



**ALTERNATIVNÍ METODY
A POSTUPY
LABORATORNÍ DIAGNÓZY**
Clavibacter michiganensis
subsp. sepedonicus

Ing. Petr Dědič, CSc.,
Ing. Martin Kmoch, Ph.D., Ing. Alena Krpálková
CERTIFIKOVANÁ METODIKA

2016

VÝZKUMNÝ ÚSTAV BRAMBORÁŘSKÝ HAVLÍČKŮV BROD, s. r. o.

OBSAH

I. CÍL METODIKY	1
II. ÚVOD DO PROBLEMATIKY	1
1. Diagnostické metody a postupy	3
1.1. Postup zpracování vzorků hlíz a rostlin bramboru pro laboratorní diagnózu <i>Cms</i>	3
1.1.1. Standardní postup – vzorky hlíz.....	3
1.1.2. Homogenizace v sáčcích – vzorky nadzemních částí rostlin a hlíz.....	4
1.2. Imunologické diagnostické metody <i>Cms</i>	4
1.2.1. Diagnóza <i>Cms</i> postupem DAS-ELISA.....	4
1.2.2. Diagnóza <i>Cms</i> postupem Luminex xMAP	8
1.3. Molekulární diagnostické metody	11
1.3.1. Postup izolace DNA z bramboru pomocí extrakční sady GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma).....	11
1.3.2. Konvenční PCR s vizualizací produktu na agarózovém gelu.....	13
1.3.3. Real-time PCR (qPCR)	15
1.3.3.1. Protokol diagnostiky <i>Cms</i> metodou TaqMan qPCR (TaqMan Real-Time PCR).	15
1.3.3.2. Protokol diagnostiky <i>Cms</i> metodou TaqMan qPCR s využitím housekeeping genu.....	17
III. NOVOST A ZDŮVODNĚNÍ POSTUPŮ	21
IV. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	21
V. EKONOMICKÉ ASPEKTY	22
VI. SOUHRN	24
VII. Seznam použité související literatury	24
VIII. Seznam vybraných publikací autorů, které předcházely metodice	25

I. CÍL METODIKY

Cílem bylo vybrat a ve vlastních experimentech ověřit a optimalizovat soubor exaktních laboratorních diagnostických metod pro *Cms*, které zatím nejsou (u nás) používány v rutinní diagnóze tohoto patogenu. Kromě diagnózy z extraktů hlíz, standardně kontrolovaných IF testem, u nových alternativních metod směřovat diagnózu též na postupy přípravy a hodnocení extraktů nebo izolované DNA z rostlin. Pro vlastní diagnózu využít dvě sérologické metody – DAS ELISA a Luminex xMAP, a dvě molekulární metody – konvenční PCR s elektroforetickou detekcí amplifikovaného produktu a dva postupy qPCR (Real-time PCR) s detekcí sondami TaqMan. Na příkladu výsledkových tabulek deklarovat u alternativních metod jak jejich detektabilitu (spolehlivost detekce), tak v případě qPCR též její vysokou citlivost, včetně kvality izolované DNA.

II. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

Na rostlinách bramboru (*Solanum tuberosum* L.) se vyskytují tři prokaryotické organismy, které u nás podléhají regulaci podle zákona č. 326/2004 Sb., o rostlinolékařské péči. Z nich se největší význam přikládá původci bakteriální kroužkovitosti, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (dále jen *Cms*).

Původce bakteriální kroužkovitosti bramboru, bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (SPIECKERMANN & KOTTHOFF 1914) Davis et al. 1984 (*Cms*), je zařazen v zemích EU do seznamu škodlivých karanténních organismů, na které se vztahují zvláštní opatření k zabezpečení ochrany proti zavlékání a rozšiřování škodlivých organismů rostlin a rostlinných produktů, (Direktiva OEPP/EPPO 2006/63/EC a 2006/58/EC), u nás zákon č. 245/2011 Sb. a vyhláška 382/2011 Sb.

Ve státech EU je současný postup při detekci a identifikaci *Cms* stanoven Směrnicí Rady 93/85/EEC (Anonymous 1993) a dále její novelizací (Anonymous 2006). Postup při testování má zabezpečit detekci latentních infekcí a přítomnost patogenu (pozitivní výsledek) se považuje za prokázáný, pokud je získán z nejméně dvou screeningových testů založených na odlišných biologických principech a je doplněn izolací a identifikací této čisté kultury jako *Cms*. Novelizovaný postup detekce a identifikace *Cms* zavádí povinně kromě IF-testu (imunofluorescenční test) ještě druhý rychlý screeningový test, a to FISH-test (fluorescent *in situ* hybridization) nebo PCR (polymerázovou řetězovou reakci).

Od roku 1995 se v České republice provádí každoroční důsledná kontrola všech partií zejména sadbových brambor s nulovou tolerancí přítomnosti to-

hoto patogenu. Během prvních deseti let programu eradikace došlo na základě výsledků screeningu ke snížení výskytu původce bakteriální kroužkovitosti v sadbových i nesadbových partiích, v roce 2005 dokonce nebyla u nás prokázána přítomnost patogenu v žádné partii sadbového materiálu bramboru. Otázka účinnosti uplatnění postupu a „nulové“ tolerance patogenu nabyla opět na významu s nárůstem počtu pozitivních nálezů po roce 2010.

Závažnost problematiky výskytu a diagnózy bakterií bramboru karanténního významu byla opětovně zdůrazněna též na jednání fytosanitární komise EU na počátku roku 2014. LE ROUX (2014) se zabývá zejména problematikou výskytu falešně pozitivních reakcí a návrhy, jak zlepšit spolehlivost testů a zkrátit dobu jejich provádění. Pro omezení falešně pozitivních výsledků a zvýšení citlivosti konfirmačních diagnostických metod navrhuje alternativní procedury. V rámci I. screeningových testů používat IF s různými protilátkami, nebo nezbytnost provedení dalšího testu (PCR, ELISA, FISH) a dvou dodatečných diagnóz v rámci II. screeningového testu. V rámci konfirmačních testů se tak uvažuje o možnosti považovat vzorek za infikovaný, jestliže tři testy daly pozitivní výsledek a zdlouhavá izolace patogenu by nebyla nutná. Navrhuje se při novém vzorkování navýšení počtu hlíz nad 1 000 ks.

S ohledem na nárůst výskytu *Cms* u nás v posledních letech je nezbytné rovněž zvážit účinnost následujících opatření:

a) Úroveň vzorkování partií – zvýšení pravděpodobnosti nálezů.

Při odběru vzorků k posklizňovým testům se vychází z předpokladu rovnoměrného výskytu infikovaných hlíz v partii (a následně v náhodně odebraném vzorku) a spolehlivé detekce výskytu infikovaných hlíz ve vzorku. Při standardním odběru 200 hlíz/25 t (nebo cca 200 hlíz/sklizeň z 1 ha) lze při „nulové“ toleranci výskytu a počtu pravděpodobnosti odvodit, že s $P 0,95$ lze detekovat pouze partie zamořené nad 1,5%! U partií s nižším podílem zamoření nedosahuje P statisticky významných hodnot a odhalení infikované partie se tak stává do značné míry náhodným. Partie s nižším výskytem infekce tak mohou projít do dalších ročníků množení, stát se významným zdrojem dalšího šíření cestou nových inokulací během mechanizované posklizňové úpravy a výsadby a být „náhodně“ odhaleny až v následujících, rozsáhlejších dceřiných partiích. Pro zvýšení spolehlivosti detekce patogenu je proto vzorkování a diagnóza u větších počtů hlíz nezbytným předpokladem.

b) Zvýšení spolehlivosti vlastní laboratorní detekce patogenu.

Cms lze v současnosti považovat za patogen u brambor s převážně latentním výskytem. Používání spolehlivých laboratorních metod detekce a diagnózy má proto nezastupitelný, prioritní význam.

Deklarovaná teoretická citlivost IF testů byla podkladem pro návrh detekce *Cms* v kompozitních vzorcích (extraktech) jednou analýzou z extraktu 200 hlíz! Kromě variabilní koncentrace bakteriálních buněk v hlízách (možnost jejího zvýšení pomocí prodloužení inkubace hlíz za pokojové teploty, která byla doporučena dříve a je již většinou uplatňována), je však toto „ředění“, přibližující se k hraničním hodnotám detektability zvláště při nízkém počtu infikovaných hlíz ve vzorku, negativně ovlivněno i vyšší pravděpodobností technické chyby přípravy jediného smíšeného extraktu. Zvýšení citlivosti vlastní detekce přípravou a hodnocením dílčích vzorků o menším počtu jedinců je logickým předpokladem pro řešení této problematiky s ohledem na tento požadavek.

Předkládaný manuál konkretizuje a detailně specifikuje náš příspěvek k otázce uplatnění postupů precizní diagnózy.

1. DIAGNOSTICKÉ METODY A POSTUPY

1.1. POSTUP ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ HLÍZ A ROSTLIN BRAMBORU PRO LABORATORNÍ DIAGNÓZU *Cms*

1.1.1. Standardní postup – vzorky hlíz

Extrakty ze vzorků hlíz se v zásadě získávají dle standardní metodiky používané při plošném screeningu výskytu bakteriálních infekcí u brambor. Odebrané hlízy se mechanicky očistí a po doporučené čtyřtydenní inkubaci při provokační teplotě 20–22°C v suché a temné místnosti se omyjí pod tekoucí vodou a nechají oschnout. Pomocí skalpelu či jiné vhodné pomůcky se seřízne pupek hlíz a z dužniny vykrojí část pletiva s cévními svazky o velikosti cca 15 mm. Cévní svazky se vykrajují s co nejmenším podílem okolní dužniny hlízy. Se shromážděnými segmenty se dále postupuje podle standardního návodu s využitím homogenizační nebo eluční metody.

Standardní postup přípravy suspenze z hlíz (doporučován pro kompozit dvou set výkrojků).

Při práci standardní homogenizační metodou se k vykrojeným segmentům přidá 50 ml sterilního extrakčního pufru (0,05 M fosfátový pufr, pH 7,0) a homogenizuje se 2 minuty ve vhodném homogenizátoru (např. Bag Mixer). Homogenát se převede do centrifugačních zkumavek a odstředí 10 min./180g při teplotě 4–10°C. Supernatant se převede do nových centrifugačních zkumavek a odstředí 10 min./10000g nebo 15 min./7000g při teplotě 4–10°C. Supernatant se slije, k peletě se přidá 1 ml sterilního peletového pufru (0,01 M fosfátový pufr, pH 7,2) a důkladně resuspenduje.

1.1.2. Homogenizace v sáčcích – vzorky nadzemních částí rostlin a hlíz

Z bramboru lze použít segmenty stonků rostlin, nebo celé rostlinky z *in vitro* kultur i výkrojky z hlíz. Segmenty se přednostně odebírají ze spodní část stonků po cca 0,5–1,0 cm a 1 g vzorku se doplní v poměru 1 : 1 až 1 : 2 extrakčním pufrem pH 7,0 (0,05 M fosfátový pufr) nebo přímo vzorkovým pufrem SEB, případně TRIS. Rostlinná pletiva s pufrem se pomocí paličky případně pomocí radiálního kuličkového homogenizátoru rozmacerují v extrakčním sáčku, přednostně s filtrační vložkou (Bioreba, 431000). Filtrát lze bezprostředně použít pro imunoenzymatické testy, nebo sedimentovat centrifugací 10 min./16 000 g a sediment resuspendovat ve vzorkovém nebo lyzačním pufru podle způsobu vlastní diagnózy.

1.2. IMUNOLOGICKÉ DIAGNOSTICKÉ METODY *Cms*

K základním metodám diagnózy *Cms* patří imunofluorescenční diagnóza (IF), která se u nás závazně používá též jako primární screeningová metoda při sériové kontrole vzorků hlíz v akreditovaných diagnostických laboratořích. Detailní popis postupu je uveden v příslušných protokolech těchto laboratoří. K metodám imunologickým přísluší též následující dvě metody, využívané převážně při laboratorní diagnóze virů, které však nacházejí uplatnění i při laboratorní diagnóze bakterií.

1.2.1. Diagnóza *Cms* postupem DAS-ELISA

Principiálně lze použít jak variantu DAS (dvojitý protilátkový sendvič), tak další modifikace, zejména ITAS (nepřímý trojitý protilátkový sendvič). Potřebné imunoreagencie, (buď jednotlivé, nebo v podobě diagnostických souprav, kitů), lze získat od více komerčních dodavatelů jako např. Loewe, Primiagnostics, Agdia. Kity prvních dvou dodavatelů jsme zkoušeli též ve vlastní práci a zde

uvádíme optimalizovaný postup pro jejich používání. Kit Loewe (07064) i kit Primediagnostics jsou určeny pro postup standardní DAS-ELISA a tvoří ji polyklonální protilátky Anti-*Cms*-IgG a jejich konjugáty s alkalickou fosfatázou (Anti-*Cms*-IgG-AP-conjugate). Doporučené ředění protilátek s potahovacím pufrům (coating p.) je 1 : 200 u kitu Loewe a 1 : 1000 u kitu Primediagnostics. Stejně je i ředění AP-konjugátů se standardním konjugátovým pufrům.

Standardní postup DAS-ELISA odpovídá principiálně původnímu postupu CLARK a ADAMS (1977) i úpravami podle našich dřívějších výsledků (DĚDIČ, 1988). Během prvního kroku je povrch důlků mikrotitračních paletek potažen roztokem specifických protilátek (IgG), na které je ve druhém kroku navázán antigen ze vzorků a tvoří se komplex protilátky-antigen. Tento komplex ve třetím kroku reaguje s protilátkami označenými enzymem (AP-konjugátem) a formuje se dvojitý protilátkový sendvič. Ve čtvrtém kroku alkalická fosfatáza (AP) reaguje se substrátem (4-nitrofenylfosfát) a vytváří žlutě zbarvený produkt (4-nitrofenol). Tyto barevné změny produktu lze hodnotit vizuálně nebo měřit spektrofotometricky při 405 nm (A405) za 1–2 hodiny inkubace.

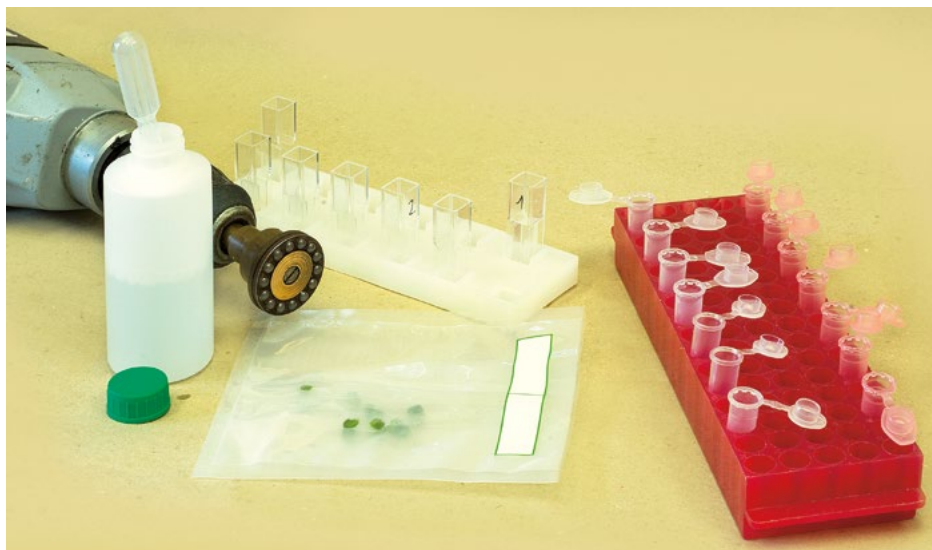
Doporučený optimalizovaný postup

Kroky	Ředění	Inkubace			Vymytí
		Objem	Doba	Teplota	
1. Aplikace IgG	1 : 200 / 1 : 1000 v potahovacím pufru	100 µl	4 h	34 °C	3 ×
2. Aplikace vzorků	1 : 1 až 1 : 4 v SEB, nebo TRIS vzorkovém pufru	100 µl	přes noc	4 °C	4 ×
3. Aplikace IgG-AP	1 : 200 / 1 : 1000 v SEB nebo TRIS konjugátovém pufru	100 µl	4 h	34 °C	5 ×
4. Enzymatická reakce	4-NPP, 1 : 1000 v substrátovém pufru	100 µl	1–2 h	34 °C	

Složení používaných pufrů	
1. Potahovací pufr	1,59 g Na ₂ CO ₃ , 2,94 g NaHCO ₃ , pH 9,6. Demineralizovaná voda 1000 ml
2. PBS	8,0 g NaCl, 0,20 g KCl, 0,20 g KH ₂ PO ₄ , 2,9 g Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O, pH 7,4. Demineralizovaná voda 1000 ml.
3. Vymývací pufr (PBS-T)	0,05 % Tween-20 v PBS
4a. Vzorkový/ konjugátový pufr (SEB)	2% PVP 20, 0,2% BSA nebo Egg ovalbumin v PBS-T.
4b. Vzorkový/ konjugátový pufr (TRIS)	2,4 g Tris base, 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, upraveno s HCl na pH 7,4 + 0,05 % Tween-20, 2% PVP 20, 0,2% BSA nebo Egg ovalbumin.
5. Substrátový pufr	97 ml diethanolamin, upraveno s HCl na pH 9,8 a doplnit na 1000 ml demineralizovanou vodou
6. Substrátový roztok	10 mg paranitrophenylphosphate (pNPP) v 10 ml substrátového pufru

Příprava vzorků (viz též část 1.1.):

Rostlinný materiál (stonky) nebo též výkrojky z hlíz se odeberou do plastových sáčků a homogenizují s extrakčním pufrém pH 7,0 (0,05 M fosfátový pufr) v poměru 1 : 1 až 1 : 2 pomocí paličky případně radiálního kuličkového homogenizátoru. Potřeby pro homogenizaci v sáčcích jsou uvedeny na obr. 1. Při použití extrakčních sáčků s filtrační vložkou lze extrakt přímo použít k diagnóze, případně sedimentovat 10 min./16 000g a sediment resuspendovat do požadovaného objemu. Pro vlastní diagnózu je možné použít buď neředěný extrakt a nebo ho dále ředit ve vzorkovém SEB nebo TRIS pufru v poměru 1 : 1 až 1 : 2. Pozitivní a negativní kontroly z kitu se doporučuje ředit vzorkovými pufrými dle návodu dodavatele.



Obr. 1: Vybavení pro homogenizaci v plastových sáčcích

Poznámky a doporučení:

Pro stanovení reakce pozadí zdravých rostlin se doporučuje do testů zařadit též čerstvé extrakty shodného druhu vedených za stejných podmínek jako zkoušený materiál. Práh positivity je ovlivněn řadou faktorů a je nezbytné jej stanovit experimentálně uživatelem. Obecně lze vzorek považovat za pozitivní, jestliže poměr absorbancí A405 vzorku a extraktu zdravých rostlin je vyšší nežli 3. Vzorky s okrajovými hodnotami musí být testovány opakovaně. Detaily výsledků vlastních optimalizačních pokusů uvádí tab. 1 a tab. 2.

Tab. 1: Optimalizace postupu DAS ELISA pro detekci *Cms* ze stonků rostlin bramboru. Absorbance (A405 × 1000) po 60 min. inkubace substrátu

Protílátky		Loewe			Primediagnostics		
č.	vzorek	1	2	3	1	2	3
1	Dominátor B 2495	106	474	90	491	2079	401
2	Borek A 2490	162	157	200	787	817	1099
3	Borek A 2491	220	182	550	1257	1255	2475
4	Rebel E 2401	2500	2500	2500	2500	2500	2500
5	Borek M13	68	67	60	139	139	111
6	Borek M12	71	74	73	229	178	192
7	Dominátor M13	74	75	81	185	172	145
8	Dominátor M12	65	61	60	118	135	144
9	K+ kit	1832	–	–	2500	–	–
10	K+ kit	1623	–	–	2500	–	–
11	K- kit	51	–	–	114	–	–
12	pufr	40	–	–	50	–	–

Protílátky Loewe a Primediagnostics, paleta GAMA, ředění extraktu homogenát ze stonků 1 : 1 w/v v TRIS. 1, 2, 3 – opakování. Loewe – limit 138 (10/12). Primediagnostics – limit 314 (12/12)

 pozitivní reakce

Tab. 2: Optimalizace postupu DAS ELISA pro detekci *Cms* ze stonků rostlin bramboru. Absorbance (A405 × 1000) po 60 min. inkubace substrátu

Palety		NUNC			GAMA		
č.	vzorek	a	b	c	a	b	c
1	Barbora 1316a	65	63	57	58	50	65
2	Barbora 1316b	1873	1557	666	688	642	244
3	Barbora 1316c	1164	778	310	434	299	115
4	Barbora 1316d	99	71	64	61	47	44
5	Barbora 1316e	76	57	65	58	42	47
6	Barbora M12a	55	60	65	51	39	38
7	Barbora M12b	54	71	56	60	52	60
8	Barbora M12c	51	86	60	53	49	50
9	Barbora M13a	48	72	55	56	41	44
10	Barbora M13b	72	68	62	50	41	40
11	K- Loewe	61	–	–	40	–	–
12	K+ Loewe	2500	–	–	896	–	–
13	K+ vlastní	2424	–	–	2435	–	–
14	pufr	48	–	–	34	–	–

Protílátky Loewe. Palety NUNC a GAMA, ředění extraktu a, b, c.

a – homogenát ze stonků 1 : 1 w/v v TRIS.

b – sediment homogenátu ředěný na ½ původního objemu.

c – sediment homogenátu ředěný na dvojnásobek původního objemu.

K – negativní kontrola z kitu; NUNC – poměr absorbcí N/Z min. 20!

K+ pozitivní kontrola z kitu; GAMA – poměr absorbcí N/Z min. 12!

 pozitivní reakce

1.2.2. Diagnostika *Cms* postupem Luminex xMAP

V posledních letech nacházejí stále větší uplatnění jak v mikrobiologii, tak humánní medicíně, imunologické postupy využívající specifické vazby protilátek na paramagnetické partikule s následnou laserovou kvantifikací a fluorometrickou detekcí (Technologie Luminex xMAP). První úspěšné výsledky s touto technologií při detekci třech virů a dvou bakterií u brambor publikovali BERGERVOET et al. (2008), předběžné údaje o multiplex diagnostice virů bramboru jsme též nedávno zveřejnili formou konferenčního příspěvku (DĚDIČ a BERGERVOET, 2011) a v publikaci DĚDIČ (2011).

Pro ověřování technologie Luminex xMAP (MIA) pro detekci *Cms* byl používán diagnostický kit firmy Primediagnosics (Holandsko). Kromě konjugátů protilátek s paramagnetickými partikulami (Bead address – *Cms* – 055) a konjugátů protilátek s biotinem jsou součástí kitu též fluorescenční reagentie (Streptavidin – PhycoErythrin), pozitivní kontroly a koncentráty potřebných chemikálií (tablety PBS, blokovací roztok).

Ve vlastní práci jsme extrakty z rostlin, získané postupem uvedeným v části 1.1. a ředěné 1 : 1 v/v až 1 : 2 ve fosfátovém a nebo TRIS vzorkovém pufru, nanášeli duplicitně na upravené palety pro ELISA s nízkou vazebnou kapacitou, palety byly inkubovány na třepačce za pokojové teploty a oproti ELISA byly při vymývání používány speciální magnetické podložky. Intenzita signálu byla měřena v kalibrovaném analyzáru AtheNA Luminex 200 (Biomedica) a vyjadřována jako medián intenzity fluorescence (MFI).

Doporučený optimalizovaný postup diagnostiky *Cms* pomocí Luminex xMAP s manuálním vymýváním palet.

- Nanesení roztoku paramagnetických partikulí (Beads) a protilátek ředěných 1 : 50 v BWB pufru do jamek mikrotitrační palety po 50 μ l /jamka.
- Přidání extraktů zkoušených vzorků ředěných 1 : 1 až 1 : 2 v/v ve fosfátovém (SEB), nebo TRIS pufru.
- Těsné uzavření palet a inkubace na třepačce (Biosan 600 ot/min.) za pokojové teploty, 20 min.
- Přenesení palety na magnetickou podložku, inkubace 1 min., slití a aplikace 100 μ l pufru WB; inkubace 30 sec, slití a aplikace 100 μ l pufru WB; inkubace 30 sec., slití a aplikace 100 μ l pufru WB; inkubace 30 sec., slití a sejmutí palety z magnetické podložky.

- Nanesení roztoku sekundárních, (biotinilovaných) protilátek ředěných 1 : 100 ve WB nebo TRIS pufru do jamek mikrotitrační palety po 100 μ l/jamka.
- Těsné uzavření palet a inkubace na třepačce (Biosan 600 ot/min.) za pokojové teploty, 30 min.
- Přenesení palety na magnetickou podložku, inkubace 1 min., slítí a aplikace 100 μ l pufru WB; inkubace 30 sec., slítí a sejmutí palety z magnetické podložky.
- Nanesení roztoku SA-PE (Streptavidin – PhycoErythrin), ředěného ve WB 1 : 1000 po 100 μ l/jamka.
- Těsné uzavření palet a inkubace na třepačce (Biosan 600 ot/min.) za pokojové teploty 15 min.
- Přenesení palety na magnetickou podložku, inkubace 1 min., slítí a aplikace 100 μ l pufru WB;
- Těsné uzavření palet a inkubace na třepačce (Biosan 600 ot/min.) za pokojové teploty 5 min.
- Vlastní analýza na přístroji AtheNA Luminex 200 analyzér.

Obr. 2:
Technické vybavení
pro Luminex xMAP



Příprava pufrů z dodaných koncentrátů, které jsou součástí kitu.

PBS-Tween – 10 \times :

Dodáváno v podobě tablet. Rozpustit v destilované vodě dle návodu.

BWB (Bead Working Buffer) – 2 \times :

1 ml PBS-Tween (10 \times) + 1 ml blokovácí látky + 3 ml destilované vody.


WB (Wash Buffer):

5 ml PBS-Tween (10 \times) + 2,5 ml blokovácí látky + 42,5 ml destilované vody.

Detailní porovnání výsledků diagnózy u postupů ELISA a technologie Luminex xMAP uvádí tab. 3. a 4.


Tab. 3: Porovnání detekce *Cms* pomocí testu IF, ELISA (Loewe) a Luminex xMAP

č.	vzorek	IF	ELISA	Luminex
1	754	+	2079	932
2	1714	+	2366	752
3	2131	+	2332	912
4	2333	+	2284	994
5	8438 Verne M13	-	59	70
6	8439 Westamyl M13	-	174	55
7	8440 David M13	-	94	54
8	8447 Monika M13	-	51	79
9	8448 Borek M13	-	68	132
10	8449 Dominátor M13	-	67	79
11	8443 Verne M14	-	n.t.	61
12	8445 Westamyl M14	-	n.t.	43
13	8444 David M14	-	n.t.	17
14	8443?Dominátor M14	-	n.t.	23
15	8442 Borek M14	-	n.t.	34
16	8441 Monika M14	-	n.t.	45
17	pufr	n.t.	44	4
18	pufr	n.t.	48	15

Vzorky hlíz po 50 ks, standardní postup extrakce a diagnózy IF. Shodné extrakty testovány postupem DAS ELISA (Loewe) a Luminex xMAP. ELISA - A405 (× 1000) za 60 min. po přidání substrátu: Hranice positivity (3 × Z = 256). Luminex - Median. Hranice positivity (3 × Z = 173).  pozitivní reakce

Tab. 4: Porovnání detekce *Cms* pomocí testu IF, ELISA (Primediagnostics) a Luminex xMAP

č.	vzorek	IF	ELISA	Luminex
1	8403-5 Borek SE2	-	185	75
2	8409-8 Borek SE2	+	2500	1864
3	8403-1 Davod SE2	-	183	117
4	8404-2 David SE2	-	206	94
5	8405-3 David SE2	-	199	89
6	8406-7 David SE2	-	209	85
7	8407-9 David SE2	-	285	114
8	8410-4 Westamyl SE2	-	169	85
9	8411-5 Westamyl SE2	-	195	62
10	8412-5 Westamyl SE2	-	200	70
11	5/9	-	199	96
12	7/9	-	305	120
13	14/3	-	162	88
14	8413	+	2500	1572
15	Kontrola (kit) -	n.t.	197	175
16	pufr	n.t.	168	72

Vzorky hlíz po 10-50 ks, standardní postup extrakce a diagnózy IF. Shodné extrakty testovány postupem DAS ELISA (Primediagnostics) a Luminex xMAP. ELISA - A405 (× 1000) za 60 min. po přidání substrátu: Hranice positivity (3 × Z = 624). Luminex - Median. Hranice positivity (3 × Z = 274).  pozitivní reakce

Závěr k imunologickým metodám diagnózy *Cms*.

- Extrakty z hlíz připravené standardním postupem i extrakty z rostlin připravené jejich homogenizací v sáčcích s filtrační vložkou, jsou přímo a v jejich dalším ředění 1 : 1-2 ve vzorkovém SEB nebo TRIS pufru, vhodné pro testy ELISA a Luminex xMAP.
- Protilátky obou zdrojů (Loewe a Primediaiagnostics) detekovaly *Cms* se stejnou účinností.
- Jak palety NUNC s vyšší absorpční kapacitou, tak standardní palety GAMA lze pro vlastní DAS ELISA plně akceptovat.
- Postupy DAS ELISA a Luminex xMAP se neliší z hlediska detektability *Cms*. Výhodou technologie Luminex xMAP je možnost souběžné duplex diagnózy další bakterie karanténního významu, a to *Ralstonia solanacearum*.

1.3. MOLEKULÁRNÍ DIAGNOSTICKÉ METODY

Aby se získala vysoce kvalitní DNA bez inhibitorů PCR reakce, lze bakteriální DNA z rostlin izolovat jak pomocí standardních metod, tak pomocí komerčních DNA izolačních a purifikačních kitů. Izolovanou DNA lze použít přímo pro vlastní testování. Pro izolaci DNA z rostlinných a hlízových vzorků bramboru lze zejména doporučit klasickou DNA izolační metodu podle PASTRIK (2000), a dále kity DNeasy Plant Mini Kit, (Qiagen, 69104) a dle vlastních pokusů též kit GenElute Plant Genomic DNA Kit, (Sigma), kterou uvádíme dále.

1.3.1. Postup izolace DNA z bramboru pomocí extrakční sady GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma). (Vlastní akomodace).

Z homogenátu rostlin připraveného podle postupu 1.1.2. (navážka 2 g pletiva bramboru, homogenizace v sáčku s 2 ml 0,05 M fosfátového pufru pomocí radiálního ložiskového homogenizátoru) pokračovat těmito kroky:

- a) Odebrat 1 ml přefiltrovaného homogenátu do 1,5 ml mikrozkušavky, centrifugovat při 16 000 g 10 min. (vytvoření pelety), vylít supernatant. (Kromě vlastního homogenátu lze použít extrakt připravený z hlíz při screeningové izolaci uvedený v části 1.1.1.).
- b) Do mikrozkušavky napipetovat k peletě 350 μ l Lysis Solution [part A], 50 μ l Lysis Solution [part B] a 4 μ l RNase (50 U), důkladně promíchat (vortex).
- c) Inkubovat mix při 75 °C 30 min., během inkubace rozvolnit peletu pomocí pipety a obracet mikrozkušavku.
- d) Přidat 130 μ l Precipitation Solution, promíchat převrácením mikrozkušavky, umístit na led po dobu 5 min.

- e) Centrifugovat 16 000 g 5 min. (vytvoření pelety zbytků buněk, proteinů a polysacharidů).
- f) Opatrně přelít supernatant do filtrační kolonky (GenElute filtration column, modrá, s 2 ml záchytnou zkumavkou).
- g) Centrifugovat 1 min. při max. otáčkách (16 000 g).
- h) Vyhodit filtrační kolonku a k filtrátu přidat 700 μ l Binding Solution a promíchat otáčením mikrozukavky.
- i) Připravit Binding Column – vložit GenElute Miniprep Binding Column (s červeným kroužkem) do mikrozukavky (pokud již není sestavené), přidat 500 μ l Column Preparation Solution do každé kolonky, centrifugovat 12 000 g 1 min., vylít filtrát.
- j) Opatrně přelít (přepipatovat) mix z kroku i) a centrifugovat při max. otáčkách (16 000 g) 1 min., vylít filtrát.
- k) Přelít zbytek mixu z kroku i) a opakovat centrifugaci, vylít filtrát.
- l) Přidat 500 μ l Wash Solution (pozor – přidat požadované množství etanolu do pufru!) na kolonku, centrifugovat při max. otáčkách (16 000 g) 1 min., vylít filtrát.
- m) Přidat dalších 500 μ l Wash Solution na kolonku a centrifugovat při max. otáčkách 3 min. (vysušení kolonky), filtrát se nesmí dostat na kolonku! (setřít filtrát, který se drží vně kolony).
- n) Přenést kolonku s membránou do nové 2,0 ml mikrozukavky, opatrně přidat 100 μ l přehřátého (65 °C) elučního pufru (Elution Solution) přímo na střed membrány a centrifugovat při max. otáčkách (16 000 g) 1 min., vyhodit membránu (*eluze DNA*).
- o) Po extrakci DNA je nezbytné stanovení její kvality a kvantity pomocí spektrofotometru. Čistota DNA se hodnotí na základě stanovení poměru absorbance při 260 a 280 nm (čistá DNA má A_{260}/A_{280} 1,7–1,9).
- p) Zamrazit vzorky DNA (při -20 °C, pro dlouhodobé uchování při -80 °C).

Technické vybavení pro extrakci a izolaci DNA z bramboru a pro její uchování:

- Laboratorní váhy – na navážky vzorků (Mettler AE 160).
- Homogenizační sáček (Bioreba, 431000).
- Skalpel, pinzety (odběr vzorků).
- Ložiskový homogenizátor.
- Termoblok (Major Science, MD-01).
- Centrifuga s otáčkami \geq 16 000 g, s rotorem na plastové mikrozukavky o objemu 2,0 ml (Hettich Zentrifugen EBA 12R).

- Vortex (Techno Kartell TK3S).
- Pipety (2–20 µl, 20–200 µl a 100–1 000 µl) a kompatibilní sterilní RNase-free špičky.
- Plastové mikrozkušavky 1,5 ml, 2,0 ml (Eppendorf).
- Spektrofotometr (NanoDrop 2000c nebo Perkin Elmer MBA 2000).
- Mrazicí box (–20 °C).
- Hlubokomrazicí box (–80 °C) – pro dlouhodobé skladování vzorků.

Chemikálie potřebné pro izolaci DNA z bramboru:

- Fosfátový pufr – PB (0,05 M, pH 7,0, 1 litr): 4,26 g Na₂HPO₄, 2,22 g KH₂PO₄.
- Extrakční kit GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, G2N70).
- RNase A Solution (Sigma-Aldrich, R6148-25ML nebo R4642).
- Etanol (96–100%), analytical grade (Sigma Aldrich, E7023, E7148 nebo 459836) – do pufrů.
- Technický etanol (70%) – sterilizace.

Pozn.: Stejným postupem jako je uvedeno pro izolaci DNA z extraktů rostlin bramboru lze pracovat též s extrakty připravenými standardními postupy z výkrojků hlíz.

1.3.2. Konvenční PCR s vizualizací produktu na agarózovém gelu

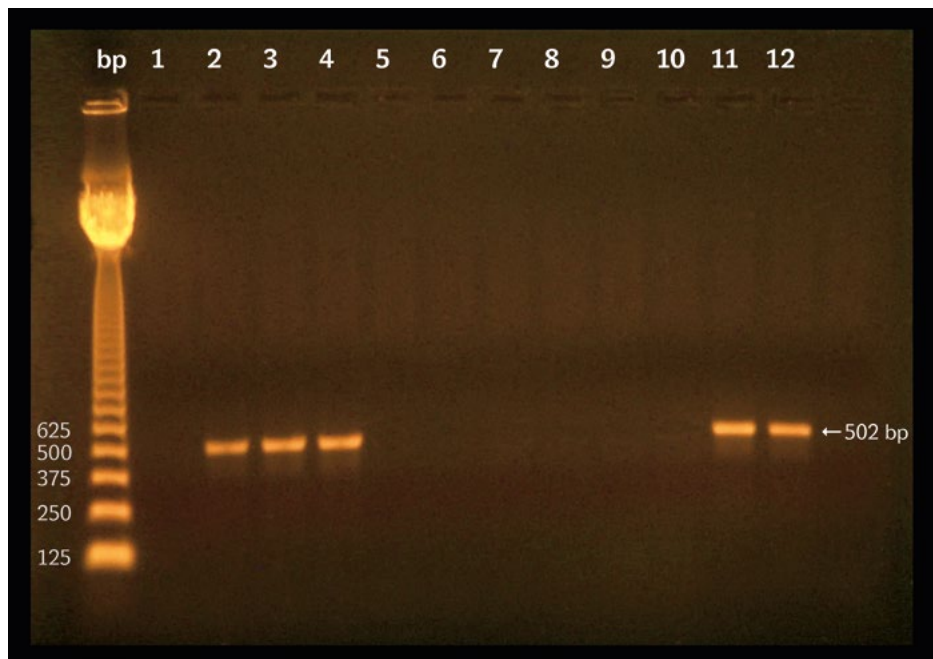
Ve vlastní práci jsme ověřovali reaktivitu kompletního reakčního kitu PCR na *Cms*, který je od roku 2015 v komerční nabídce fy Loewe, 08064/100.

Součástí dodávky jsou:

- Premix (Primer set, dNTPs, BSA)
- Pozitivní kontrola (DNA z bakteriálního izolátu)
- Negativní kontrola (DNA ze zdravých hlíz bramboru)
- Reakční pufr PCR (5×) (včetně MgCl₂)
- Voda (kvalita pro PCR)
- DNA – Polymeráza (Solis BioDyne)

Primery jsou specifické pro část intergenního spaceru 16S–23S rRNA *Cms*. (PASTRIK, 2000) a na agarosovém gelu jsou u pozitivních vzorků pozorovány fragmenty 502 bp.

Pro vlastní práci musí být k dispozici PCR termocykler, aparatura pro elektroforézu na agaru, mikrocentrifuga, reakční mikrozkušavky pro PCR, mikropipety a špičky s filtry.



Obr. 3: U pozitivních vzorků *Cms* musí být viditelný fragment 502 bp

VLASTNÍ POSTUP

Příprava Mastermixu PCR	
Voda (kvalita pro PCR)	13,8 µl
5× reakční pufr	5,0 µl
Premix	5,0 µl
DNA-Polymeráza	0,2 µl

K alikvótám 24 µl Mastermixu v reakčních mikrozkuvkách se přidává 1 µl vzorku DNA. Stejně po 1 µl se přidává do Mastermixu pozitivní a negativní kontrola z kitu.

Program PCR (PTC-100, MJ Research)			
Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Iniciální denaturace	95 °C	15 min.	1
Denaturace	95 °C	5 sec	31
Annealing	60 °C	10 sec	
Elongace	72 °C	30 sec	
Závěrečná elongace	72 °C	1 min.	1
Zchlazení	4–8 °C		

Elektroforéza

- 1–1,5% standardní agarózový gel, 5–7 mm tlustý, 1× TAE pufr (Serva 42553)
- Aplikace 5–10 µl produktu spolu s bromfenol blue nanášecím pufrém do dvůrků agarózového gelu
- Elektroforéza, 10–15 V/cm dráhy
- Ukončení elektroforézy po dosažení potřebné vzdálenosti markéru (obvykle 30–60 min. při 100 V)
- Vizualizace gelu v UV světle

Nejsou detekovány křížové reakce s: *Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis*, *Ervinia carotovora ssp. carotovora* a *ssp. atroseptica*, *Dickeya chrysanthemi*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescence*.

1.3.3. Real-time PCR (qPCR)

1.3.3.1. Protokol diagnostiky *Cms* metodou TaqMan qPCR (TaqMan Real-Time PCR). Modifikace postupu dle GUDMESTAD et al. (2009)

Postup izolace DNA z bramboru pomocí extrakční sady GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit – dtto 1.3.1.

Technické vybavení potřebné pro TaqMan qPCR

- Termocykler (Mx3005P qPCR System – Agilent Technologies).
- PC – řídicí jednotka termocykleru (součástí termocykleru).
- Software na vyhodnocení PCR reakcí (součástí termocykleru).
- Laminární RNA/DNA box (Captair Biocap RNA/DNA nebo Köttermann 8580).
- Minicentrifuga (Biosan Multi-Spin MSC-6000).
- Vortex (Techno Kartell TK3S).
- Centrifuga (na destičky) – není nezbytná (zkvalitnění práce).
- Plastové RNase-free mikrozkušavky 1,5 ml (Eppendorf) – příprava směsi.
- Pipety – 0,2–2,0 µl, 2–20 µl, 20–200 µl a 100–1000 µl (Finnpipette), kompatibilní sterilní RNase-free špičky (nejlépe s filtrem – zabránění kontaminaci).
- Autokláv – sterilizace špiček, pipet, mikrozkušavek (Stolní laboratorní autokláv OT 032).
- Chladicí podložka nebo polyesterová nádoba na led.
- PCR destičky – 96 jamek (Bio-Rad).



Obr. 4:
Technické
vybavení
pro qPCR

Chemikálie potřebné pro TaqMan qPCR

- Druhově specifické primery a TaqMan sonda (syntéza firmou Generi Biotech, s.r.o. podle sekvencí popsanych v uvedené publikaci) – tabulka.
- FastStart Universal Probe Master (ROX) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany, 04913949001).
- DNase/RNase Free dH₂O (Sigma-Aldrich, W4502).

Sekvence použitých primerů a sondy

Název primeru	Sekvence primeru, sondy (5' -3')	Poznámka
CeIA-F	TCTCTCAGTCATTGTAAGATGAT	GUDMESTAD et al., 2009
CeIA-R	ATTTCGACCGCTCTCAA	
CeIA probe	[HEX] TTCGGGCTTCAGGAGTGCCTGT [BHQ1] HEX (hexachlorofluorescein) – reporter BHQ1 – quencher	

VLASTNÍ POSTUP TaqMan qPCR reakce

Složení a objemy reakční směsi – na jednu reakci (25 µl)	
2× FastStart Universal Probe Master (ROX)	10,0 µl (finál. conc. 0,8×)
PCR Forward Primer (10 µM)	1,9 µl (finál. conc. 760 nM)
PCR Reverse Primer (10 µM)	1,9 µl (finál. conc. 760 nM)
TaqMan Probe (10 µM)	0,4 µl (finál. conc. 160 nM)
RNase Free dH ₂ O	8,8 µl
DNA (5–10 ng/µl, ředěno 10×)*	2,0 µl

*DNA analyzovaných vzorků se upraví na stejnou koncentraci. Do reakcí se DNA z analyzovaných vzorků naředí 1 : 10 (pro vyšší účinnost reakce).

Nastavení pozice vzorků, popis vzorků a nastavení protokolu podmínek reakcí

- Reakce se provede v termocykleru Mx3005P qPCR System. Nastavení pozice vzorků v jednotlivých jamkách PCR-destičky, popis vzorků a nastavení protokolu podmínek reakcí se provede v příslušném softwaru, který je součástí termocykleru. Při použití jiného typu termocykleru se může vzhled a používání software lišit.

Reakční podmínky	
1×	95 °C, 5 min. (denaturace DNA)
10×	94 °C, 45 s (denaturace DNA)
	60 °C, 60 s (<i>annealing</i> primerů)
	72 °C, 15 s (syntéza nového řetězce DNA)
40×	92 °C, 45 s (denaturace DNA)
	60 °C, 40 s (<i>annealing</i> primerů)
	72 °C, 20 s (syntéza nového řetězce DNA)

Vyhodnocení TaqMan qPCR reakce

Na základě hodnot Ct (Threshold cycles) sledovaných vzorků, pozitivní kontroly (standardu) a negativní kontroly se vyhodnotí TaqMan qPCR reakce. Stanoví se, zda je testovaný vzorek rostliny bramboru negativní nebo pozitivní na *Cms*.

Tab. 5: Příklad detekce *Cms* pomocí PCR ve vzorcích extraktů z hlíz bramboru a reakce kontrol. (Primery dle GUDMESTAD et al., 2009)

Vzorek	Ct	
2401	12,6	+
1404333	12,1	+
VK CMS 4/8/14	13,8	+
K+ (Mráz)	9,8	+
K- (PA Zuzá)	27,2	-
NTC (premix)	-	-

1.3.3.2. Protokol diagnostiky *Cms* metodou TaqMan qPCR s využitím housekeeping genu. Modifikace postupu dle MASSART et al. (2014)

Postup izolace DNA z bramboru pomocí extrakční sady GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit – dtto 1.3.1.

Chemikálie potřebné pro TaqMan qPCR

- Druhově specifické primery a TaqMan sonda (syntéza firmou Generi Biotech, s.r.o. podle sekvencí popsanych v uvedené publikaci) – tabulka,
- FastStart Universal Probe Master (ROX) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany, 04913949001),
- DNase/RNase Free dH₂O (Sigma-Aldrich, W4502).

Sekvence použitých primerů a sondy

Název primeru	Sekvence primeru, sondy (5' -3')	Poznámka
MultiClav-F	TGGTTTCTGTGCGGACCCTTT	<i>Cms</i> MASSART et al., 2014
MultiClav-R	CGTCCACTGTGTAGTTCTCAATATACG	
MultiClav-P	[FAM] CGTCGTCCTTGAGTGG [MGBNFQ]	
MultiPot-F	GGTTTCGTAATGTTCCCTACCAA	housekeeping gen MASSART et al., 2014
MultiPot-R	AAAGGTATTTATCCAGCAGTAGATCCTT	
MultiPot-P	[VIC] CATGGTTGACGTTGAAT [MGBNFQ]	

Legenda: FAM – 6-carboxyfluorescein – reporter

VIC – 4,7,2'-trichloro-7'-phenyl-6-carboxyfluorescein) – reporter

MGBNFQ – Minor Groove Binder Nonfluorescent Quencher

VLASTNÍ POSTUP TaqMan qPCR reakce

Složení a objemy reakční směsi – na jednu reakci (25 µl)	
2× FastStart Universal Probe Master (ROX)	12,5 µl (finál. conc. 1 ×)
PCR Forward Primer (10 µM)	1,5 µl (finál. conc. 600 nM)
PCR Reverse Primer (10 µM)	1,5 µl (finál. conc. 600 nM)
TaqMan Probe (10 µM)	0,5 µl (finál. conc. 200 nM)
RNase Free dH ₂ O	6,0 µl
DNA (5–10 ng/µl, ředěno 10×)*	3,0 µl

*DNA analyzovaných vzorků se upraví na stejnou koncentraci. Do reakcí se DNA z analyzovaných vzorků naředí 1 : 10 (pro vyšší účinnost reakce).

Nastavení pozice vzorků, popis vzorků a nastavení protokolu podmínek reakcí

- Stejně jako u postupu 1.3.3.1.

Reakční podmínky	
1×	95 °C, 15 min. (denaturace DNA)
40×	95 °C, 25 s (denaturace DNA)
	60 °C, 60 s (<i>annealing</i> primerů)
	72 °C, 20 s (syntéza nového řetězce DNA)

Vyhodnocení TaqMan qPCR reakce

Na základě hodnot Ct (Threshold cycle) sledovaných vzorků, pozitivní kontroly (standardu) a negativní kontroly se vyhodnotí TaqMan qPCR reakce. Stanoví se, zda je testovaný vzorek rostliny bramboru negativní nebo pozitivní na *Cms*. Housekeeping gen slouží jako vnitřní kontrola. Veškeré hodnoty Ct nižší než 35 jsou považovány za pozitivní. Příklad detekce *Cms* pomocí qPCR ve vzorcích extraktů z hlíz bramboru uvádí tab. 6, vzájemné porovnání výsledků detekce *Cms* pomocí testu IF, ELISA, Luminex xMAP, PCR a qPCR shrnuje tab. 7. Na obr. 5 a 6 jsou uvedeny příklady průběhů hodnot fluorescence u pozitivních a negativních vzorků při qPCR se sondou TaqMan.

Závěr k molekulárním metodám diagnózy *Cms*.

- Pro spolehlivé použití extraktů z hlíz i rostlin je nutné zařadit lysi koncentráty (sedimentu) a následně provést izolaci a purifikaci DNA např. pomocí izolačního kitu.
- Konvenční PCR pomocí komerční soupravy Loewe je snadno adaptovatelná pro laboratorní detekci *Cms* (stejně jako ELISA) a odpovídá standardnímu, akceptovanému postupu dle PASTRIK (2000).
- Postupy qPCR se specifickými sondami systému TaqMan umožnily nejen velmi citlivou detekci *Cms* (v našich pokusech i v extraktech ředěných více než 1000×), ale též v duplexu s housekeeping genem zaručují kontrolu kvality extrahované DNA.
- Molekulární metody lze tak plně doporučit zvláště ke kontrole výsledků I. screeningových testů.

Tab. 6: Příklad detekce *Cms* pomocí qPCR ve vzorcích extraktů z hlíz bramboru a reakce kontrol. (Primery dle MASSART et al., 2014)

Vzorek	Ct (<i>Cms</i>)		Ct (housekeeping)	
2401	23,9	+	18,2	+
1404	22,2	+	28,0	+
8413	19,6	+	18,6	+
K- (PA Madona)	37,2	-	16,3	+
K- (PA Poutník)	37,1	-	17,9	+
NTC (premix)		-		-

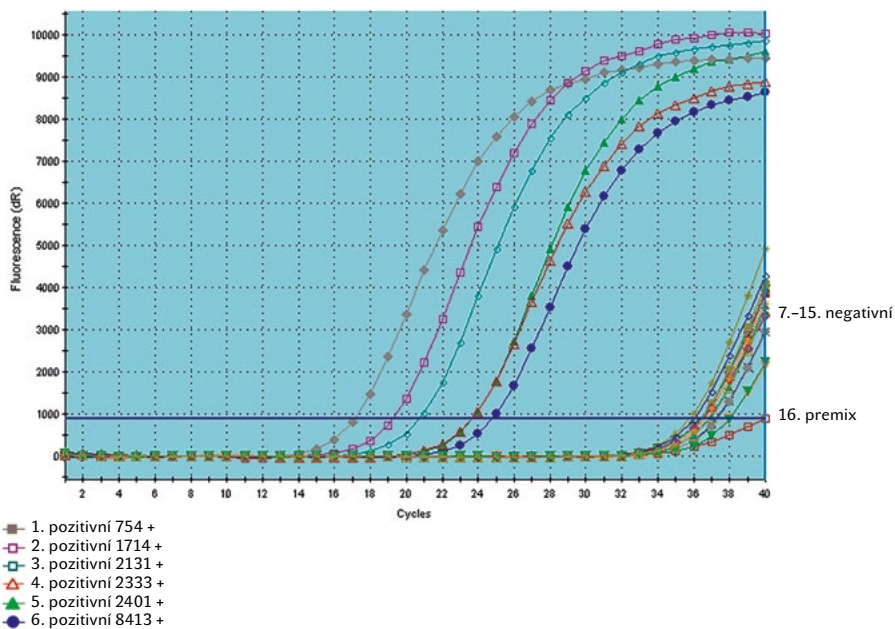
Tab. 7: Porovnání výsledků detekce *Cms* pomocí testu IF, ELISA (Loewe), Luminex xMAP, PCR a qPCR

č.	vzorek	IF	ELISA	Luminex	PCR	qPCR
1	754	+	2079	932	+	24,8
2	1714	+	2366	752	+	17,1
3	2131	+	2332	912	+	19,2
4	2333	+	2284	994	+	23,6
5	8438 Verne M13	-	59	70	-	36
6	8439 Westamyl M13	-	174	55	-	36
7	8440 David M13	-	94	54	-	36
8	8447 Monika M13	-	51	79	-	38
9	8448 Borek M13	-	68	132	-	38
10	8449 Dominátor M13	-	67	79	-	38
11	pufr	n.t.	44	4	n.t.	
12	pufr	n.t.	48	15	n.t.	

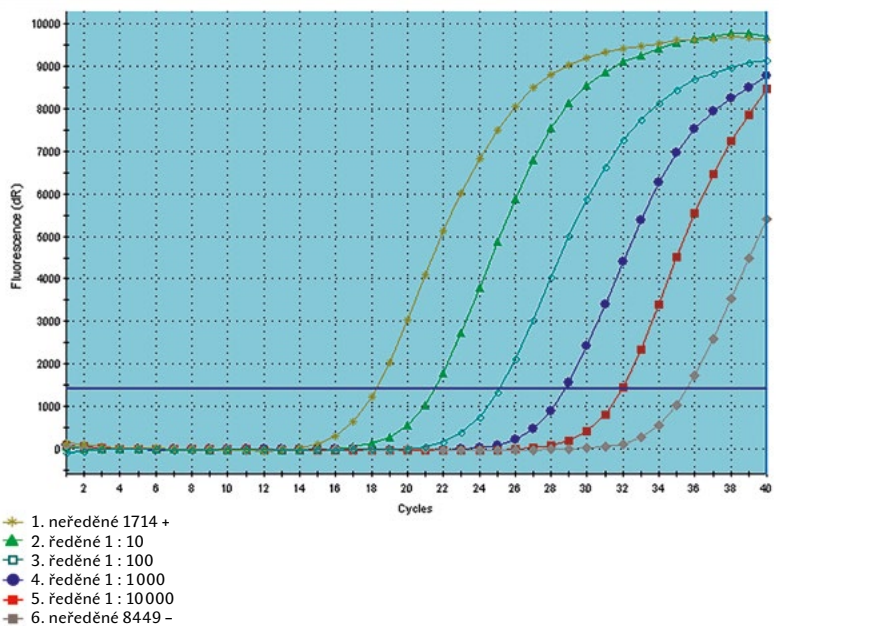
pozitivní reakce

Vzorky hlíz po 50ks, standardní postup extrakce a diagnózy IF.
Shodné extrakty testovány postupem DAS ELISA (Loewe) a Luminex xMAP, PCR (Loewe) a qPCR (MASSART).
ELISA – A405 (× 1000) za 60 min po přidání substrátu: Hranice pozitivity (3 × Z = 256)
Luminex – Median. Hranice pozitivity (3 × Z = 173)
PCR (Loewe):
Fragmenty DNA 502 bp
qPCR: Hranice pozitivity do Ct 30.

Obr. 5: Detekce *Cms* pomocí qPCR se sondouTaqMan



Obr. 6: Detekce *Cms* pomocí qPCR se sondouTaqMan – ředěné vzorky



III. NOVOST A ZDŮVODNĚNÍ POSTUPŮ

Laboratorní diagnóza dvou bakterií karanténního významu – *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) i *Ralstonia solanacearum* je u nás prováděna obligatorně u sadbových materiálů bramboru v procesu certifikace sadby a namátkově též u materiálů běžného pěstování. Pro vlastní kontrolu jsou připravovány extrakty z kompozitních vzorků hlíz, které jsou následně diagnostikovány pomocí standardních testů I. screeningu tj. IF, případně FISH a „pozitivní“ výsledky jsou následně ověřovány pomocí konvenční PCR (akomodace postupu dle PASTRIK, 2000) a testy patogenity s případnou identifikací patogenu sekvenací jeho DNA.

Postupy a metody uvedené v této práci nejsou u nás zatím běžně využívány jak v oficiální kontrole, tak v doplňkových nebo předběžných testech jak ve šlechtění nebo množení sadby.

IV. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Práce uvádí formou podrobných laboratorních manuálů přehled alternativních postupů a diagnostických metod *Cms*. Jejich uplatnění lze spatřovat zejména v následujících směrech:

- 1) Použití plastových sáčků pro homogenizace pletiva (z rostlin i hlíz) představuje plně srovnatelný postup pro získání extraktů. Lze jej využít pro vlastní diagnózu bakteriálních infekcí, stejně jak bylo prokázáno při testování virů (DĚDIČ, 2012). V porovnání se standardním postupem homogenizace (diferenciální odstředění homogenátů získaných pomocí speciálních přístrojů), nebo též zdlouhavým elučním postupem, je navrhovaný postup jednodušší, levnější i rychlejší a s menším nebezpečím výskytu nežádoucích kontaminací, případně technických chyb.
- 2) Pro vlastní diagnózu *Cms* lze plně využít zejména metodu DAS ELISA, která poskytuje výsledky z hlediska citlivosti a specifčnosti srovnatelné se standardním IF testem. Oproti IF je ELISA též levnější variantou diagnózy, vhodná pro potřebné navýšení počtu testovaných vzorků při plošné kontrole. Kromě nižších nároků metody ELISA na nutné technické vybavení je její neopominutelnou výhodou též náhrada, do značné míry subjektivního vizuálního hodnocení mikroskopických preparátů, objektivním spektrofotometrickým měřením absorbancí.
- 3) Molekulární diagnostické metody jsou především z ekonomických důvodů směřovány převážně pro confirmaci výsledků získaných při plošném moni-

toringu metodami imunologickými. Komerční kit pro PCR je zatím nejlevnější variantou z těchto metod, navíc přinášející nezbytnou standardizaci i do obecně akceptovaného postupu.

Metody qPCR jsou v současnosti nejperspektivnější, a to jak z hlediska jejich citlivosti a specifčnosti detekce, tak jsou zárukou lepší eliminace nežádoucích technických chyb. Pro zachování těchto předností se u molekulárních diagnostických metod jeví jako nezbytné izolovat purifikovanou DNA, a tím se zatím celý postup komplikuje a prodražuje. Současně však existuje možnost výhodné aplikace systému multiplex (včetně nezbytné indikace kvality purifikace DNA) a využití vysoké citlivosti detekce pro hodnocení rozsáhlejších směsných vzorků. S ohledem na tyto přednosti lze, zejména v kontrolní praxi, předpokládat širší uplatnění molekulárních diagnostických metod jako je qPCR.

Souhrnně lze konstatovat, že alternativní imunologické testy *Cms*, zejména ELISA, mají potenciální předpoklad sériového využití jak pro předběžnou i detailní kontrolu materiálů u šlechtitelských i množitelských organizací, tak v oficiální kontrole v rámci certifikace sadby i u nesadbových materiálů, kde mohou doplnit standardní IF, případně FISH-testy I. screeningu.

Konvenční PCR s elektroforetickou detekcí, využívající komerční kit, může přispět k unifikaci ověřování výsledků testů I. screeningu, prováděných na pověřených pracovištích. Stejně jako konvenční PCR lze pro ověřování výsledků testů I. screeningu použít metody qPCR, navíc v této práci deklarovaná jejich vysoká citlivost, včetně kontroly kvality izolované DNA, představuje kvalitativně vyšší úroveň diagnózy oproti dosavadní praxi. Postupy qPCR pro tyto účely dosud u nás použity nebyly.

V. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Metodika předložená ve formě podrobných a ověřených laboratorních manuálů souboru více exaktních, dosud u nás sériově nevyužívaných metod a postupů, je směřována k většímu rozšíření testů a zvýšení spolehlivosti diagnózy závažného onemocnění bramboru způsobeného bakterií *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*). Každoroční výdaje související s přiznanými náhradami dotčených subjektů a hrazenými ze státního rozpočtu dosahují řádově několika miliónů Kč.

Na přetrvávání výskytu a z toho vyplývajících potíží se významnou měrou podílí jak malý rozsah kontrolovaných materiálů, tak nízká účinnost a spolehlivost používaných diagnostických metod. Uváděné alternativní metody a postupy jsou proto navrhovány k využití jak pro první plošný diagnostický screening

(přednostně metody imunologické), tak dále pro confirmaci (potvrzení) nálezů a podezření z těchto prvních screeningových testů (molekulární metody).

Ekonomický propočet vychází ze stávajících postupů a doporučení pro plošnou detekci a diagnózu karanténních bakterióz u brambor specifikované vyhláškou Ministerstva zemědělství ČR č. 331/2004 Sb., o opatřeních k zabezpečení ochrany proti zavlékání a šíření původce bakteriální kroužkovitosti bramboru a původce bakteriální hnědé hniloby, ve znění vyhlášky č. 328/2008 Sb.

Uváděné diagnostické metody lze principiálně rozdělit do dvou skupin, a to metody imunologické (IF, ELISA, Luminex) a molekulární (PCR a qPCR). V rámci skupin se postupy liší především v požadavcích na reagentie a jejich cena je tak rozhodující z hlediska porovnávání nákladů. Jako standardní metoda je sériově používána IF, u které kvalifikovaný odhad ceny imunoreagencií činí cca 10 Kč/analýza, tj. cca 500 Kč na jeden vzorek (100 jedinců). Ve stejné cenové relaci se pohybují též náklady na imunoreagentie u postupu Luminex. Oproti tomu pro postup ELISA činí cena imunoreagencií cca 5 Kč/analýza, tj. 250 Kč na testování jednoho vzorku (100 jedinců). Speciální přístrojové vybavení pro jednotlivé imunologické postupy navíc zahrnují náklady na pořízení speciálního mikroskopu pro IF a přístroje pro Luminex, které jsou přibližně ve stejné cenové úrovni, zatímco spec. spektrofotometr pro ELISA nepřesahuje 50 % jejich ceny.

V rámci molekulárních diagnostických metod je nezbytné pro zachování specifity i citlivosti testů zařadit navíc, u extraktů dostačujících pro imunologické testy, izolaci DNA. Při používání izolačních kitů zaručujících standardní purifikaci genomové DNA se náklady na jednu izolaci pohybují v ceně 50–80 Kč. Vlastní jedna diagnóza konvenční PCR činí dalších cca 60 Kč, tj. srovnatelný náklad na diagnózu jednoho kompozitního vzorku činí 1 100–1 500 Kč. Srovnatelné náklady na qPCR jednoho vzorku jsou ještě poněkud vyšší a činí 1 300–1 600 Kč. Rovněž pro molekulární diagnózu je nezbytné pořízení speciálního přístrojového vybavení, jako je termocycler a EF aparatura pro PCR a aparatura na Real-time PCR pro qPCR.

Relativní nákladnost jednotlivých metod lze shrnout do následující tabulky.

Ukazatel	IF	ELISA	Luminex	PCR	qPCR
Extrakce	nízká	nízká	nízká	nízká	nízká
Izolace DNA	0	0	0	vysoká	vysoká
Reagentie	střední	nízká	střední	vysoká	vysoká
Investice	střední	nízká	střední	střední	vysoká
Pracnost	nízká	nízká	nízká	střední	střední
Citlivost	střední	střední	střední	vysoká	vysoká

VI. SOUHRN

Práce přináší podrobný popis čtyř metod laboratorní diagnózy *Cms*, které doplňují stávající postupy a metody doporučené pro screeningovou kontrolu tohoto patogenu. Jsou zahrnuty postupy extrakce jak z hlíz, tak rostlin bramboru a izolace DNA pomocí preparačních kolonek. Z vlastních diagnostických metod jsou detailně uvedeny optimalizované postupy pro DAS ELISA se dvěma původními protilátky a postup detekce pomocí technologie Luminex xMAP. Z molekulárních metod jsou detailně popsány postupy práce s komerční soupravou pro konvenční PCR a dva postupy qPCR. Spolehlivost detekce pomocí všech postupů jednotlivě a při jejich srovnání je demonstrována na záznamech výsledků u souboru zdravých a infikovaných vzorků, souběžně diagnostikovaných standardní imunofluorescenční (IF) metodou. Nejvyšší citlivost (řádově až do ředění extraktů 10^3) byla prokázána u metody qPCR, doplněné kontrolou kvality izolované DNA interním markerem. Doporučujeme výběrové využití metod jak pro doplnění oficiální screeningové kontroly sadbových materiálů, tak pro diagnostické laboratoře šlechtitelských a množitelských organizací disponující nezbytným vybavením.

VII. Seznam použité související literatury

- Anonymous (1993): Council Directive 93/85/EEC on the control of potato ring rot.
- Anonymous (2004): Zákon č. 326/2004 Sb., o rostlinolékařské péči a o změně některých souvisejících zákonů.
- Anonymous (2006): Commission Directive 2006/56/EC amending the Annexes to Council Directive 93/85/EEC on the control of potato ring rot.
- Anonymous. (2006): *Cms*. EPPO Bulletin 36, September.
- BERGERVOET, J.H.W. – PETERS, J. – VAN BECKHOVEN, J.R.C.M. – VAN DEN BOVENKAMP, G.W. – JACOBSON, J.W. – VAN DER WOLF, J.M. (2008): Multiplex microsphere immuno-detection of potato virus Y, X and PLRV. *J. Virol. Methods*, 149: 63–68.
- CLARK, M.F. – ADAMS, A.N. (1977): Characteristic of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 34: 475–483.
- DĚDIČ, P. (1988) : Diagnóza virů bramboru metodou ELISA v dužině sekundárně infikovaných hlíz a v klíčcích. *Vědecké práce Oseva, VŠÚB Havlíčkův Brod*, 11: 83–95.
- DĚDIČ, P. – BERGERVOET, J.H.W. (2011): Multiplex detection of potato viruses with Luminex map technology. Abstracts, 18th Triennial Conf. EAPR, Oulu, Finland, p.163.
- DĚDIČ, P. (2011): Nové racionální postupy laboratorní diagnózy virů bramboru – Multiplex ELISA a Luminex-xMAP. *Vědecké práce – Výzkumný ústav bramborařský Havlíčkův Brod*, 19: 53–62.
- DĚDIČ, P. (2012): Sporné případy diagnózy viróz v poli a příspěvek k jejich řešení. *Bramborářství* (4) XX: 18–19.
- GUDMESTAD, N. C. – MALLIK, I. – PASCHE, J. S. – ANDERSON, N. R. – KINZER, K. (2009): A real-time PCR assay for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* based on the cellulase A gene sequence. *Plant Dis.*, 93: 649–659.
- KRAJÍČKOVÁ, J. (2013): Volný dokument VdÍ, VD 10. Řízený výpis z PP3, Laboratorní centrum VÚB Havlíčkův Brod.

- LE ROUX, A.C. (2014): European Phytosanitary measures to prevent the introduction and the spread of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis sepedonicus*.
- MASSART, S. – NAGY, C. – JIJAKLI, M. H. (2014): Development of the simultaneous detection of *Ralstonia solanacearum* race 3 and *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by a multiplex real-time PCR assay. *European Journal of Plant Pathology*, 138: 29–37.
- PÁNKOVÁ, I. – KREJZAR, V. – HORÁČKOVÁ, V. (2015). Detekce původce bakteriální kroužkovitosti v procesu šlechtění. *Úroda* 63(5): 92–95.
- PASTRIK, K.H. (2000): Detection of *Cms* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. *European Journal of Plant Pathology*, 106: 155–165.

VIII. Seznam vybraných publikací autorů, které předcházely metodice

- DĚDIČ, P. – NAVRÁTIL, M. – CIKÁNEK, D. (1992): Utilization of MABs for the detection of potato viruses in Czechoslovakia. *Proceedings Virol.sect.EAPR, Vitoria-Spain, June-July 1992*, 31–35.
- DĚDIČ, P. – PTÁČEK, J. (1995): Imunoenzymatická diagnóza viru Y bramboru [PVY] v potomstvu primárně infikovaných rostlin. *Rostlinná Výroba*, 41: 157–161.
- DĚDIČ, P. (1995): Spolehlivost detekce M viru bramboru (PVM) v potomstvu primárně infikovaných rostlin bramboru. *Ochrana rostlin*, 31: 277–285.
- ŠÍP, M. – BYSTRČICKÁ, D. – KMOCH, S. – NOSKOVÁ, L. – HARTMANNOVÁ, H. – DĚDIČ, P. (2010): Detection of viral infections by means of an oligonucleotide microarray. *J. Virological Methods*, 165: 64–70.
- DĚDIČ, P. – BERGERVOET, J.H.W. (2011): Multiplex detection of potato viruses with Luminex xMAP technology. *Abstracts the 18th Triennial Conf. EAPR, 24.–29. 7. 2011, Oulu, Finland*, p.163.
- DĚDIČ, P. (2011): Nové racionální postupy laboratorní diagnózy virů bramboru – Multiplex ELISA a Luminex-xMAP. *Vědecké práce – Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod*, 19: 53–62.
- DĚDIČ, P. (2013): Utilization of Luminex xMAP technology for multiplex diagnosis of six main potato viruses. *15th Triennial Meeting of the Virology Section of the EAPR, 28–1 May 2013, Antalya – Turkey. Abstracts p. 23. ppt. Presentation.*
- KMOCH, M. – HOLKOVÁ, L. – POKORNÝ, R. (2012): Hodnocení infekce obilnin patogeny rodu *Fusarium* pomocí kvantitativní PCR. *Úroda*, 60 (9): 99–103. ISSN 0139-6013.
- KMOCH, M. – HOLKOVÁ, L. – ŠAFRÁNKOVÁ, I. – CERKAL, R. – KRÉDL, Z. – HRUDOVÁ, E. – POKORNÝ, R. (2010): Kvantifikace druhů rodu *Fusarium* v obilkách ječmene setého (*Hordeum vulgare* L.) pomocí qRT-PCR metody. *Úroda*, 58: 53–58. ISSN 0139-6013.
- KMOCH, M. – ŠAFRÁNKOVÁ, I. – HOLKOVÁ, L. – POKORNÝ, R. – MARKOVÁ J. (2011): Houby rodu *Fusarium* v přirozeně infikovaných porostech sladovnických odrůd/linií ječmene (*Hordeum vulgare* L.) a jejich identifikace a kvantifikace za využití real-time PCR metody. *Kvasný průmysl*, 57(7–8): 203–208. ISSN 0023-5830.
- KMOCH, M. – HOLKOVÁ, L. – POKORNÝ, R. – CERKAL, R. (2013): Identifikace a kvantifikace hub rodu *Fusarium* v obilkách kukuřice a ječmene pomocí metody založené na qPCR. *Certifikovaná metodika. První vydání. Mendelova univerzita v Brně: Ediční středisko Mendelovy univerzity v Brně. 27 s. ISBN 978-80-7375-909-4.*



VÝZKUMNÝ ÚSTAV
BRAMBORÁŘSKÝ
HAVLÍČKŮV BROD



Řez hlízou s podezřením na *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*

Řada PRAKTICKÉ INFORMACE – Číslo 60.

ALTERNATIVNÍ METODY A POSTUPY LABORATORNÍ DIAGNÓZY *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*.

CERTIFIKOVANÁ METODIKA (osvědčení 6700/2016-MZE-17221 ze dne 10. 2. 2016)

Oponenti: Ing. Pavel Beran, Ph.D., Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,
zemědělská fakulta, *odborný oponent z oboru*

Ing. Michal Hnízdil, Ministerstvo zemědělství, oddělení polních plodin,
oponent ze státní zprávy

Vydal: Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s. r. o.,
Dobrovského 2366, CZ-580 01 Havlíčkův Brod.

Vydání první. Náklad: 30 výtisků.

Obrázky: archiv VÚB. Grafická úprava: Jiří Trachtulec.

Metodika byla vypracována při řešení výzkumného projektu dlouhodobého
konceptního rozvoje výzkumné organizace RO 0711.

ISBN 978-80-86940-68-7

© Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s. r. o., 2016

Tato publikace nesmí být přetiskována vcelku nebo po částech, přenášena nebo uváděna do oběhu pomocí elektronických, mechanických, fotografických či jiných prostředků bez výslovného svolení Výzkumného ústavu bramborářského Havlíčkův Brod, s. r. o.

www.vubhb.cz