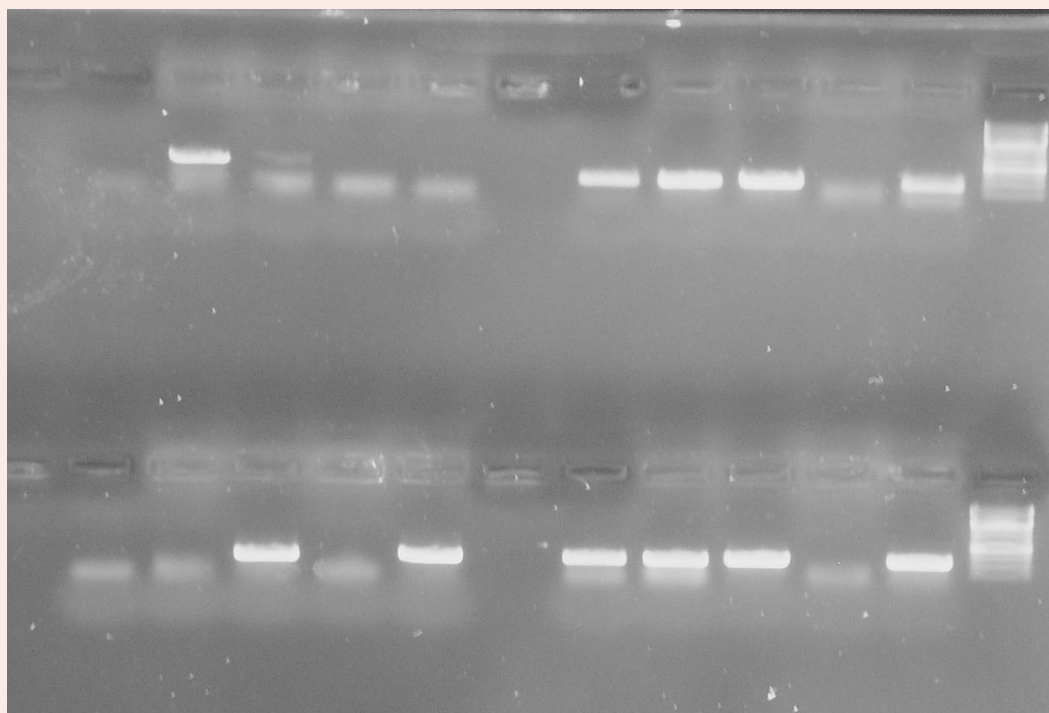
40 cyklov	(denaturácia:	95°C, 25 s
	anelácia primerov:	56°C, 30 s
	elongácia:	72°C, 35 s)

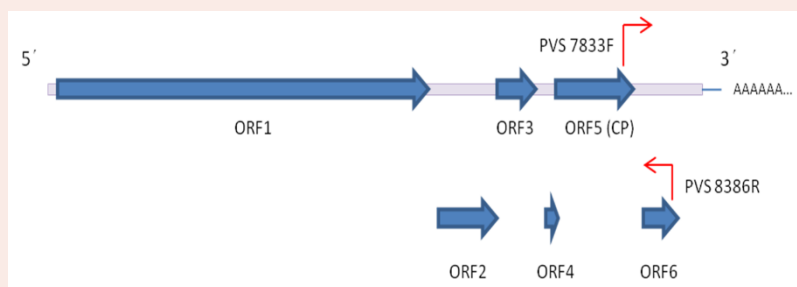
záverečná elongácia: 72°C, 10 min

Produkty amplifikácie sme analyzovali nanesením 5 μ l alikvótu reakčnej zmesi na 1% agarózový gél a následnou elektroforézou v roztoku TAE (40 mmol/l Tris-octan, 1 mmol/l EDTA, pH 8) a dokumentovali pomocou UV transiluminátora.

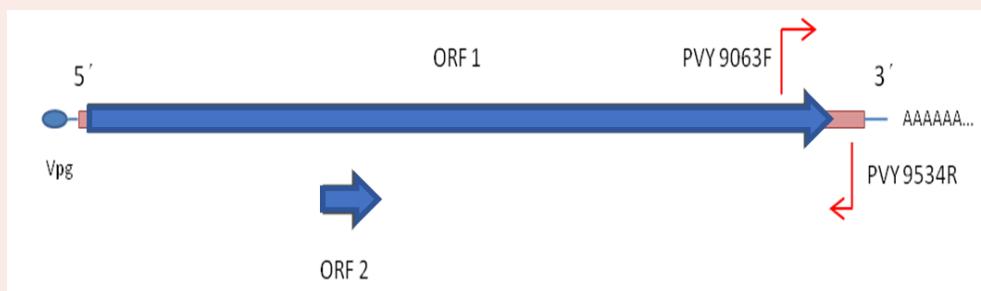
Tabuľka – primery použité pri PCR detekcii jednotlivých vírusov

vírus	názov primeru	orientácia	sekvencia	veľkosť ampliméru
PVS	PVS 7833F	forward	5'-AGGCTATGGGATTTCAATGG-3'	553 bp
	PVS 8386R	reverse	5'-TGGTATCACCTCAGTTACTC-3'	
PVY	PVY 9063F	forward	5'-CATGGCACATTTCTCAGATG-3'	471 bp
	PVY 9534R	reverse	5'-CAACAACRACAACCCGGCAC-3'	
PVM	PVM d8065F	forward	5'-CTCAATGCCGAGGTCCTG-3'	380 bp
	PVM d8445R	reverse	5'-TGACTGAAGGTATCACCTC-3'	
CMV	CMV-CPf	forward	5'-TYTCATGGATGCTTCTCCRC-3'	870 bp
	CMV-CPr	reverse	5'-CTGGATGGACAACCCGTTC-3'	
ToMV	ToMV5119F	forward	5'-CTTGTGTGTCCGGTGAGTG-3'	347 bp
	ToMV5465R	reverse	5'-ATGGGTCTCCATCGTTCAC-3'	

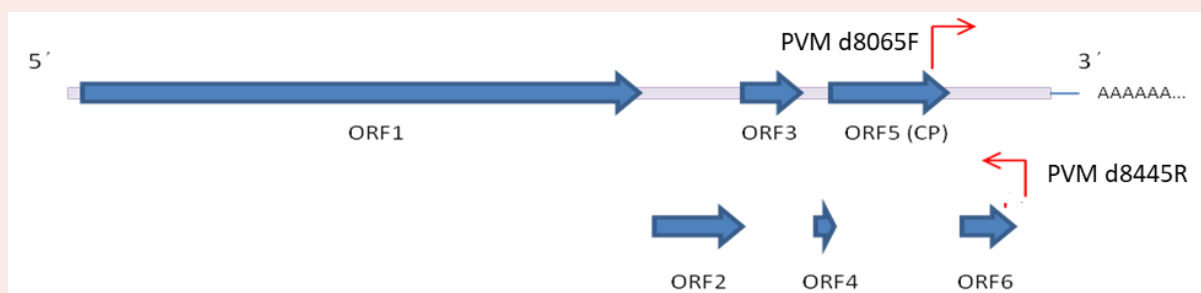




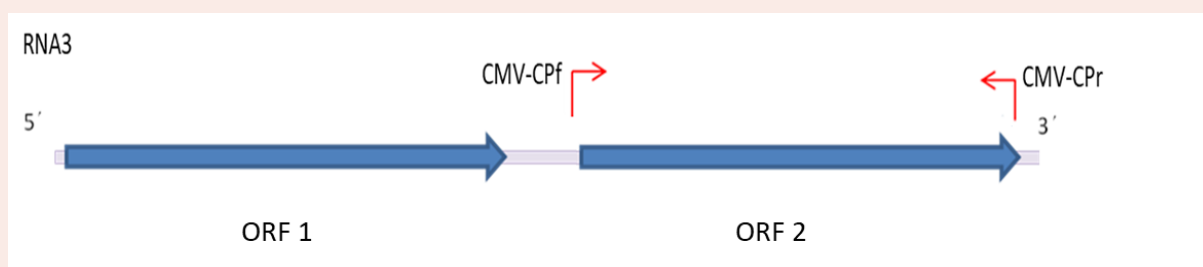
Schematické znázornenie genómu PVS s vyznačenými miestami nasadania detekčných primerov



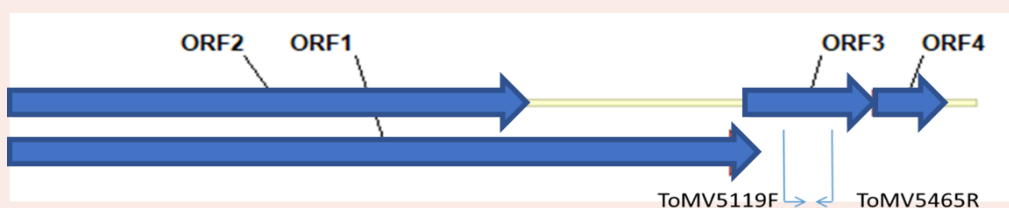
Schematické znázornenie genómu PVY s vyznačenými miestami nasadania detekčných primerov



Schematické znázornenie genómu PVM s vyznačenými miestami nasadania detekčných primerov



Schematické znázornenie RNA3 CMV s vyznačenými miestami nasadania detekčných primerov



Schematické znázornenie genómu ToMV s vyznačenými miestami nasadania detekčných primerov

Použitá literatura

- Abad P, Jordá C (2000): Characterization of potato Y potyvirus isolates from tomato crops in Islas Canarias (Spain). EPPO Bull 30: 281–287
- Amir H, Karas M, Giat J, Danilenko M, Levy R, Yermiahu T, Levy J, Sharoni Y (1999): Lycopene and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ cooperate in the inhibition of cell cycle progression and induction of differentiation in HL-60 leukemic cells. Nutr Cancer 33: 105 – 112
- Bagnall RH, Larson RH, Walker JC (1956). Potato viruses M, S, and X in relation to interveinal mosaic of the Irish Cobbler variety. University of Wisconsin. Madison, s. 1 – 5
- Barzon L, Lavezzo E, Costanzi G, Franchin E, Toppo S, Palù G (2013): Next-generation sequencing technologies in diagnostic virology. Journal of Clinical Virology 58: 346 – 350
- Beczner L, Horwath H, Romhanyi I, Forster H (1984): Studies on the aetiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. Potato Res 27: 339 – 352
- Brigneti G, Voinnet O, Li WX, Ji LH, Ding SW, Baulcombe DC (1998): Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. EMBO J 17: 6739 – 6746
- Canto T, Prior DAM, Hellwald KH, Oparka KJ, Palukaitis P (1997): Characterization of cucumber mosaic virus IV. Movement protein and coat protein are both essential for cell-to-cell movement of cucumber mosaic virus. Virology 237: 237 – 248
- Chaudhary P (2018): Bioactivities of phytochemicals present in tomato. J Food Sci Technol 55: 2833 – 2849
- Clark MF, Adams AN (1977): Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology 34, 475 – 483
- Ding SW, Anderson BJ, Haase HR, Symons RH (1994): New overlapping gene encoded by the cucumber mosaic virus genome. Virology 198: 593 – 601
- Dombrovsky A, Smith E (2017): Seed transmission of Tobamoviruses: Aspects of global disease distribution. In Advances in Seed Biology. IntechOpen. pp 233 – 260
- Edwardson JR, Christie RG (1997): Florida Agricultural Experiment Station Monograph Series 18-II: 467
- Edwardson JR, Christie RG (1997): Viruses infecting peppers and other solanaceous crops 1.: 336. ISBN: Bookseller Inventory # 2416668
- FAOSTAT (2017): (<https://www.worldatlas.com/articles/which-are-the-world-s-leading-tomato-producing-countries.html>)
- Friedman M (2013): Anticarcinogenic, Cardioprotective, and Other Health Benefits of Tomato Compounds Lycopene, α -Tomatine, and Tomatidine in Pure Form and in Fresh and Processed Tomatoes. J Agric Food Chem 61: 9534 – 50
- Foster GD, Mills PR (1992): The 3'-Nucleotide Sequence of an Ordinary Strain of Potato Virus S. Virus Genes 6: 213 – 220

- Gallitelli D, DiFranco A, Vovlas C, Kaper MM (1988): Infezioni miste del virus del mosaico del cetriolo (CMV) e di potyvirus in colture ortive di Puglia e Basilicata. *Inf Fitopatol* 12: 57 – 64
- García-Arenal F, Palukaitis P (1999): Structure and functional relationships of satellite RNAs of cucumber mosaic virus. *Springer*: 37 – 63
- Glasa M, Šoltys K, Predajna L, Sihelska N, Budis J, Mrkvova M, Kraic J, Mihalik D, Ruiz-Garcia AB (2019): High-throughput sequencing of Potato virus M from tomato in Slovakia reveals a divergent variant of the virus. *Plant Protection Science* 55: 159 – 166
- Gloria NF, Soares N, Brand C, Oliveira FL, Borojevic R, Teodoro AJ (2014): Lycopene and beta-carotene induce cell-cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cell lines. *Anticancer Res* 34: 1377 – 1386
- Gray S, De Boer S, Lorenzen J, Karasev A, Whitworth J, Nolte P, Singh R, Boucher A, Xu H (2010): Potato Virus Y. An Evolution Concern for Potato Crops in the United States and Canada. *The American Phytopathological Society* 10: 1094
- Hazewindus M, Haenen GR, Weseler AR, Bast A (2014): Protection against chemotaxis in the anti-inflammatory effect of bioactives from tomato ketchup. *PLoS ONE* 9: 114 – 387
- Hollings M, Huttinga H (1976): Tomato mosaic virus. *AAB Descriptions of Plant Viruses* 156
- Hull R (2009): Mechanical Inoculation of Plant Viruses. *Current Protocols in Microbiology* 13, 16B.6.1 – 16B.6.4
- Hwang ES, Lee HJ (2006): Inhibitory effects of lycopene on the adhesion, invasion, and migration of SK-Hep1 human hepatoma cells. *Exp Biol Med* 231: 322 – 327
- Jeffries CJ (1998): Potato. *FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm* 19
- Joshi M, Deshpande JD (2010): Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research* 2: 81 – 97
- Kadaré G, Haenni AL (1997): Virus-encoded RNA helicases. *J Virol* 71: 2583 – 2590
- Kang BC, Yeam I, Jahn MM (2005): Genetics of plant virus resistance. *Ann Rev Phytopathol* 43: 581 – 621
- Karas M, Amir H, Fishman D, Danilenko M, Segal S, Nahum A, Sharoni Y (2000): Lycopene interferes with cell cycle progression and insulin-like growth factor I signaling in mammary cancer cells. *Nutr Cancer* 36: 101 – 111
- Karasev AV, Hu X, Brown CJ, Kerlan C, Nikolaeva OV, Crosslin JM, Gray SM (2011): Genetic diversity of the ordinary strain of Potato virus Y (PVY) and origin of recombinant PVY strains. *Phytopathology* 101: 778 – 785
- Karasev AV, Gray SM (2013): Continuous and emerging challenges of Potato virus Y in potato. *Annu. Rev. Phytopathol* 51: 571 – 586

- Koh E, Kaffka S, Mitchell AE (2013): A long-term comparison of the influence of organic and conventional crop management practices on the content of the glycoalkaloid α -tomatine in tomatoes. *J Sci Food Agric* 93: 1537 – 1542
- Kowalska A (1978): Differences among isolates of potato virus M and potato virus S. *Phytopath Z* 93: 227 – 240
- Lanfermeijer FC, Warmink J, Hille J (2005): The products of the broken Tm-2 and the durable Tm-2² resistance genes from tomato differ in four amino acids. *Journal of Experimental Botany* 56: 2925 – 2933
- Legnani R, Laterrot H, Gebre Selassie K (1995): Resistance to potato virus Y (PVY) in tomato. *Ann. Tabac, sect. 2-27*, p. 17 – 23
- Levy J, Bosin E, Feldman B, Giat Y, Miinster A, Danilenko M, Sharoni Y (1995): Lycopene is a more potent inhibitor of human cancer cell proliferation than either α -carotene or β -carotene. *Nutr Cancer* 24: 257 – 266
- Lorenzen JH, Piche, LM, Gudmestad NC, Meacham T, Shiel P (2006): A multiplex PCR assay to characterize Potato virus Y isolates and identify strain mixtures. *Plant Dis* 90: 935 – 940
- Manzer FE, Merriam DC, Hepler PR (1978): Effects of potato virus S and two strains of potato virus X on yields of Russet Burbank, Kennebec and Katahdin cultivars in Maine. *Am. Potato J.* 55: 601 – 609
- Marti R, Leiva-Brondo M, Lahoz I, Campillo C, Cebolla-Cornejo J, Roselló S (2018): Polyphenol and L-ascorbic acid content in tomato as influenced by high lycopene genotypes and organic farming at different environments. *Food Chem* 239: 148 – 156
- Notomi T, Mori Y, Tomita N, Kanda H (2015): Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology* 53: 1 – 5
- O'Reilly EK, Kao CC (1998): Analysis of RNA-dependent RNA polymerase structure and function as guided by known polymerase structures and computer predictions of secondary structure. *Virology* 252: 287 – 303
- Palozza P, Colangelo M, Simone R, Catalano A, Boninsegna A, Lanza P, Monego G, Ranelletti FO (2010): Lycopene induces cell growth inhibition by altering mevalonate pathway and Ras signaling in cancer cell lines. *Carcinogenesis* 31: 1813 – 1821
- Palukaitis P, Roossinck MJ, Dietzgen RG, Francki RIB (1992): Cucumber mosaic virus. *Advances in Virus Research* 41: 281 – 348
- Parikh R, Mathai A, Parikh S, Sekhar GC, Thomas R (2008): Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values. *Indian Journal of Ophthalmology* 56: 45 – 50
- Peralta IE, Spooner DM (2007): History, origin and early cultivation of tomato (Solanaceae). *Tomato, Science Publishers, Enfield, United States* 2: 1 – 27
- Predajňa L, Šoltys K, Kraic J, Mihálik D, Glasa M (2017): First report of potato virus S infecting tomato in Slovakia. *Journal of Plant Pathology* 99: 811

Rafi MM, Yadav PN, Reyes M (2007): Lycopene inhibits LPS induced proinflammatory mediator inducible nitric oxide synthase in mouse macrophage cells. *J Food Sci* 72: 69 – 74

Roossinck MJ, Zhang L, Hellwald KH (1999): Rearrangements in the 5' nontranslated region and phylogenetic analyses of cucumber mosaic virus RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups. *J Virol* 73: 6752 – 6758

Rozanov MN, Koonin EV, Gorbalenya AE (1992): Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the 'Sindbis-like' supergroup of positive-strand RNA viruses. *J Gen Virol* 73: 2129 – 2134

Ruiz de Galarreta JI, Carrasco A, Salazar A, Barrena I, Iturrutxa E, Marquinez R, Legorburu FJ, Ritter E (1998): Wild Solanum species as resistance against different pathogens of potato. *Potato Res* 41: 57 – 68

Saavedra TM, Figueroa GA, Cauhi JG (2017): Origin and evolution of tomato production *Lycopersicon esculentum* in Mexico. *Ciencia Rural* 47: 1 – 8

Scholthof KB, Adkins S, Czosnek H, Palukaitis P, Jacquot E, Hohn T, Hohn B, Saunders K, Candresse T, Ahlquist P, Hemenway C, Foster GD (2011): Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 12: 938 – 954

Scolastici C, Alves de Lima RO, Barbisan LF, Ferreira AL, Ribeiro DA, Salvadori DM (2007): Lycopene activity against chemically induced DNA damage in Chinese hamster ovary cells. *Toxicol In Vitro* 21: 840 – 845

Sesso HD, Buring JE, Norkus EP, Gaziano JM (2004): Plasma lycopene, other carotenoids, and retinol and the risk of cardiovascular disease in women. *Am J Clin Nutr* 79: 47 – 53

Sharma A, Kaur M, Katnoria JK, Nagpal AK (2017): Polyphenols in food: cancer prevention and apoptosis induction. *Curr Med Chem* 25

Shukla DD, Ward CW, Brunt AA (1994): The Potyviridae. *New Phytologist Trust* 131: 289 – 290

Skulachev MV, Ivanov PA, Karpova OV, Korpela T, Rodionova NP, Dorokhov YL, Atabekov JG (1999): Internal initiation of translation directed by the 5'-untranslated region of the tobamovirus subgenomic RNA I2. *Virology* 263: 139 – 154

Snyder RG (1995): *Greenhouse Tomato Handbook*, Mississippi state university.

Solomon-Blackburn RM, Barker H (2001): A review of host major- gene resistance to potato viruses X, Y, A and V in potato: Genes, genetics and mapped locations. *Heredity* 86: 8 – 16

Tian YP, Hepojoki J, Ranki H, Lankinen H, Valkonen JPT (2014): Analysis of Potato virus Y coat protein epitopes recognized by three commercial monoclonal antibodies. *PLoS ONE* 9: 115

Tomas M, Beekwilder J, Hall RD, Sagdic O, Boyacioglu D, Capanoglu E (2017): Industrial processing versus home processing of tomato sauce: effects on phenolics, flavonoids and in vitro bioaccessibility of antioxidants. *Food Chem* 220: 51 – 58

Ullman D E, Cho JJ, German TL (1991): Occurrence and distribution of cucurbit viruses in the hawaiian island. *Plant Dis* 75: 367 – 370

Valkonen JPT, Brigneti G, Salazar LF, Pehu E, Gibson RW (1992): Interactions of the *Solanum* spp. of the *Etuberosa* group and nine potato-infecting viruses and a viroid. *Ann Appl Biol* 120: 301 – 313

Watada AE, Aljlenbach BB, Worthington JT (1976): Vitamins A and C in ripe tomatoes as affected by stage of ripeness at harvest and by supplementary ethylene. *J Food Sci* 41: 856 – 858

Wetter C (1972): Potato virus M. *Descriptions of Plant Viruses*. Kew, England: Commonwealth Mycology Institute/Association of Applied Biology 87

Wikipedia, 2013. Potato virus Y. Available at <<http://en.wikipedia.org/wiki/Potato_virus_Y>>. Date of Access: 08/06/2013.

Smith KM (1931): Composite nature of certain potato viruses of the mosaic group. *Nature* 127: 702

Xu P, Roossinck MJ (2000): Cucumber mosaic virus D satellite RNA induced programmed cell death in tomato. *Plant Cell* 12: 1079 – 1092

Yoshida K, Goto T, Iizuka N (1985): Attenuated isolates of cucumber mosaic virus produced by satellite RNA and cross protection between attenuated isolates and virulent ones. *Ann Phytopath Soc Japan* 51: 238 – 242

Zavriev SK, Kanyuka KV, Levay KE (1991): The genome organization of potato virus M RNA. *J Gen Virol* 72: 9 - 14

Publikácie vzniknuté pri riešení projektu APVV-14-0055:

Sihelská N, Predajňa L, Nagyová A, Šoltys K, Budiš J, Gubiš J, Mrkvová M, Kraic J, Mihálik D, Glasa M (2016): Detection and molecular characterisation of Slovak tomato isolates belonging to two recombinant strains of Potato virus Y. *Acta Virologica* 60: 347-353

Sihelská N, Vozárová Z, Predajňa L, Šoltys K, Hudcovicová M, Mihálik D, Kraic J, Mrkvová M, Kúdela O, Glasa M (2017): Experimental infection of different tomato genotypes with Tomato mosaic virus led to a low viral population heterogeneity in the capsid protein encoding region. *Plant Pathology Journal* 33: 508-513

Predajňa L, Šoltys K, Kraic J, Mihálik D, Glasa M (2017): First report of Potato virus S infecting tomato in Slovakia. *Journal of Plant Pathology* 99: 811

Glasa M, Šoltys K, Predajňa L, Sihelská N, Budiš J, Mrkvová M, Kraic J, Mihálik D, Ruiz-García AB (2019): High-throughput sequencing of Potato virus M from tomato in Slovakia reveals a divergent variant of the virus. *Plant Protection Science* 55: 159-166



Výsledky tejto práce vznikli s podporou projektu **APVV-14-0055 (Efektívna diagnostika vírusov ohrozujúcich produkciu rajčiaka jedlého na Slovensku).**

ISBN: 978-80-972111-4-1

