

---

**25 LET VYUŽÍVÁNÍ TECHNIK POLYMERÁZOVÉ ŘETĚZOVÉ REAKCE (PCR) PRO DETEKCI VIROVÝCH A VIROIDNÍCH PATOGENŮ BRAMBORU VE VÚB HAVLÍČKŮV BROD****25 YEARS OF USING POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) TECHNIQUES FOR THE DETECTION OF VIRAL AND VIROID PATHOGENS OF POTATOES IN PRI HAVLICKUV BROD**Jiří PTÁČEK<sup>1</sup>, Jaroslav MATOUŠEK<sup>2</sup><sup>1</sup>*Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o.*<sup>2</sup>*Biology Centre CAS, IPMB, České Budějovice*

---

PTÁČEK, J. – MATOUŠEK, J.**25 LET VYUŽÍVÁNÍ TECHNIK POLYMERÁZOVÉ ŘETĚZOVÉ REAKCE (PCR) PRO DETEKCI VIROVÝCH A VIROIDNÍCH PATOGENŮ BRAMBORU VE VÚB HAVLÍČKŮV BROD**

Vědecké práce – Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, 2020, 26: 29–42

Využívání molekulárně genetických technik ve VÚB Havlíčkův Brod v oblasti detekce virů a viroidu bramboru započalo již před 25 lety. V současnosti jsou tyto techniky převážně využívány k detekci Viroidu vřetenovitosti hlíz bramboru (PSTVd) a Viru Y bramboru (PVY). Cílem této publikace je ukázat vývoj v této oblasti za uplynulých 25 let.

RNA; RT-PCR; RT-qPCR

---

**ÚVOD**

V současné době jsou pro detekci virových i viroidních onemocnění bramboru využívány i techniky RT-PCR a RT-PCR v reálném čase. Metoda kvantitativní PCR je založena na stanovování fluorescence produktu PCR v jednotlivých vzorcích po každém cyklu PCR pomocí fluorescenčních sond a stanovování počtu cyklů potřebných pro dosažení prahové fluorescence. Stanovování se provádí na základě měřených změn fluorescence fluorescenční sondy. Používají se jednak nespecifická sonda využívající SybrGreen I, nebo fluorochromem značené sondy specifické pro amplifikovaný úsek dané nukleové kyseliny. SybrGreen I se váže na dvouvláknové úseky DNA, v našem případě na produkty PCR. Tato vazba umožňuje fluorescenci této látky a tím též možnost kvantifikace PCR produktu. Nevýhodou této metody je, že nerozlišuje mezi specifickým a nespecifickým produktem PCR a tedy stanovuje celkové množství všech produktů PCR, včetně nespecifických produktů

(např. dimery primerů). O přítomnosti nespecifických produktů PCR se přesvědčíme pomocí analýzy křivek tání po ukončené PCR.

Pro zjišťování množství specifického produktu PCR využíváme fluorescenčně značené specifické sondy. Jak systém SybrGreen I, nebo specifické sondy, vždy zjišťujeme počet cyklů potřebných pro prahovou fluorescenci na počátku exponenciální fáze amplifikace vzorků. Srovnáním s kalibrační křivkou lze poměrně spolehlivě stanovit výchozí počet molekul templátu ve vzorku před PCR.

Existuje více typů specifických sond, avšak nejčastěji používané sondy pro kvantifikaci jsou lineární hydrolyzační sondy (tzv. TaqMan sondy). Tato sonda má na jednom svém konci tzv. receptor (R), který absorbuje jeho světelné záření, ale jeho fluorescence je zhasena zhasěčem (Q) na druhém konci sondy. Při proběhnutí PCR je sonda rozštěpena nukleázovou aktivitou polymerázy a uvolnění receptor může emitovat fluorescenční záření.

## MATERIÁL A METODY

Pro ilustraci uvádíme postupy při prvotních experimentech s RT-PCR technikami s viry bramboru (PVY a PLRV) řešené v rámci výzkumného projektu EP 0960996561 *Molekulárně genetické techniky pro detekci virů bramboru* z let 1996 až 1999. Postupy i výsledky z dalších let jsou dostupné v našich citovaných publikacích, uvedených níže.

### Postupy extrakce virové RNA pro RT-PCR

Bylo prověřováno pět postupů přípravy RNA, z toho tři postupy extrakce RNA:

Metoda A. Tradiční fenol-chloroformová extrakce (BARKER *et al.*, 1993).

Pletivo bylo homogenizováno s pufrem (směs 1 : 1 objem/objem fenolu, 0,1 M LiCl, 10mM EDTA, 1% SDS, 0,1M Tris-Hcl, pH 8,0) zahřátým na 80 °C a homogenát byl míchán a inkubován při této teplotě 5 min. Po ochlazení na pokojovou teplotu byla směs extrahována směsí chloroform/isoamylalkohol (24 : 1) a RNA precipitována z vodní fáze pomocí 4 M LiCl při 4 °C. Po centrifugaci byla RNA rozpouštěna ve vodě a precipitována ethanolem (-20 °C/12h).

Metoda B. Extrakce pomocí RNazol B (Gibco, BRL).

Vzorek (cca 100 mg) byl homogenizován v 1 ml RNazolu B, promíchán, a po přidání 125 µl chloroformu znova promíchán. Tato směs byla centrifugována 4 min. při 21 000 g. Vodní fáze (cca 600 µl) byla precipitována stejným objemem isopropanolu v ledové lázni. Sediment po centrifugaci (4 min./21000 g) byl opláchnut 70% ethanolem a po oschnutí rozpuštěn v 50 µl vody.

Metoda C. Extrakcí RNA pomocí RNeasy Plant Total RNA Kit (QIAGEN).

Vzorek (cca 100 mg) byl rozetřen v kapalném dusíku, extrahován v lyzačním pufru (450 µl) a inkubován 2 min při 56 °C. Lyzát byl aplikován na QIA shredder, centrifugován 2 min. při 21 000 g, eluát byl přenesen na RNeasy spin column a centrifugován 15 s při 8 000 g. Ná-

sledovalo promytí promývacím pufrém RW1 (700 µl) a dvojnásobné promytí pufrém RPE (500 µl). Zachycená RNA byla extrahována z kolonky vodou (50 µl).

Souběžně byly též zkoušeny dva imunovazebné postupy:

Metoda D. Postup dle WEIDEMANNA a MAISSE (1996).

Polypropylenové mikrozkušavky (0,2 ml) byly inkubovány se 100 µl polyklonálních protilátek PVY (IPO Wageningen) v ředění 1 : 500 v uhličitanovém potahovacím pufru (pH 9,6) a po promytí sterilním PBS-T bylo aplikováno 50 µl extraktu z rostlinného materiálu (200 mg rostlinného materiálu/2ml PBS-T). Po další inkubaci přes noc v chladničce byly mikrozkušavky opět 3x promyty sterilním PBS-T.

Metoda E. Postup dle GLAISE *et al.* (1996).

Mikrotitrační ELISA destičky se zvýšenou vazebnou kapacitou (např. Nunc - MaxiSorp) byly inkubovány přes noc v chladničce s 50 µl polyklonálních protilátek PVY nebo PLRV (IPO Wageningen) v ředění 1 : 500 v uhličitanovém potahovacím pufru (pH 9,6). ELISA destička byla 3× promyta sterilním PBS-T, do potažených ELISA destiček bylo aplikováno 50 µl extraktu z rostlinného materiálu (200 mg rostlinného materiálu/2ml PBS-T) a byly inkubovány přes noc v chladničce. ELISA destička byla opět 3x promyta sterilním PBS-T a navázaná virová RNA byla využita k reverzní transkripci přímo v ELISA destičce.

Z výsledků porovnání pěti metod separace RNA v předběžných pokusech vyplynuly tyto závěry pro jejich využívání pro RT-PCR: Metoda A se skládá z velkého počtu operací a je též poměrně zdlouhavá (zpracování vzorků trvá 2-3 dny). Pro tyto nevýhody je i přes odpovídající kvalitu produktu méně vhodná pro sériovou práci. Metody B i C poskytovaly plně vyhovující výsledky jak z hlediska kvality produktu, tak i snadnosti a rychlosti vlastního provedení separace. Metoda C byla proto využívána i v dalších diferenciacích pokusech.

Imunovazebné techniky (metoda D a E) byly zejména v počátečních experimentech mnohem méně citlivé a též méně spolehlivé nežli metody extrakční. Výrazného zlepšení citlivosti a spolehlivosti testování bylo dosaženo až po optimalizaci vlastního postupu, spočívající zejména ve zvýšení koncentrace vazebných protilátek a používání destiček pro ELISA se zvýšenou vazebnou kapacitou (např. Nunc-MaxiSorp). Kromě menší náročnosti pracovní, časové i finanční je výhodná i možnost provedení RT přímo na ELISA destičce (metoda E), která byla proto též používána v dalších pokusech. Obě separační metody (celková RNA v postupu C a virový nukleoprotein v postupu E) dávaly v následné RT-PCR plně srovnatelné výsledky.

Bylo porovnáno a optimalizováno pět metod přípravy RNA, z nichž tradiční fenol-chloroformová metoda (A), poskytovala uspokojivé výsledky z hlediska kvality získaného produktu. Byla však v porovnání s dalšími metodami používajícími komerční premixy extrakčních pufrů (B), nebo využívající pro izolaci celkové RNA silikagelové membrány (C), poměrně pracná a časově náročná. Metoda C je rovněž vhodná pro sériovou práci a stejně jako některé další postupy (SINGH a SINGH, 1995) nevyžaduje práci s fenolem.

Metody používající před vlastní RT-PCR imunitní vazby antigenu jsou pracovně i finančně méně náročné, na rozdíl od literárních údajů (např. KOENIG *et al.*, 1995; WEIDEMANN a MAISS, 1996), jsme však z počátku pozorovali jejich nepříjemně nízkou citlivost. Teprve dodatečnými úpravami vlastního postupu (výběr a koncentrace protilátek, inkubace, vazebná kapacita destiček) došlo ke zlepšení až na požadovanou úroveň (PTÁČEK a DĚDIČ, 1997). Po optimalizaci postupu neměla na detekci viru pomocí RT-PCR výchozí RNA (celková v metodě C, virová v metodě E) výrazný vliv.

Naše experimenty ukázaly použitelnost všech testovaných metod. Extrakční soupravy firem Qiagen a Gibco poskytovaly izoláty celkové RNA v dostatečné kvalitě pro následnou RT-PCR. Předností obou metod je jejich nízká časová náročnost. Imunovazebná technika byla modifikována: namísto původně prováděné izolace virové RNA a následné RT-PCR v polypropylénových mikrozkuvkách, která byla během roku 1996 shledána jako nedostatečně citlivá, byla ve spolupráci se zahraničním partnerem (projekt BARRANDE) optimalizována tato technika pro provedení v mikrotitračních destičkách se zvýšenou vazebnou kapacitou. Provedení imunovazebné metody je sice ze všech uvedených technik relativně časově nejnáročnější (inkubace přes noc), avšak díky možnosti paralelní izolace virové RNA z velké sady vzorků na mikrotitrační destičce je doba izolace v přepočtu na jeden vzorek dokonce ještě kratší než u výše zmíněných kitů. Navíc tato metoda, jako jediná z uvedených, poskytuje specificky izoláty virové (nikoli celkové) RNA, čímž se odstraní možná příčina nespecifických produktů reverzní transkripce a následné polymerázové řetězové reakce. Finanční náklady imunovazebné techniky při využití kapacity mikrotitrační destičky jsou nejnižší ze srovnávaných metod. Na základě našich dosavadních dosažených výsledků lze konstatovat, že všechny výše zmíněné techniky jsou použitelné pro účely RT-PCR testování virových onemocnění brambor. Rozhodujícím faktorem pro výběr mezi nimi je počet testovaných vzorků a vybavení laboratoře. V naší laboratoři upřednostňujeme imunovazebnou metodu, pokud není dostupný specifický IgG pro separaci dané virové RNA, používáme kit fy Qiagen.

### **Oligonukleotidové primery**

Na základě literárních údajů byly navrženy sekvence oligonukleotidových primerů pro viry PVY a PLRV a tyto primery byly syntetizovány.

#### **1. PVY**

Byly porovnávány různé sady primerů navržené pro detekci PLRV a jak celého spektra kmenů PVY, tak jednotlivých kmenových skupin, včetně podskupiny PVY-NTN (GLAIS *et al.*, 1996; WEIDEMANN a MAISS, 1996; WEILGUNY a SINGH, 1998). Autoři těchto prací vycházeli ze sekvence genomu PVY-NTN (H) (THOLE, 1993), oligonukleotidové primery navrhli z oblasti 5'NTR a z oblasti kódující P1 protein, kde se nacházejí též signifikantní rozdíly mezi jednotlivými izoláty PVY (TORDO *et al.*, 1995).

a) Primery podle GLAIS *et al.* (1996) měly následující sekvenci nukleotidů:

Primer A: 5' AAC ACT CAC AAA AGC TTT CA  
Primer B: 5' T(CT)A (CT)AA AC(AG) CT(CT) ATT (CT)TC AC  
Primer C: 5' AAT TAA AAC AAC TCA ATA CA  
Primer D: 5' TG(CT) GA(CTA) CCA CGC ACT ATG AA

b) Primery doporučené WEIDEMANNEM a MAISSEM (1996) tvořila tato sekvence:

Primer 1: 5' TTC CAA AGT GTC CTT TGA G  
Primer 2: 5' TCA TCA AAC AAA CTC TTT C  
Primer 3: 5' CAA GAC TGA TGC CCA GAT

c) Primery navržené WEILGUNY a SINGHEM (1998):

Primer 1S: 5' GCT TGA CAT AAT TTG CTT  
Primer 3S: 5' GCG TGC GAT ATG TTT TTG C  
Primer 4S: 5' CAG ATT GGT TCC ATT GAA TGC

d) Primery navržené MATOUŠKEM (1999)

Primer Y-F: 5' ACC CGC TCC TTT TGG GCT AG  
Primer Y-R: 5' TCT CTC TCC TCG CGC TTC TT

e) Primery podle GLAISE *et al.* (1998) - celý genom

Primer 5'NTR: 5' AAT TAA AAC AAC TCA ATA CAA CAT AAG AAA  
Primer HR: 5' TAC GCA GTG TTG GCT TCT TGA AGA ATG GTT  
Primer HF: 5' AAC CAT TCT TCA AGA AGC CAA CAC TGC GTA  
Primer 3'NTR: 5' GTC TCC TGA TTG AAG TTT AC

## 2. PLRV

Primery podle SINGH *et al.* (1995)

Primer PLRV-F: 5' CGC GCT AAC AGA GTT CAG CC  
Primer PLRV-R: 5' GCA ATG GGG GTC CAA CTC AT

V naší práci používané primery syntetizovala firma IDT (Integrated DNA Technologies, USA).

## RT-PCR

Ze souprav pro reverzní transkripci byl na základě zkušeností na pracovištích základního výzkumu (BFÚ AV ČR Brno, ÚMBR AV ČR České Budějovice) vybrán GeneAmp RNA PCR Kit (Perkin-Elmer). Při úvodních experimentech byla reverzní transkripce úspěšná u všech vzorků testované sady (rostliny bramboru infikované PVY-N, PVY-O, PVA, PLRV, PLRV+PVS, PVY+PVS a bezvirová kontrolní rostlina - všechny rostliny testovány ELISA). V následné PCR pak byly získány specifické produkty v případě primerů pro PVY, zatímco u primerů pro PLRV až při použití 1% TMA (tetramethylamoniumchloridu), který potlačuje nespecifickou amplifikaci (vznik nespecifických produktů). Rovněž jsme pokračovali v designování alternativních primerů, které poskytovaly specifické produkty i bez speciálních přísad.

Po předchozích zkušenostech s GeneAmp RNA PCR kitem (Perkin-Elmer) byl dále zkušebně používán též EZ r Tth GeneAmp RNA PCR kit (Perkin-Elmer) a dále vlastní kombinace reagentů pro RT-PCR. Jednokroková RT-PCR, na níž je založen kit EZ r Tth GeneAmp, nesplnila naše očekávání po stránce zjednodušení a zrychlení procedury. Při prvních pokusech o multiplex PCR (3 primery v jedné reakci) tento kit na rozdíl od GeneAmp RNA PCR kitu neposkytoval uspokojivé výsledky. Navíc tento kit není kompatibilní s optimalizovanou imunovazebnou metodou. Byla proto sestavena vlastní souprava pro RT-PCR obsahující AMV reverzní transkriptázu. Tato souprava poskytuje v kombinaci s imunovazebnou technikou izolace virové RNA lepší výsledky než oba testované kity Perkin-Elmer. Ve spojení s extrakčními kity pro izolaci celkové RNA poskytuje naše souprava výsledky srovnatelné s kity Perkin-Elmer. Po těchto zkušenostech s GeneAmp RNA PCR kitem (Perkin-Elmer), vlastními kombinacemi komponent pro RT-PCR obsahujícími buď MuLV nebo AMV reverzní transkriptázu, jsme používali námi kombinované soupravy a komerční soupravy od firmy Sigma, které poskytovaly výsledky srovnatelné s kity Perkin-Elmer při nižších finančních nákladech.

Reverzní transkripce u postupů extrakce RNA A-D probíhala v 0,2 ml PCR zkumavkách 30 min při 42 °C, následovala třiminutová denaturace při 97 °C a pětiminutové ochlazení při 5 °C. V postupu extrakce E probíhala reverzní transkripce přímo v ELISA destičce 60 min při 42 °C.

Vlastní PCR s primery podle GLAISE *et al.*, (1996) probíhala opět v 0,2 ml PCR zkumavkách. Reakční směs obsahovala 32,75 µl vody, po 2 µl primerů (ad nebo bd nebo cd) (10 µmol/l), 4 µl 25mM MgCl<sub>2</sub>, 4 µl 10x PCR pufru, 0,25 µl Taq polymerázy (5U/µl) a 5 µl cDNA. Po pětiminutové denaturaci při 94 °C následovalo 30 cyklů 60 s při 94 °C, 60 s při 57°C, 60 s při 72 °C s finální extenzí 5 min při 72 °C.

Rovněž v 0,2 ml zkumavkách probíhala PCR s primery navrženými podle WEIDEMANNA a MAISSE (1996). Reakční směs obsahovala 30,75 µl vody, po 2 µl primerů 1, 2 a 3 (20µmol/l), 4 µl 25mM MgCl<sub>2</sub>, 4 µl 10x PCR pufru, 0,25 µl Taq polymerázy (5U/µl) a 5 µl cDNA. Po pětiminutové denaturaci při 94 °C následovalo 30 cyklů 45 s při 94 °C, 45 s při 51 °C, 60 s při 72 °C s finální extenzí 5 min při 72 °C.

Rovněž v 0,2 ml zkumavkách probíhala PCR s primery navrženými podle WEILGUNY a SINGHA (1998) a MATOUŠKA (1999). Reakční směs obsahovala 30,75 µl vody, po 2 µl primerů 1S, 3S a 4S (20µmol/l) ev. 3 µl primerů Y-F a Y-R (10µmol/l) , 4 µl 25mM MgCl<sub>2</sub>, 4 µl 10x PCR pufru, 0,25 µl Taq polymerázy (5U/µl) a 5 µl cDNA. Po pětiminutové denaturaci při 94 °C následovalo 30 cyklů 60 s při 94 °C, 60 s při 50 °C nebo při 63 °C, 60 s při 72 °C s finální extenzí 5 min při 72 °C.

Rovněž v 0,2 ml zkumavkách probíhala PCR s primery navrženými podle SINGHA *et al.* (1995). Reakční směs obsahovala 30,75 µl vody, po 1µl primerů PLRV-F a PLRV-R (10µmol/l), 4 µl 25mM MgCl<sub>2</sub>, 4 µl 10x PCR pufru, 0,25 µl Taq polymerázy (5U/µl) a 5 µl cDNA.



Po pětiminutové denaturaci při 94 °C následovalo 35 cyklů 60 s při 94 °C, 60 s při 55 °C, 60 s při 72 °C s finální extenzí 5 min při 72 °C.

PCR produkty byly analyzovány v 1% agarózovém gelu s ethidiumbromidem. Pro RT-PCR byl používán termocykler PTC-100 (MJ Research), pro horizontální elektroforézu VN zdroj 2kV 200mA (Vývoj. dílny ČSAV) a aparatury fy Omni-Bio. Gely byly vyhodnoceny dokumentačním systémem KS-3000 (Ultralum) bezprostředně po ukončení elektroforézy.

### **Restrikční štěpení**

10 µl PCR produktu získaného RT-PCR dle GLAISE *et al.* (1996) s párem primerů cd, bylo štepeno 4 U Taq I endonukleasy 2 h při 65 °C.

RT-PCR používaná k detekci PVY umožnila kmenovou diferenciaci PVY při využití tří specifických oligonukleotidových primerů (WEIDEMANN a MAISS, 1996). Okruh používaných izolátů PVY dával při RT-PCR s primery 1 a 3 amplifikační produkt o délce 535 bp, charakteristický pro všechny kmeny PVY. S primery 1 a 2 byl získán amplifikační produkt o délce 835 bp pouze u izolátů ze skupiny PVY-NTN. Izoláty dalších virů bramboru i viruprosté rostliny s těmito primery žádné amplifikační produkty v RT-PCR nevytvářely. Ve spolupráci se zahraničním partnerem (BARRANDE) byla používána další metoda RT-PCR využívající čtyři specifické oligonukleotidové primery (GLAIS *et al.*, 1996), vzniklé PCR produkty byly podrobeny restriktázovému štěpení (IC-RT-PCR-RFLP). V tomto postupu je možno použitím tří dvojic diferencovat C, N a O kmeny viru bramboru, pro diferenciaci PVY-NTN je třeba využít restrikní štěpení.

## **VÝSLEDKY A DISKUSE**

Na tyto výše uvedené předběžné výsledky jsme navázali v komplexních pokusech s 38 izoláty viru Y bramboru (PVY) pocházejícími z různých zemí Evropy a z Kanady. Byla ověřována možnost jejich diferenciaci do příslušných kmenových skupin z hlediska biologického, sérologického i molekulárně genetického, tj. pomocí biologického testu na rostlinách tabáku (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun), sérotypizací kmenově specifickými protilátkami PVY-N (Bioreba) a molekulární diagnostikou pomocí RT-PCR. Podle reakce rostlin tabáku bylo možno do kmenové skupiny PVY-N zařadit 30 izolátů. Sérotypově odlišné byly čtyři kontrolní izoláty, u nichž nekorespondovala pozitivní reakce specifických PVY-N protilátek s nekrotickou reakcí rostlin tabáku. V rámci RT-PCR byly použity dva postupy (extrakce celkové RNA a imunovazebná technika) přípravy RNA, obě metody poskytly spolehlivé a reprodukovatelné výsledky. Příslušnými kombinacemi primerů navrženými GLAISEM *et al.* (1996) a WEIDEMANNEM a MAISSEM (1996) byly detekovány buď všechny izoláty PVY bez jejich další diferenciaci, nebo při výběru vhodných kombina-

cí primerů bylo možné další rozlišení izolátů do kmenových skupin (PVY-O a PVY-N). Specifickou dvojicí primerů pro detekci PVY-O byl prokázán amplifikační produkt u 16 zkoušených izolátů. V této skupině byla u devíti izolátů též, s jinou dvojicí primerů, prokázána přítomnost amplifikačního produktu specifického pro kmenovou skupinu PVY-N, problematika směsných infekcí a možnosti odlišení izolátů z podskupiny PVY-NTN bude dále studována (včetně využití RFLP).

Na základě reakce rostlin tabáku lze z hodnocených 38 izolátů zařadit do kmenové skupiny PVY-O osm izolátů (reagovaly pouze mozaikovitými příznaky) a do kmenové skupiny PVY-N 30 izolátů (nekrotické příznaky na listech, zejména nekróza žilek, později též zasychání a odumírání listů). S těmito vizuálními příznaky na tabácích ve značné míře korespondují i výsledky sérotypového určení pomocí specifických monoklonálních protilátek (Mab), kde jejich pozitivní reakce byla charakteristická pro nekrotické (PVY-N) izoláty. Rozdílné výsledky daly pouze izoláty Nord 242, IL56 orig. a Y Wi Kerl., kde slabě až silně nekroticky reagující rostliny tabáku nedávaly pozitivní reakci s N-specifickými protilátkami a naopak izolát 266-9F s pouze mozaikovitým typem příznaků na tabácích dával s těmito protilátkami slabě pozitivní reakci.

Při výběru vhodných dvojic primerů (c-d nebo 1-3) byly v našich pokusech pomocí RT-PCR pozitivně detekovány všechny zkoušené izoláty PVY. Tyto výsledky byly shodné jak u primerů navržených GLAISEM *et al.* (1996), tak WEIDEMANNEM a MAISSEM (1996). Všechny izoláty byly shodně detekovány též při použití obou izolačních technik (C a E).

Diferenciaci izolátů kmenové skupiny PVY-O umožnilo v našich pokusech pouze použití dvojice primerů b-d podle GLAISEM *et al.* (1996), produkujících v pozitivním případě amplifikační produkt 926 bp. Tomuto odpovídalo 16 zkoušených izolátů, tj. dvojnásobek oproti biotestu na tabácích a při sérotypizaci. V této skupině izolátů však byla u devíti prokázána též přítomnost amplifikačního produktu o délce 931 bp (kombinace primerů a-d), který je specifický pro kmenovou skupinu PVY-N.

Kombinace primerů 1–2 navržených WEIDEMANNEM a MAISSEM (1996) byla autoru směřována ke specifické detekci izolátů podskupiny PVY-NTN, vyvolávajících u brambor nekrotické změny na povrchu hlíz (PTNRD). Z výsledků našeho ověřování vyplývá, že 1) celková RNA izolovaná elucí i virová RNA připravená imunovazebnou technikou reagují v RT-PCR shodně, 2) tyto specifické amplifikační produkty o délce 835 bp byly pozorovány pouze u izolátů přiřazených alespoň některým z diferenačních postupů do kmenové skupiny PVY-N, 3) amplifikační produkt 835 bp vytvářely všechny izoláty, reprezentující v našich experimentech skupinu ověřených původců nekrotických změn na hlízách citlivých odrůd bramboru.

Přesto, že biologické testy na rostlinách tabáku (*N. tabacum* cv. Samsun) umožňují základní rozdělení izolátů do dvou skupin PVY-O a PVY-N (DEBOKX a HUTTINGA, 1981), nelze podle nových údajů jednoznačně všechny izoláty PVY, vyvolávající nekrózy na tabáku, zařadit do skupiny PVY-N (MCDONALD a SINGH, 1996). Např. PVYmn a PVYnn



izolované z tabáků a některých dalších druhů rostlin čeledě *Solanaceae* mohou tyto nekrózy na tabáku vyvolávat, ale nejsou infekční pro brambory (MCDONALD a KRISTJANSSON, 1993). Tyto izoláty též nemusí reagovat s některými PVY-N specifickými protilátkami. Izoláty podobného typu se však vyskytly též u brambor v Polsku (CHRZANOWSKA, 1991) a pravděpodobně se vyskytují též ve Francii (KERLAN – osobní sdělení). V našich pokusech jsou reprezentovány kontrolními izoláty IL56, YWi Kerl, Nord 242 a jejich reakce odpovídá popisům ze zahraničí. Kontrolní izoláty PVY-NTN, o kterých je známo, že vyvolávají nekrózy na hlízách bramboru – PTNRD (Lukava, Nicola, Vital, Igor, Ranka) ve všech případech reagovaly jak nekrozami na tabáku, tak pozitivně s PVY-N specifickými protilátkami. Shodně reagovaly též izoláty řazené do skupiny PVY-N a přes určité rozdíly v síle nekrotické reakce další diferenciací izolátů byla neúspěšná.

Pozitivní detekci všech izolátů, které je možné biotestem na tabáku a reakcí s PVY-N specifickými protilátkami zařadit do skupiny PVY-N (včetně podskupiny PVY-NTN), umožňovala RT-PCR podle GLAISE *et al.* (1996) s kombinací primerů a-d, kde byl pozorován specifický amplifikační produkt 931 bp. Výjimka byl pouze blíže nespécifikovaný izolát T6 a odchylný izolát patřící do skupiny Wilga. Pro výskyt amplifikačních produktů obou kmenových skupin viru Y bramboru u řady izolátů lze nalézt vysvětlení buď ve skutečné přítomnosti směsných infekcí, nebo v nedostatečné specifitě navržených primerů. Z biotestu na tabácích, kde dochází k překrytí mozaikovitých příznaků nekrotickou reakcí, ani z výsledku sérotypizace s jedním druhem protilátek, nelze vyvozovat přesnější závěry. RT-PCR s primery podle WEIDEMANNA a MAISSE (1996) byly detekovány jak všechny izoláty PVY bez bližší specifikace, tak byly pozitivně detekovány známé kontrolní izoláty z podskupiny PVY-NTN. Shodně s výsledky tohoto autora bylo rovněž prokázáno, že kontrolní kalifornské izoláty indukující nekrozu hlíz brambor (TU619 a TU660) (MCDONALD a SINGH, 1995), nedávají specifický amplifikační produkt a jsou tedy odlišné od evropských izolátů tohoto typu. V následujících experimentech bylo dosaženo shodných výsledků pomocí postupu dle WEILGUNY a SINGH (1998), kde závisí specifita detekce (všechny kmeny PVY nebo PVY-NTN) na teplotě „annealingu“. Výhodou tohoto postupu je i získání kratšího PCR produktu (394 bp), který je využitelný po naznačení nejen jako sonda pro RNA-DNA hybridizace, tento fragment byl použit i ke klonování, ale tyto produkty byly ještě společně s ještě kratšími produkty (204 bp), získanými pomocí primerů designovaných MATOUŠKEM (1999), využity k hodnocení variability izolátů PVY-NTN metodou TGGE a analýzou heteroduplexů. Tyto PCR produkty (394 bp) získané u 4 izolátů (dva ze skupiny PVY-NTN a dva ze skupiny PVY-Wilga) byly podrobeny komplexnímu testu s 29 restrikcími endonukleasami, avšak pouze tři (*EcoRI*, *Fok I* a *Mnl I*) poskytovaly rozdílný obraz (využitelný pro sekvenování): *EcoRI*, *Fok I* - rozlišení mezi PVY-NTN a PVY-Wilga, *Mnl I* - rozdíly mezi PVY-NTN izoláty.

Okruh komplexně charakterizovaných izolátů dosáhl 145.

Na modelovém okruhu izolátů byla používána další metoda RT-PCR amplifikující celý genom PVY využívající čtyři specifické oligonukleotidové primery (ve spolupráci s francouzským partnerem (BARRANDE), GLAIS *et al.*, 1998), vzniklé PCR produkty (první o délce 4063 bp a druhý o délce 5670 bp) byly podrobeny restrikcí štěpení (IC-RT-PCR-RFLP). V těchto postupech je možno pomocí RFLP mapovat celý genom jednotlivých izolátů PVY. Je možné podrobněji diferencovat celé kmenové spektrum PVY a získat více informací o pozici nekrotických determinant, nejsou ale použitelné k praktické detekci virů. V rámci řešení tohoto projektu byla zahájena a probíhala spolupráce s francouzským (BARRANDE) a se slovinským partnerem (KONTAKT) na kmenové diferenciaci PVY, s důrazem na PVY-NTN.

Při detekci PLRV RT-PCR nedocházelo i přes optimalizaci postupu se sadou původně používaných primerů ke vzniku předpokládaných specifických produktů. Proto byly designovány nové oligonukleotidové primery, které po optimalizaci postupu poskytovaly specifické produkty (336 bp). Specifický amplifikační produkt byl získán pouze u okruhu izolátů PLRV, izoláty dalších virů bramboru a viruprosté rostliny s těmito primery nevytvářely v RT-PCR žádný amplifikační produkt. PCR produkty byly analyzovány jednak v 1% agarózovém gelu s ethidiumbromidem, dále byl využit námi modifikovaný „RT-PCR ELISA DIG Labeling and DIG Detection Systems“ od firmy Boehringer. Zabudování nukleotidů značených digoxigeninem během RT-PCR umožní následnou detekci za využití PCR ELISA kitu. Výrobce kitu doporučuje použití biotinem značené oligonukleotidové sondy specifické pro daný PCR produkt. Tento krok jsme nahradili současným zabudováním nukleotidů značených jak digoxigeninem, tak i biotinem během RT-PCR. Takto připravené produkty bylo možno detekovat pomocí PCR ELISA kitu. Dále jsme postupovali podle standardního protokolu u každého z obou kitů.

Pro RT-PCR byl používán termocykler PTC-100 (MJ Research), pro horizontální elektroforézu VN zdroj 2kV 200mA (Vývoj. dílny ČSAV) a aparatury fy Omni-Bio. Gely byly vyhodnoceny dokumentačním systémem KS-3000 (Ultralum) bezprostředně po ukončení elektroforézy, ev. výsledky PCR-ELISA detekce byly vyhodnoceny spektrofotometricky (ELISA spektrofotometr DYNATECH MR 4100).

V závěru řešení tohoto projektu se nám podařilo zoptimalizovat podmínky **vícenásobné varianty (multiplex) RT-PCR**. První zkušenosti jsme získali již dříve při identifikaci PVY pomocí metody dle WAIDEMANNA a MAISSE (1996), kdy při použití tří primerů v jedné reakci vznikají dva PCR produkty. Právě tento postup jsme použili společně s postupem dle SINGH *et al.* (1995) využívaného k detekci PLRV k multiplex PCR. Oba tyto postupy mají blízké teploty annealingu 51 °C a 55 °C, optimální teplota multiplex PCR byla 52 °C a reakční profil dle SINGHA *et al.* (1995). Vznikaly 3 PCR produkty o velikosti 336 bp - PLRV, 535 bp - PVY a 835 bp - PVY-NTN. Nevýhodou tohoto postupu avšak je, že ve své podstatě vylučuje použití velmi kvalitní DNA polymerázy DyNaZyme II (Finnzymes), kterou používáme pro naše experimenty, protože je řádově finančně méně náročná, než DNA

polymerázy od jiných renomovaných producentů (např. P-E, Boehringer). DNA polymeráza DyNaZyme II není zcela přesná při tvorbě více produktů (preferuje tvorbu jednoho produktu), takže je pro tuto svoji jedinou negativní vlastnost pro multiplex PCR téměř nepoužitelná. Použití jiných DNA polymeráz výrazně zvýší finanční náročnost multiplex PCR a tím je finančně náročnější než více samostatných PCR reakcí, a proto v současné době tuto multiplex PCR z ekonomických důvodů nepoužíváme.

V průběhu dalších let se rozšířil soubor detekovaných patogenů. Byl rovněž zaveden, optimalizován a rutinně používán proces PCR v reálném čase.

## PODĚKOVÁNÍ

Práce vznikla i díky institucionální podpoře na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace reg. č. MZE-RO1618.

## VYBRANÉ PUBLIKACE Z LET 1996–2019

- MATOUŠEK, J. – TRNĚNÁ, L. – DĚDIČ, P. – PTÁČEK, J. – KREJČOVÁ, J. (1996): PCR amplification and analysis of potato virus S (PVS) coat protein region as a source for anti-PVS antisense RNA system. *Vědecké práce – Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, 12*: 43–52.
- PTÁČEK, J. – MATOUŠEK, J. – DĚDIČ, P. (1997): Detekce izolátů viru Y bramboru (PVY) pomocí polymerázové řetězové reakce (RT-PCR). In: XIV. Slovenská a Česká konferencia o ochraně rastlín: Zborník referátov. Nitra, 3.–4. 9. 1997: 40–41.
- PTÁČEK, J. – MATOUŠEK, J. – DĚDIČ, P. (1997): Possibilities of strain differentiation of potato virus Y (PVY) by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). In: *Recent advances in plant biotechnology, MOLECULAR BIOLOGY FOR AGRICULTURE*, České Budějovice, 25.–29. 8. 1997.
- PTÁČEK, J. – MATOUŠEK, J. – DĚDIČ, P. (1998): The possibility of specific PVY-NTN detection. In: 10. Virologická sekce EAPR, Baden, Rakousko, 5.-10.7. 1998.
- PTÁČEK, J. – MATOUŠEK, J. – DĚDIČ, P. (1998): Možnosti diferenciacie kmenového spektra viru Y bramboru (PVY) technikami polymerázové reakce (RT-PCR). *Rostlinná výroba, 44*: 545–551.
- PTÁČEK, J. – MATOUŠEK, J. – DĚDIČ, P. (2000): The diversification of potato virus Y (PVY). II. RT-PCR and hybridization approaches. In: Abstracts of 7<sup>th</sup> Symposium on New Aspects of Resistance Research on Cultivated Plants. Virus diseases. November 17-18, 1999 Aschersleben, Germany. Proceedings. *Beiträge zur Züchtungsforschung, 6(3)*: 45–48.
- MATOUŠEK, J. – PTÁČEK, J. – DĚDIČ, P. – SCHUBERT, J. (1999): Analysis of variability of P1 region of PVY using electrophoresis of pre-formed heteroduplexes. In: Abstracts of 7<sup>th</sup> Symposium on New Aspects of Resistance Research on Cultivated Plants. Virus diseases. November 17–18, 1999 Aschersleben, Germany. Proceedings. *Beiträge zur Züchtungsforschung, 6(3)*: 49–52.
- MATOUŠEK, J. – PTÁČEK, J. – DĚDIČ, P. – SCHUBERT, J. (2000): Analysis of variability of P1 gene region of N strain of PVY using TGGE and DNA heteroduplexes analysis. *Acta Virologica, 44*: 40–46.
- MATOUŠEK, J. – SCHUBERT, J. – DĚDIČ, P. – PTÁČEK, J. (2000): A broad variability of potato virus S (PVS) revealed by analysis of virus sequences amplified by RT-PCR. *Canad.J.Plant.Pathol., 22*: 29–37.
- MATOUŠEK, J. – SCHUBERT, J. – KUCHAR, M. – DĚDIČ, P. – PTÁČEK, J. – VRBA, L. – LICHTENSTEIN, C. P. (2000): The design and partial analysis of RNaseIII-anti-PVS antisense complex system to induce plant resistance. *Arch. Phytopath. Pflanz., 33*: 381–394.
- PTÁČEK, J. – ŠKOPEK, J. – DĚDIČ, P. – MATOUŠEK, J. (2002): Immunocapture-RT PCR probing of PVY isolates. *Acta Virologica, 46*: 63–68.

- PTÁČEK, J. – DĚDIČ, P. – ŠUŠTAR-VOZLIČ, J. (2002): New approach to characterise isolates of potato virus Y (PVY) by RT-PCR. *Inovační podnikání & transfer technologií*, 4, (příloha VI).
- DĚDIČ, P. – PTÁČEK, J. – MATOUŠEK, J. (2003): The diversification of potato virus Y (PVY) – biological, serological and molecular-diagnostic approaches. *Vědecké práce - Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod*, 14: 21–29.
- MATOUŠEK, J. – ORCTOVÁ, L. – STEGER, G. – ŠKOPEK, J. – MOORS, M. – DĚDIČ, P. – RIESNER, D. (2004): Analysis of thermal stress-mediated PSTVd variation and biolistic inoculation of progeny of viroid “thermomutants” to tomato and *Brasica* species. *Virology*, 323: 9–23.
- MATOUŠEK, J. – SCHUBERT, J. – PTÁČEK, J. – KOZLOVÁ, P. – DĚDIČ, P. (2005): Complete nucleotide sequence and molecular probing of Potato virus S genome. *Acta Virologica*, 49: 195–205.
- PTÁČEK, J. – DĚDIČ, P. (2006): Detection of Potato virus Y (PVY), Potato mop top virus (PMTV) and Tobacco rattle virus (TRV) using different diagnostic assays. IN: Abstract book 8th Conference of the European Foundation for Plant Pathology, Denmark 2006: 115.
- PTÁČEK, J. – DĚDIČ, P. (2007): Akomodace postupu polymerázové řetězové reakce v reálném čase (QRT-PCR) pro detekci viroidu PSTVd a některých virů bramboru. *Vědecké práce – Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod*, 15: 183–188.
- MATOUŠEK, J. – ORCTOVÁ, L. – PTÁČEK, J. – PATZAK, J. – DĚDIČ, P. – STEGER, G. – RIESNER, D. (2007): Experimental transmission of *Pospiviroid* population to weed species characteristic for potato and hop fields. *J. Virol*, 81: 11891–11899
- MATOUŠEK, J. – ORCTOVÁ, L. – PTÁČEK, J. – DĚDIČ, P. (2008): Biolistic Transmission of potato spindle tuber viroid (PSTVd) Populations to Weeds frequently grown on Potato Fields and PSTVd pathogenesis on Cultured *Chamomilla recutita*. *Vědecké práce – Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod*, 16: 43–55.
- PTÁČEK, J. – DĚDIČ, P. (2009): Využití duplex QRT-PCR pro detekci mop top viru bramboru (PMTV) a viru nekrotické kadeřavosti tabáku (TRV). In: Aktuální poznatky v pěstování, šlechtění, ochraně rostlin a zpracování produktů. Troubsko: Výzkumný ústav pčinnářský: 97–100.
- PTÁČEK, J. – DĚDIČ, P. (2009): Detekce a identifikace izolátů viru svinutky bramboru (PLRV) pomocí molekulárních technik RT-PCR a qRT-PCR. *Vědecké práce – Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod*, 17: 25–35.
- MERTELÍK, J. – KLOUDOVÁ, K. – ČERVENÁ, G. – NEČEKALOVÁ, J. – MIKULKOVÁ, H. – LEVKANIČOVÁ, Z. – DĚDIČ, P. – PTÁČEK, J. (2010): First report of Potato spindle tuber viroid (PSTVd) in *Brugmansia* spp., *Solanum jasminoides*, *Solanum muricatum* and *Petunia* spp. in the Czech Republic. *Plant Pathology*, 59(2): 392.
- MERTELÍK, J. – KLOUDOVÁ, K. – DĚDIČ, P. – PTÁČEK, J. (2010): Výsledky průzkumu viroidu vřetenovitosti hlíz bramboru (PSTVd) v okrasných rostlinách v České republice v letech 2007 až 2009. *Acta Pruhoniciana*, 94: 5–8.
- PTÁČEK, J. – DĚDIČ, P. (2010): Detekce viroidu vřetenovitosti hlíz bramboru (PSTVd) v okrasných rostlinách. *Úroda*, 58(12, vědecká příloha): 331–334.
- PTÁČEK, J. – DĚDIČ, P. – MERTELÍK, J. – KLOUDOVÁ, K. (2010) Vliv podmínek vedení rostlin *Solanum jasminoides* na spolehlivost detekce viroidu vřetenovitosti hlíz bramboru (PSTVd) pomocí qRT-PCR. *Vědecké práce – Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod*, 18: 97–101.
- MERTELÍK, J. – KLOUDOVÁ, K. – DĚDIČ, P. – PTÁČEK, J. (2011): Výskyt viroidu vřetenovitosti hlíz bramboru v okrasných rostlinách. In: Sborník přednášek 17.5.2011 Žatec: 20–24. ISBN 978-80-903545-4-8.
- PTÁČEK, J. – DĚDIČ, P. – MERTELÍK, J. – KLOUDOVÁ, K. (2011): Možnosti detekce viroidu vřetenovitosti hlíz bramboru (PSTVd). In: Sborník přednášek 17.5.2011 Žatec: 37–41. ISBN 978-80-903545-4-8.
- ČERVENÁ, G. – NEČEKALOVÁ, J. – MIKULKOVÁ, H. – LEVKANIČOVÁ, Z. – MERTELÍK, J. – KLOUDOVÁ, K. – DĚDIČ, P. – PTÁČEK, J. (2011): Viroids on *Petunia* and other Solanaceous Crops in the Czech Republic. *Acta Horticulturae*, 901: 35–40.
- PTÁČEK, J. (2013): Metody detekce viroidu vřetenovitosti hlíz bramboru (PSTVd). *Bramborářství*, 21(2): 9–11. ISSN 1211-2429.
- MATOUŠEK, J. – RAJEN, J. – PIERNIKARCZYK, J. – DĚDIČ, P. – MERTELÍK, J. – UHLÍŘOVÁ, K. – DURAISAMY, G.S. – ORCTOVÁ, L. – KLOUDOVÁ, K. – PTÁČEK, J. – STEGER, G. (2014): Characterization of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) incidence and new variants from ornamentals. *Eur. J. Plant Pathol.*, 138(1): 93–101. ISSN 0929-1873.
- PTÁČEK, J. (2016): Detekce a identifikace izolátů viru svinutky bramboru (PLRV) pomocí molekulárních technik RT-PCR a QRT-PCR. *Rostlinolékař*, 27(3): 16–18. ISSN 1211-3565.
- KMOCH, M. (2018): Detekce PVY (Potato virus Y) v listech a hlízách bramboru pomocí TaqMan real-time RT-PCR. *Úroda*, 66(12, vědecká příloha): 205–208.

KMOCH, M. (2019): Zjišťování přítomnosti PVY v sadbových hlízách bramboru pomocí real-time RT-PCR. In: PAZDERŮ, K. (ed.): Osivo a sadba: Sborník referátů XIV. národní odborný a vědecký seminář 7. února 2019. Praha: ČZU, katedra agroekologie a rostlinné produkce: 144–149. ISBN 978-80-213-2922-5.

## PATENT

303801 Reakční směs pro molekulární detekci viroidu vřetenovitosti hlíz bramboru pomocí kvantitativní RT-PCR

## UŽITNÉ VZORY

24088 Reakční směs pro molekulární detekci viroidu vřetenovitosti hlíz bramboru pomocí kvantitativní RT-PCR

25101 Reakční směs L1 pro molekulární detekci viru svinutky bramboru (PLRV) pomocí kvantitativní RT-PCR

25103 Reakční směs L2 pro molekulární detekci viru svinutky bramboru (PLRV) pomocí kvantitativní RT-PCR

25104 Reakční směs L3 pro molekulární detekci viru svinutky bramboru (PLRV) pomocí kvantitativní RT-PCR

## CERTIFIKOVANÉ METODIKY

PTÁČEK, J. – KREUZ, L. – ŠVECŮVÁ, R. – DOMKÁŘOVÁ, J. (2011): Metodický postup využití technik PCR a qPCR v reálném čase pro detekci viru svinutky bramboru (PLRV) pomocí molekulárních technik RT-PCR a Q-RT-PCR.

PTÁČEK, J. – KREUZ, L. – MATOUŠEK, J. – DOMKÁŘOVÁ, J. (2011): Metodický postup využití technik RT-PCR v reálném čase (qRT-PCR) a RT-PCR pro detekci viroidu vřetenovitosti hlíz bramboru (PSTVd).

## PRAKTICKÁ INFORMACE Č. 38

PTÁČEK, J. – MATOUŠEK, J. – KREUZ, L. – ŠVECŮVÁ, R. – DOMKÁŘOVÁ, J. (2012): Metodické postupy využitelné ve šlechtění IV. Havlíčkův Brod: Výzkumný ústav bramborářský. 36 s.

## LITERATURA

BARKER, H. – WEBSTER, K.D. – REAVY, B. (1993): Detection of potato virus Y in potato tubers: a comparison of polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. *Potato Res.*, 36: 13–20.

CHRZANOWSKA, M. (1991): New isolates of the necrotic strain of potato virus Y (PVY<sup>N</sup>) found recently in Poland. *Potato Res.*, 34: 179–182.

DE BOKX, J.A. – HUTTINGA, H. (1981): CMI/AAB Descriptions of plant viruses.

GLAIS, L. – KERLAN, C. – TRIBODET, M. – MARIE-JEANNE TORDO, V. – ROBAGLIA, C. – ASTIER-MANIFACIER, S. (1996): Molecular characterization of potato virus Y-N isolates by PCR - RFLP. *Eur. J. Plant. Pathol.*, 102: 655–662.

GLAIS, L. – TRIBODET, M. – GAUTHIER, J.P. – ASTIER-MANIFACIER, S. – ROBAGLIA, C. – KERLAN, C. (1998): RFLP mapping of the whole genome of the viral isolates representative of different biological groups of potato virus Y. *Arch. Virol.*, 143: 2077–2091.

KOENIG, R. – LÜDDECKE, P. – HAEBERLÉ, A. M. (1995): Detection of beet necrotic yellow vein virus strains, variants and mixed infections by examining single-strand conformation polymorphisms of immunocapture RT-PCR products. *Journal of General Virology*, 76: 2051–2055.

MCDONALD, J. G. – KRISTJANSSON, G. T. (1993): Properties of strains of potato virus YN in North America. *Plant Disease*, 77(1): 87–89.

MCDONALD, J.G. – SINGH, R.P. (1996): Response of potato cultivars to North American isolates of PVY<sup>NTN</sup>. *Am. Potato J.*, 73: 317–323.

MATOUŠEK, J. (1999): osobní sdělení.

PTÁČEK, J. – DĚDIČ, P. (1997): Detekce izolátů viru Y bramboru (PVY) pomocí polymerázové řetězové reakce (RT-PCR). In: Sbor. refer. z XIV. Slovenské a České konf. o ochr. rostlin: 40–41.

- SINGH, M. – SINGH, R.P. (1995): Digoxigenin-labeled cDNA probes for the detection of potato virus Y in dormant potato tubers. *J. Virol. Methods*, 52: 133–143.
- SINGH, M. – SINGH, R.P. (1997): Potato virus Y detection: sensitivity of RT-PCR depends on the size of fragment amplified. *Can. J. Plant Pathol.*, 19: 149–155.
- SINGH, R.P. – KURZ, J. – BOITEAU, G. – BERNARD, G. (1995): Detection of potato leafroll virus in single aphids by the reverse transcription polymerase chain reaction and its potential epidemiological application. *J. Virol. Methods*, 55: 133–143.
- SINGH, R.P. – SINGH, M. – MCDONALD, J.G. (1998): Screening by a 3-primer PCR of North American PVY<sup>N</sup> isolates for European-type members of the tuber necrosis-inducing PVY<sup>NTN</sup> subgroup. *Can. J. Plant Pathol.*, 20: 227–233.
- THOLE, V. – DALMAY, T. – J BURGÁN, J. – BALÁZS, E. (1993): Cloning and sequencing of potato virus Y (Hungarian isolate) genomic RNA. *Gene*, 123: 149–156.
- TORDO, M.J.V. – CHACHULSKA, A. M. – FAKHFAKH, H. – LE ROMANCER, M. – ROBAGLIA, C. – ASTIER-MANIFACIER, S. (1995): Sequence polymorphism in the 5'NTR and in the P1 coding region of potato virus Y genomic RNA. *Journal of General Virology*, 76: 939–949.
- WEIDEMANN, H.L. – MAISS, E. (1996): Detection of the potato tuber necrotic ringspot strain of potato virus Y (PVY<sup>N-TN</sup>) by reverse transcription and immunocapture polymerase chain reaction. *J. Plant Dis. Prot.*, 103: 337–345.
- WEILGUNY, H. – SINGH, R.P. (1998): Separation of Slovenian isolates of PVY<sup>NTN</sup> from the North American isolates of PVY<sup>N</sup> by a 3-primer PCR. *J. Virol. Methods*, 71: 57–68.

---

PTÁČEK, J. – MATOUŠEK, J.

**25 YEARS OF USING POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) TECHNIQUES FOR THE DETECTION OF VIRAL AND VIROID PATHOGENS OF POTATOES IN PRI HAVLICKUV BROD**

**Vědecké práce – Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, 2020, 26: 29–42**

The use of molecular genetic techniques at VÚB Havlíčkův Brod in the field of detection of potato viruses and potato viroid began 25 years ago. At present, these techniques are mainly used to detect Potato spindle tuber viroid (PSTVd) and Potato virus Y (PVY). The aim of this publication is to show developments in this area over the past 25 years.

RNA; RT-PCR; RT-qPCR

---

*Kontaktní adresa:*

RNDr. Jiří PTÁČEK, CSc.

Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o.

Dobrovského 2366, 580 01 Havlíčkův Brod, Česká republika

tel.: +420 569 466 244, e-mail: ptacek@vubhb.cz