

IN SITU STUDY OF BEET SOILBORNE

Studium půdou přenosného viru řepy in situ

Pavla KUDLÁČKOVÁ, Miloslav ZOUHAR a Pavel RYŠÁNEK

KOR AF ČZU

Souhrn, klíčová slova

Půdou přenosný virus řepy byl sledován ve šťávě a v pletivu lokálních lézí listů *Chenopodium quinoa*, které byly zalaty do akrylové pryskyřice LR White. Pro zvýšení počtu virových částic na síťce a pro imunoznačení viru koloidním zlatem v pletivu bylo využito polyklonálních protilátek.

BSBV, polyklonální protilátky, imunoznačení.

Summary, keywords

Beet soilborne pomovirus was observed both in the sap and in tissues from local lesions on *Chenopodium quinoa* leaves after their embedding into acrylic resin LR White. The polyclonal antibodies were used to enhance number of particles on grid and immunolabelling by colloidal gold in tissues.

BSBV, polyclonal antibodies, immunolabelling.

Úvod

Půdou přenosný virus řepy (BSBV) byl poprvé nalezen Ivanovicem a McFarlanem (1982) v Anglii a pojmenován podle Henry et al. (1986). BSBV je velmi rozšířený v oblastech s pěstováním cukrové řepy po celém světě (Prillwitz a Schlösser, 1992, Lindsten, 1991, Turina et al., 1996) a jeho výskyt byl potvrzen i v ČR (Ryšánek a Kudláčková, 2000). BSBV může na řepě způsobovat symptomy podobající se rizománii, ale často se na rostlinách neobjevují žádné symptomy (Prillwitz a Schlösser, 1992). V polních podmínkách, ale po mechanické inokulaci kořenů, způsoboval snížení hmotnosti kořene mladých rostlin o 20 % (Kaufmann et al., 1993). V nádobových pokusech se hmotnost rostlin po inokulaci viruliferními zoosporami *P. betae* snížila až o 40 % (Prillwitz a Schlösser, 1992).

Virové částice BSBV mají tyčinkovitý tvar různých délek (65, 150 a 300 nm) a v průměru 20 nm. Jsou přenášeny půdním organismem *Polymyxa betae* (Protozoa) a splňuje kriteria pro zařazení do rodu *Pomovirus* (Hull, 2002). Morfologie virových částic BSBV byla již studována Henrym et al. (1986) Lesemannem et al. (1989), ale ještě stále je málo známo o jejich vzhledu v pletivu infikovaných rostlin.

Metody

Listy *Chenopodium quinoa* byly mechanicky inokulovány kořeny cukrové řepy ze zeminy z Rostoklat kontaminované BSBV. Lokální léze (5-8 dní po inokulaci) nebo kořeny lapacích rostlin byly nakrájeny na malé kousky velikosti 2x1 mm a fixovány 2 hod v 2 % glutaraldehydu při 4 °C, promývány fosfátovým pufrem, postfixovány 2 hod v 1 % oxidu osmičelém a znovu promývány v redestilované vodě. Poté bylo pletivo dehydratováno v etanolové řadě (30, 50, 70, 90 % po 30 min a ve 100 % přes noc), infiltrováno pryskyřicí LR White (1:3, 1:1, 3:1 směs s etanolem, každý vzorek 1 hod a ve 100 % pryskyřici 2x1 hod) a zalito do pryskyřice v želatinových kapslích (polymerizace při 60 °C na dva dny). Ze vzorků byly na ultramikrotomu (LKB Ultratome III) nařezány ultratenké řezy a umístěny na niklové síťky potažené pioloformovou membránou. Imunoznačení spočívalo v přemísťování sítěk na kapky chemikálií v následujícím sledu: voda 5 min, saturovaný roztok NaIO₄ 15 min, voda 3x2 min, 0.1M HCl 10 min, voda 2x2 min, PBS s 1 % BSA a 0,1 % Tween 15 min, protilátky proti BSBV (prof. Lindsten) v PBS-

BSA 1:50 1 hod při 37 °C, promytí v PBS 10 min a 5x2 min, koloidní zlato 15 nm (Biocell) 1:20 v PBS-BSA 1 hod při 37 °C, promytí v PBS 10 min a ve vodě 2x5 min, 2 % uranylacetát 5 min, promytí ve vodě 10x1 min, citrát olovnatý 5 min, promytí ve vodě 10x1 min. Pro techniku ISEM (Immunosorbent Electron Microscopy) byly síťky umístěny na kapky takto: protilátky v PBS 1:800 1 hod při 37 °C, promytí v PBS, homogenát z listů (1:10 v PBS-BSA, centrifugace 10 min na 10000g) 1 hod při 37 °C, promytí v PBS a ve vodě, 2 % uranylacetát 5 min a promytí ve vodě. Síťky byly sledovány v elektronovém mikroskopu Tesla BS 500.

Výsledky a diskuse

BSBV byl pozorován jak ve šťávě tak i v pletivu lokálních lézí listů *Chenopodium quinoa*. Ve šťávě byly vidět jednotlivé částice různé délky a jejich agregáty. V buňkách lokálních lézí byly vidět inkluze virových částic označené koloidním zlatem. Inkluze obsahovaly obvykle malý počet virových částic řadících se za sebou a byly rozptýleny v cytoplazmě parenchymatických buněk. Jelikož se koncentrace viru v pletivu pohybovala na nízké úrovni, bylo pro snadnější nalezení virových částic využito imunoznačení.

Jde o první sledování BSBV přímo v pletivu infikovaných rostlin. Inkluze BSBV (ve směsné infekci s BNYVV) jsou zcela odlišné od inkluzí BNYVV, které se formují do tvaru rybí kostry (Putz a Vuittenez, 1980). Ve srovnání s BNYVV byla koncentrace BSBV v pletivu velmi malá. Imunoznačení bylo během naší práce velmi výhodné, neboť nám umožnilo nalézt virové inkluze v cytoplazmě infikovaných buněk, i když protilátky pro tento záměr byly dosti koncentrované (1:50). V tomto případě existuje nebezpečí pozadí, ale až na některé výjimky jsme s tímto neměli problém. Částice BSBV ze šťávy měly různou délku a již byly popsány Ivanovicem et al. (1983) a Lesemannem et al. (1989). Nepatrně byly dekorovány protilátkami. Bez techniky ISEM bylo nemožné virus najít.

Použitá literatura k dispozici u autorů

Řešeno v rámci grantu FRVŠ