



Ing. Martin Kmoč, Ph.D.  
Ing. Petr Dědič, CSc.

**Metodika detekce PSTVd (*Potato spindle tuber viroid*) v bramboru  
a okrasných rostlinách pomocí Real-Time RT-PCR a technologie Luminex**

Certifikovaná metodika



2018

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

**Oddělení genetických zdrojů  
Laboratoř virologie**



**VÝZKUMNÝ ÚSTAV  
BRAMBORÁŘSKÝ  
HAVLÍČKŮV BROD**

**Certifikovaná metodika**

**Metodika detekce PSTVd (*Potato spindle tuber viroid*) v bramboru a okrasných  
rostlinách pomocí Real-Time RT-PCR a technologie Luminex**

**Martin Kmoch  
Petr Dědič**

Realizační výstup projektu Ministerstva zemědělství ČR na rozvoj výzkumné organizace  
č. Mze-RO1618 „Dlouhodobý koncepční rozvoj VÚB – Trvale udržitelné systémy produkce  
kvalitních brambor“

**Havlíčkův Brod, 2018**

# Metodika detekce PSTVd (*Potato spindle tuber viroid*) v bramboru a okrasných rostlinách pomocí Real-Time RT-PCR a technologie Luminex

---

## Dedikace

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu Ministerstva zemědělství ČR na rozvoj výzkumné organizace č. Mze-RO1618 „Dlouhodobý koncepční rozvoj VÚB – Trvale udržitelné systémy produkce kvalitních brambor“.

## Podíly autorů

Ing. Martin Kmoch, Ph.D.	70 %
Ing. Petr Dědič, CSc.	30 %

## Oponenti

**RNDr. Kateřina Tománková, Ph.D.**, *oponent z odborného orgánu státní správy*

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Odbor diagnostiky

Šlechtitelů 23/773, Olomouc 9, PSČ 779 00

e-mail: [katerina.tomankova@ukzuz.cz](mailto:katerina.tomankova@ukzuz.cz)

**Ing. Petr Svoboda, CSc.**, *odborný oponent*

Chmelařský institut s.r.o.

Oddělení biotechnologie

Kadaňská 2525, 438 46 Žatec

e-mail: [svoboda@chizatec.cz](mailto:svoboda@chizatec.cz)

Metodika byla uplatněna v roce 2018.

ISBN: 978-80-86940-79-3

# Metodika detekce PSTVd (*Potato spindle tuber viroid*) v bramboru a okrasných rostlinách pomocí Real-Time RT-PCR a technologie Luminex

## Obsah

1	Cíl metodiky.....	5
2	Vlastní popis metodiky .....	5
2.1	Úvod .....	5
2.2	Podstata použitých metod.....	7
2.2.1	Real-Time RT-PCR.....	7
	PCR spojená s reverzní transkripcí (RT-PCR) .....	9
2.2.2	Technologie LUMINEX xTAG .....	10
2.3	Postupy .....	11
2.3.1	Real-Time RT-PCR.....	11
2.3.2	Technologie Luminex xTAG .....	19
2.4	Příklad praktického využití.....	22
3	Srovnání „novosti postupů“ .....	23
4	Popis uplatnění Certifikované metodiky.....	24
5	Ekonomické aspekty .....	24
6	Seznam použité související literatury .....	25
7	Seznam vybraných publikací, které předcházely metodice .....	27

## **1 Cíl metodiky**

Cílem navrhované metodiky bylo vybrat a ve vlastních pokusech validovat a optimalizovat exaktní laboratorní metody detekce a determinace karanténního viroidu vřetenovitosti hlíz bramboru (*Potato spindle tuber viroid* – PSTVd) ve vybraných okrasných rostlinách (*Solanum jasminoides*, *S. muricatum*, *Brugmansia* spp.) a bramboru (*Solanum tuberosum*). Použité inovované molekulárně-biologické metody, tj. Real-Time RT-PCR (SYBR Green, TaqMan) a technologie Luminex xTAG, zvýší citlivost a specifčnost detekce a determinace PSTVd a zajistí vyšší spolehlivost výsledků. Protokoly byly optimalizovány pro použití v běžné diagnostické laboratoři vybavené zařízením pro molekulární biologii.

## **2 Vlastní popis metodiky**

### **2.1 Úvod**

Viroid vřetenovitosti hlíz bramboru (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd; čeleď Pospiviroidae, rod *Pospiviroid*) tvoří malá, jednovláknová, vysoce strukturovaná, kovalentně uzavřená, cirkulární molekula RNA (341-364 nukleotidů) se sekundární strukturou bez bílkovinného obalu (Gross *et al.*, 1978; Diener, 1979; Jeffries, 1998; Hammond *at* Owens, 2006; Boonham *at al.*, 2004). V rostlinách se rychle a systémově pohybuje z inokulovaného listu do aktivně rostoucích pletiv prostřednictvím floému (Palukaitis, 1987). Viroidy se reprodukují autonomně v citlivých hostitelských rostlinách. Pospiviroidy jsou lokalizovány převážně v jádrech infikovaných buněk a replikují se pomocí mechanismu tzv. valivé kružnice (Diener, 1987).

PSTVd napadá celou řadu užitkových a okrasných rostlin převážně z čeledi lilkovitých (*Solanaceae*) [Hammond *at* Owens, 2006]. Hlavním hostitelem z pohledu projevu symptomů a rozšíření je brambor (*Solanum tuberosum*), rajče (*S. lycopersicum*) a paprika (*Capsicum annuum*) [Mackie *at al.*, 2002; Lebas *et al.*, 2005]. Dalšími hostiteli včetně okrasných rostlin jsou *Brugmansia* spp., *Datura* sp., *Lycianthes rantonneti*, *Persea americana* (avokádo), *Physalis peruviana*, *S. jasminoides*, *S. muricatum* (pepino), *S. sisymbriifolium*, *S. pseudocapsicum*, *S. melongena*, *S. nigrum*, *Streptosolen jamesonii*, *Cestrum* spp., *Petunia* spp., *Chrysanthemum* sp., *Ipomoea batatas*, *Calibrachoa* sp. a *Dahlia* × *hybrida* (Mertelík *et al.*, 2010; Owens *at* Verhoeven, 2009; CABI). Experimentálně byla infikována široká škála dalších druhů z čeledi *Solanaceae*, stejně jako několik druhů z jiných čeledí (Singh, 1973; Diener, 1979). Expresí symptomů na infikovaných rostlinách se může výrazně lišit v závislosti na druhu rostliny, kultivaru, kmeni viroidu, metodě inokulace a environmentálních podmínkách (Owens *at* Verhoeven, 2009). Vývoj symptomů je ovlivněn teplotou a světlem (Diener, 1979). Většina hostitelů vytváří mírné nebo žádné symptomy (Singh *et al.*, 2003). Nepřítomnost příznaků při latentních infekcích zvyšuje riziko šíření viroidu (Owens *at* Verhoeven, 2009). Infekce *S. tuberosum* viroidem PSTVd může být bezpříznaková nebo se symptomy s různou závažností. Napadení rostlin se může projevovat redukcí růstu a menšími, tmavě zelenými, vzpřímenými listy, s fylotaxií ve směru hodinových ručiček. Hlízy mohou být malé, deformované, protáhlé (vřetenovité), popraskané s nápadnými očky (EPPO, 2004) [Obr. 1]. Příznaky u *S. lycopersicum* zahrnují redukcí růstu, laterální zkroucení nových výhonů, ohýbání listů dolů, chlorózu, červenání, křehkost, zvlnění a nekrózu listů a snížení velikosti plodů (Mackie *et al.*, 2002; Hailstones *et al.*, 2003; Lebas *at al.*, 2005). Papriky vykazují velmi mírné symptomy v reakci na infekci PSTVd (Lebas *et al.*, 2005). Infekce lilkovitých okrasných rostlin jsou obvykle bez symptomů (Owens *at* Verhoeven, 2009). Infikované okrasné rostliny mohou být zdrojem inokula (Navarro *et al.*, 2009; Verhoeven *et al.*, 2010).

## Metodika detekce PSTVd (*Potato spindle tuber viroid*) v bramboru a okrasných rostlinách pomocí Real-Time RT-PCR a technologie Luminex

Epidemiologie PSTVd je komplikována kvůli velkému počtu hostitelských druhů a mnoha možným cestám přenosu. Infekce PSTVd je perzistentní, a proto jsou infikované rostliny trvalým zdrojem inokula (Owens *at* Verhoeven, 2009). Hlavním způsobem šíření PSTVd u brambor a okrasných rostlin je jejich vegetativní rozmnožování. Šíří se rovněž mechanicky kontaktem, především kultivačním zařízením, řezáním sadbových hlíz brambor a při řízkování okrasných rostlin (Hammond *at* Owens, 2006; Owens *at* Verhoeven, 2009). Verhoeven *et al.*, 2010 prokázal přenos PSTVd rostlinou šťávou, kontaminovanými prsty a noži z *Brugmansia suaveolens* nebo *S. jasminoides* na brambor i rajče. PSTVd se přenáší semeny (Fernow *et al.*, 1970; Singh, 1970) a pylem (Grasmick *at* Slack, 1985; Singh *et al.*, 1992). Semena jsou potenciálním zdrojem infekce pro rajčata a papriky, které se množí osivem (Owens *at* Verhoeven, 2009). Viroid může být přenosný mšicemi. De Bokx *at* Pirone (1981) uváděli nízkou míru přenosu PSTVd mšicemi *Macrosiphum euphorbiae*, nikoliv *Myzus persicae* nebo *Aulacorthum solani*. Experimentálně byl popsán přenos PSTVd mšicí *M. persicae* z rostlin koinfikovaných PSTVd a virem svinutky listů bramboru (PLRV) (Salazar *et al.*, 1995; Singh *at* Kurz, 1997). PSTVd byl heterologně enkapsidován obalovým proteinem PLRV, což umožňuje viroidu uniknout trávení ve střevě mšic (Querci *et al.*, 1997). V přenosu PSTVd mšicí *M. persicae* tak může pomáhat PLRV (Syller *et al.*, 1997; Owens *at* Verhoeven, 2009).

PSTVd může snížit výtěžek a kvalitu hlíz brambor (Beemster *at* de Bokx, 1987) a tím způsobit závažné ekonomické ztráty (Hammond *at* Owens, 2006; Boonham *et al.*, 2004). Vzhledem k tomu, že PSTVd je řazen do Seznamu vysoce rizikových biologických agens (vyhláška č. 474/2002 Sb.) a infekce mohou být asymptomatické, je nutné pro detekci a identifikaci viroidu v rostlinách využívat exaktních laboratorních metod a postupů. K dispozici je velký počet metod lišících se citlivostí, efektivitou nákladů, požadovaným laboratorním zařízením, použitím v širokém měřítku apod. Pro detekci a identifikaci pospiviroidů byly v návaznosti na elektroforetické metody v PAA gelech (Jeffries *at* James, 2005), vyvinuty velmi citlivé testy založené na Northern blot hybridizaci (Owens *at* Diener, 1981). K nejcitlivějším detekčním metodám jsou řazeny molekulární postupy založené na PCR (Polymerase Chain Reaction). Pro detekci PSTVd v hlízkách brambor, listech, pylu a semenech byla vyvinuta technika RT-PCR (Shamloul *et al.*, 1997; Verhoeven *et al.*, 2004). Kromě konvenční RT-PCR byla vyvinuta pro detekci PSTVd TaqMan RT-PCR (Boonham *et al.*, 2004; Roenhorst *et al.*, 2005; Monger *et al.*, 2010). Další variantou PCR je RT-LAMP (Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification), která nepotřebuje drahé vybavení, je rychlá a poměrně citlivá (Tsutsumi *et al.*, 2010). PSTVd může být také detekován macro a microarray platformami (Agindotan *at* Perry, 2008; Tiberini *at* Barba, 2012). K exaktním metodám lze přiřadit též technologii Luminex xTAG, kde můžeme plně využít též multiplexovou detekci celé škály viroidů rodu *Pospiviroid*.



Obr. 1 Symptomy PSTVd na hlízkách bramboru

## 2.2 Podstata použitých metod

### 2.2.1 Real-Time RT-PCR

Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR) simuluje proces replikace v podmínkách *in vitro*. Při iniciaci replikace vznikají pomocí enzymatického komplexu jednovláknové úseky templátové (matricové) DNA (Vejl, 1997).

PCR se skládá z následujících kroků, které se opakují:

1. **Denaturace** – zahřívání DNA po dobu 20–30 sekund na teplotu 94–98 °C, dochází k rozrušení vodíkových můstků v molekule, rozvolnění dvoušroubovice a vzniká jednovláknová DNA, na kterou mohou v dalším kroku nasednout primery.
2. **Nasednutí primerů** (*annealing*) – sníží teploty na 50–65 °C (závisí na  $T_m$  primerů)\*, což umožňuje nasednutí primerů na specifická místa DNA. Na dvouvláknové úseky DNA-primer se váže DNA polymeráza.
3. **Prodlužování** – teplota závisí na použité DNA polymeráze. Nejběžnější *Taq* polymeráza má optimum aktivity 75–80 °C. Dochází k samotné syntéze DNA. Ve směru 5'→3' přirůstá vlákno DNA komplementární k původní molekule DNA (Vejl, 1997; Clark, 2005).

Kroky se cyklicky opakují. Pro dostatečnou amplifikaci původní molekuly DNA obvykle postačuje 30 cyklů. V případě, že na začátku byla ve vzorku pouze jediná molekula DNA, po 32 cyklech teoreticky dostaneme až 1 miliardu nasyntetizovaných molekul DNA. PCR probíhá v zařízení zvaném termocykler, které je zkonstruováno tak, aby dokázalo během několika sekund zvýšit nebo snížit teplotu o několik desítek °C (Clark, 2005).

Real-Time PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) metoda je založena na klasické PCR s tím rozdílem, že speciální přístroj umožňuje kontinuálně monitorovat (v reálném čase) přírůstky DNA během každého cyklu (u klasické PCR se detekuje až finální produkt). Základní podmínkou je přítomnost fluorescenčního substrátu, který se váže na syntetizovanou DNA. Úroveň detekované fluorescence, která v průběhu PCR roste, je přímo úměrná množství nasyntetizované nukleové kyseliny (vzniklého produktu). Data jsou sbírána během celého PCR procesu na speciálních "termocyklerech" s optikou umožňující excitaci substrátů a následnou detekci fluorescence v každé jamce. Přístroj po každém cyklu změří fluorescenci a výsledek předá řídicímu softwaru, který zobrazuje průběžně množství uvolněné fluorescence (Raclavský, 2003; Mičuda *et al.*, 2006).

Pro detekci PCR produktů se nejčastěji využívá nespecifické interkalační barvivo SYBR<sup>®</sup> Green I. Během se cyklů váže na vznikající ds DNA a vazbou na DNA se aktivuje – emituje fluorescenční záření, které je průběžně snímáno a vyhodnocováno. Nárůst fluorescenčního signálu vidíme na obrazovce jako narůstající křivku. Každá křivka představuje jeden vzorek.

PCR probíhá v následujících fázích (Obr 2):

- **Exponenciální fáze** – reakce je precizní a specifická
- **Lineární fáze** – efektivita reakce pomalu klesá
- **Plató (plateau) fáze** – reakce je pozvolna inhibována, produkt nepřibývá anebo jen minimálně

---

\*  $T_m$  (melting temperature) primerů – teplota při které tvoří 50 % molekul DNA primerů dvouvláknovou strukturu a 50 % jednovláknovou strukturu

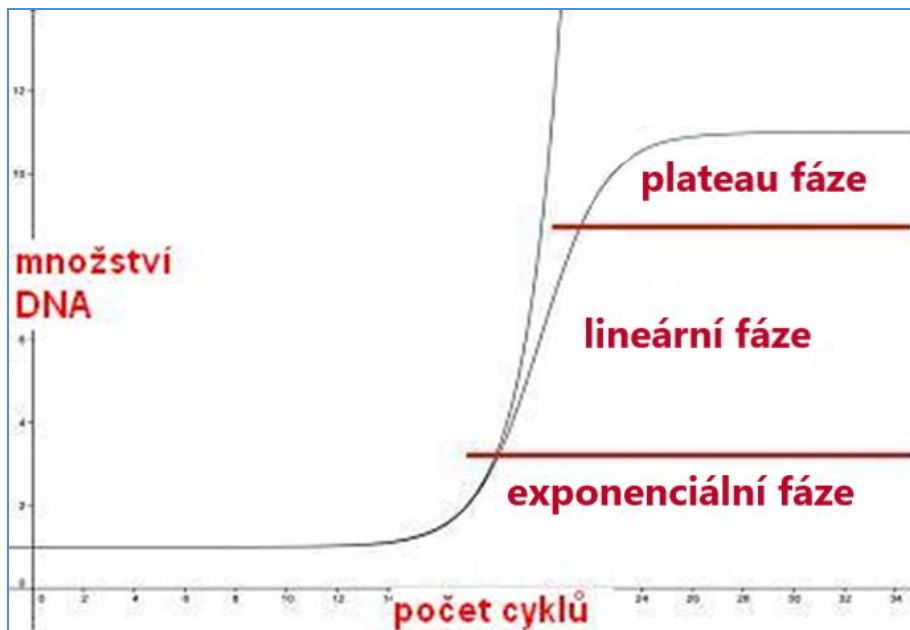
$T_m = 2\text{ °C} \times (A+T) + 4\text{ °C} \times (G+C)$

optimální teplota annealingu by měla být 5 °C pod  $T_m$



## Metodika detekce PSTVd (*Potato spindle tuber viroid*) v bramboru a okrasných rostlinách pomocí Real-Time RT-PCR a technologie Luminex

Typická amplifikační křivka (Obr. 2, 3) má esovitě zakřivený tvar a lze ji rozdělit na 3 části: 1) „background“ fázi kdy je amplifikátu tak málo, že jeho fluorescence ještě nedosahuje měřitelných hodnot; 2) exponenciální fázi, kdy množství produktu exponenciálně roste (trvá asi 4–8 cyklů) a 3) fázi plateau, kdy dochází k saturaci systému, množství amplifikovaného produktu se dále nemění a fluorescenční signál zůstává konstantní. Platí, že čím dříve amplifikační křivka dosáhne exponenciální fáze, popř. překročí určitý fluorescenční práh umístěný do této fáze, tím více startovních templátových molekul bylo přítomno ve vzorku na počátku reakce (Mičuda *et al.*, 2006; Raclavský, 2003).



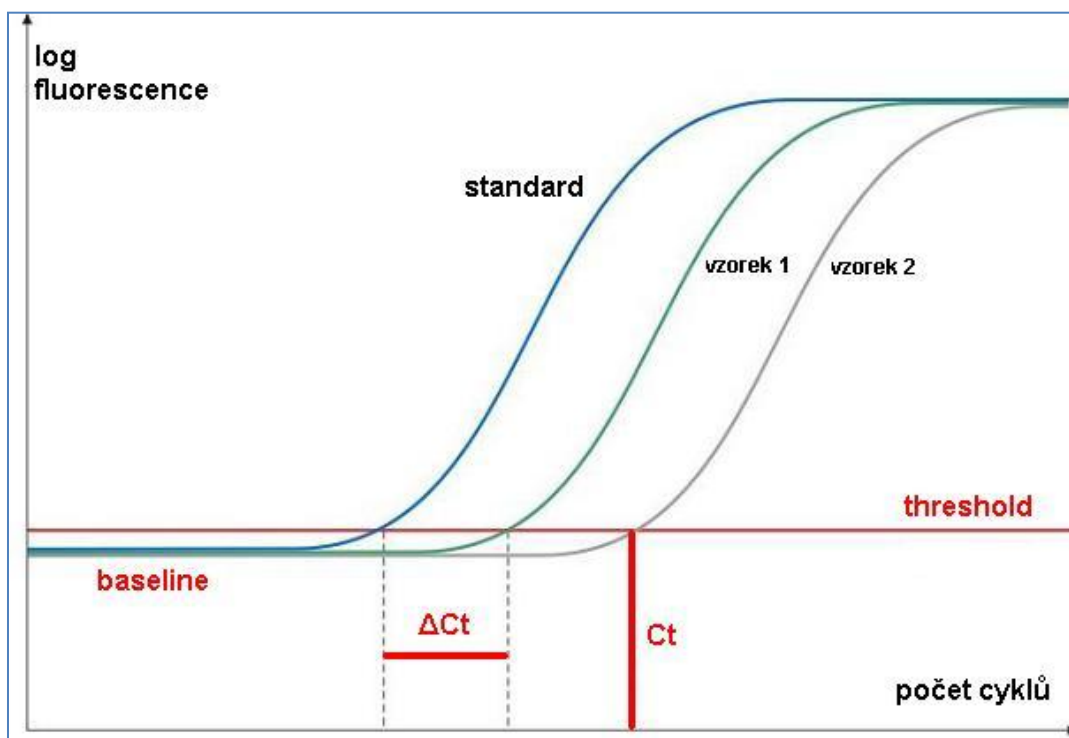
Obr. 2 Fáze PCR

Při Real-Time PCR probíhá detekce v exponenciální fázi, kdy jsou ve vzorcích zachovány kvantitativní poměry a reakce je precizní a specifická. Oproti tomu u klasické PCR probíhá detekce v plató fázi, při níž nelze rozlišit množství matricové DNA ve vzorku.

### Terminologie

- **Baseline** – počáteční stadium reakce (Obr. 3)
- **Threshold** – přímka, která specifikuje úroveň fluorescenčního práhu umístěného do exponenciální fáze (Obr. 3)
- **Threshold cycle** ( $C_T$ , v literatuře též  $C_P$ ) – cyklus, kdy amplifikační přímka překročí zmíněný fluorescenční práh, základní parametr používaný v kvantifikaci (Obr. 3)
- **No template control** (NTC) – kontrolní (slepý) vzorek bez templátu





**Obr. 3** Amplifikační křivky

Kvantifikace DNA se provádí prostřednictvím matematické analýzy amplifikačních křivek vzniklých vynesáním naměřené fluorescence oproti pořadovému číslu příslušného cyklu.

### TaqMan PCR

Pro detekci PCR produktů lze použít kromě barviva SYBR<sup>®</sup> Green specifické sondy (próby), nejčastěji TaqMan. Kromě primerů se do reakce vkládá další oligonukleotid, který dosedá na amplifikovaný úsek. Tento oligonukleotid je na jednom konci označený fluorescenční značkou a na druhém konci nese tzv. zhášec (quencher). Pokud je fluorescenční látka v těsné blízkosti zhášeče, je její fluorescence potlačena. Vlastní PCR probíhá obvyklým způsobem až do okamžiku, kdy DNA polymeráza při syntéze nového řetězce narazí na značený nukleotid. V tom okamžiku jej začne vytěšňovat z templátového vlákna a štěpí jej. Tím se uvolní fluorescenční sonda do roztoku a ve speciálním PCR cykleru je možné měřit fluorescenci přímo ve zkumavce v průběhu amplifikace. Intenzita fluorescence je úměrná množství nasyntezovaného PCR produktu (Mičuda *et al.*, 2006; Raclavský, 2003).

### PCR spojená s reverzní transkripcí (RT-PCR)

RT-PCR se používá, pokud je potřeba namísto DNA amplifikovat mRNA (např. viry, viroidy). Prvním krokem je izolace celkové RNA nebo mRNA ze vzorku pletiva rostliny. Následuje převedení mRNA na cDNA pomocí reverzní transkriptasy a posléze běžná PCR. (Mičuda *et al.*, 2006; Raclavský, 2003).

### Výhody Real-Time PCR

Hlavní výhodou Real-Time PCR oproti klasické PCR je možnost kvantifikace syntetizovaného produktu, a to buď relativní, tj. porovnáním s jinou skupinou vzorků (např.

## Metodika detekce PSTVd (*Potato spindle tuber viroid*) v bramboru a okrasných rostlinách pomocí Real-Time RT-PCR a technologie Luminex

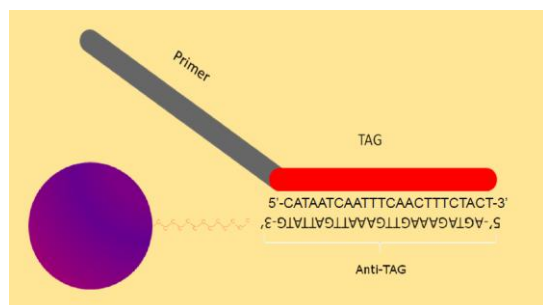
kontrolní), nebo absolutní, tj. z kalibrační křivky. Při hodnocení platí skutečnost, že čím vyšší je obsah nukleové kyseliny v testovaném vzorku, tím rychlejší je přírůstek fluorescence. Množství produktu, vytvořeného amplifikací, závisí v každé PCR na množství templátové DNA, která je přidána do reakce. Reakce probíhá kvantitativně. Další výhodou Real-Time PCR je vysoká specificita a citlivost (Mičuda *et al.*, 2006; Raclavský, 2003). Výsledek reakce známe dřív, než proběhnou všechny cykly. Kromě tohoto urychlení a vypuštění zdlouhavé detekce produktu na gelu je uvedená technika hlavně výhodná tam, kde potřebujeme znát přesné množství vstupní templátové DNA (Raclavský, 2003).

### 2.2.2 Technologie LUMINEX xTAG

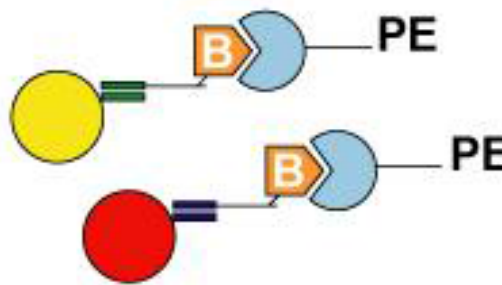
Technologie xTAG byla vyvinuta pro současnou detekci 150 různých nukleotidových sekvencí (nebo jiných analytů) v jediné reakci. Technologie využívá dvou různých typů mikročastic, tj. xTAG a MagPlex TAG. Mikročastice xTAG je označena polystyrenová kulička o průměru 5,6  $\mu\text{m}$ . Označení se provádí pomocí dvou spektrálně odlišných fluorochromů. Mikročastice MagPlex TAG je superparamagnetická karboxylátovaná xMAP® částice, která je interně značena fluorescenčními barvivy. Kuličky jsou předem spojeny s TAG oligonukleotidovými sekvencemi. Tyto TAG oligonukleotidové sekvence, známé jako anti-tag sekvence, jsou komplementární k značkám připojeným k ASPE primerům.

Technologie LUMINEX xTAG se skládá z TSPE (Target Specific Primer Extension), následné hybridizace a detekce pomocí paramagnetických mikročastic. Vlastní postup zahrnuje následující kroky:

- 1) Extrakce celkové RNA ze vzorku
- 2) Reverzní transkripce a multiplex amplifikace konzervativních úseků genomu (oblastí zájmu) pomocí PCR za použití cílových (outer) primerů (uživatel může navrhnout vlastní multiplexní PCR primery)
- 3) Purifikace získaného PCR produktu – odstranění přebytečných primerů a oligonukleotidů
- 4) Lineární PCR TSPE reakce s inkorporací biotin-dCTP a molekulární hybridizace s mikročasticemi MagPlex TAG (Obr. 4) – biotinylované dNTP začleněny do nově polymerizovaného řetězce DNA, kde každý TSPE primer nese unikátní MagPlex Tag®, která je reverzně komplementární k MagPlex TAG anti-tag s mikročasticí)
- 5) Vazba biotinylovaného dNTP se streptavidinem označeným fluorescenčním reportérovým barvivem (phycoerythrin – PE) [Obr. 5]
- 6) Detekce v systému Luminex (AtheNA Luminex 200 Analyser) – měření specifické fluorescence (MFI) příslušné mikročastice se svým vnitřním barvivem a současně úrovně fluorescence reportérového barviva se streptavidinem. Součástí reakcí je interní kontrola (*Nad5*).



Obr. 4 TSPE reakce



Obr. 5 Vazba dNTP se streptavidinem

## **2.3 Postupy**

### **2.3.1 Real-Time RT-PCR**

#### **2.3.1.1 Izolace RNA z pletiv rostlin**

Odebraný vzorek listů rostlin o hmotnosti max. 100 mg se homogenizuje v tekutém dusíku a RNA se dále extrahuje pomocí extrakční sady InviTrap® Spin Plant RNA Mini Kit (Invitrogen). Po extrakci se ve vzorcích změní množství a kvalita RNA pomocí spektrofotometru. RNA degraduje působením tzv. ribonukleáz (RNáz), které jsou termostabilní (sterilizace autoklávováním je nepoškodí, aktivita zachována i působením některých denaturačních činidel). Pro zabránění degradace RNA je vhodné ošetřovat pomůcky a roztoky inhibitory RNáz (diethylpyrokarbonátem, DEPC) [Mičuda *et al.*, 2006; Raclavský, 2003].

#### **Technické vybavení pro izolaci RNA z rostlin a pro její uchování**

- ✓ Nádoba na tekutý dusík
- ✓ Pracovní nádoba na tekutý dusík
- ✓ Laboratorní váhy – na navážky vzorků (Mettler AE 160)
- ✓ Skalpel, pinzety (odběr vzorků)
- ✓ Třecí misky s tloučky
- ✓ Centrifuga s otáčkami  $\geq 12\ 000$  rpm, s rotorem na plastové mikrozkušavky o objemu 2,0 ml (Hettich Zentrifugen EBA 12R)
- ✓ Vortex (Techno Kartell TK3S)
- ✓ Pipety (2–20  $\mu$ l, 20–200  $\mu$ l a 100–1000  $\mu$ l) 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
- ✓ Jednorázové rukavice

#### **Chemikálie potřebné pro izolaci RNA z bramboru**

- ✓ Tekutý dusík
- ✓ Extrakční kit – InviTrap® Spin Plant RNA Mini Kit (Invitrogen, kat. č. 1064100300)
- ✓  $\beta$ -merkaptóetanol (Serva, kat. č. 3956301)
- ✓ Etanol (96–100 %, analytical grade) [Sigma Aldrich, kat. č. E7023, E7148 nebo 459836] – do pufrů
- ✓ Technický etanol (70 %) – sterilizace
- ✓ Diethylpyrokarbonát, DEPC – doporučené

#### **Postup izolace RNA z listů bramboru pomocí kitu InviTrap® Spin Plant RNA Mini Kit**

##### **Před zahájením vlastní izolace je nutno připravit:**

- ✓ Pufry Wash Buffer R1 a Wash Buffer R2 jsou dodávány bez etanolu, proto je nutné před prvním použitím přidat do roztoků doporučené množství etanolu (96–100 %)
  - 20 ml etanolu do Wash Buffer R1

## Metodika detekce PSTVd (*Potato spindle tuber viroid*) v bramboru a okrasných rostlinách pomocí Real-Time RT-PCR a technologie Luminex

---

- 48 ml etanolu do Wash Buffer R2
- ✓ Přidat  $\beta$ -merkaptóetanol do lyzačního roztoku (Lysis Solution DCT) – 1/100 objemu
- ✓ Lyzační pufr (Lysis Solution DCT) se může během skladování částečně vysrážet. V takovém případě je vhodné pufr před použitím zahřát ve vodní lázni na 65 °C.

Všechny kroky extrakce RNA probíhají za pokojové teploty (15–25 °C)!

- a) Navážit 100 mg vzorku listů daného druhu rostliny a homogenizovat (rozetřít) v třecí misce za požití tekutého dusíku.
- b) Do mikrozkušavky (1,5 ml) napipetovat 900  $\mu$ l Lysis Solution DCT a 9  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptóetanolu ( $\beta$ -ME).
- c) Přenést homogenizovaný vzorek do mikrozkušavky (1,5 ml), homogenizovaný vzorek nesmí roztát mimo lyzační pufr s  $\beta$ -ME!
- d) Mikrozkušavky zavřít a důkladně promíchat (vortex).
- e) Inkubovat promíchanou směs 30 min ve vortexu při pokojové teplotě (*lyze buněk*).
- f) Centrifugovat 1 min při max. otáčkách ( $\geq 12\,000$  rpm).
- g) Supernatant opatrně přenést do kolonky Prefilter umístěné v 2,0 ml záchytné mikrozkušavce Receiver Tube, centrifugovat 1 min/10 000 rpm (*purifikace lyzátu, odstranění zbytků buněk a sraženiny*).
- h) Odstranit kolonku Prefilter a přidat do filtrátu 500  $\mu$ l etanolu (96–100 %) a promíchat důkladně pipetou (*částečné vysrážení RNA*).
- i) Napipetovat (přelít) lyzát do RNA binding RTA Spin Filter (kolonka s membránou) a centrifugovat 1 min/10 000 rpm (*RNA se v tomto kroku váže na specifickou membránu z křemičité pryskyřice, která selektivně váže DNA/RNA v závislosti na koncentraci solí a dalších faktorech*), vylít filtrát a vrátit RTA Spin Filter zpět do RTA Receiver Tube
- j) Opakovat krok i) se zbývající částí vzorku – nanést zbytek lyzátu na stejnou kolonu
- k) Přidat pipetou 500  $\mu$ l Wash Buffer R1 do RTA Spin Filter a centrifugovat 1 min/10 000 rpm (*promývání kolonky*), vylít filtrát
- l) Pipetovat 700  $\mu$ l Wash Buffer R2 do RTA Spin Filter a centrifugovat 30 s/10 000 rpm (*promývání kolonky*), vylít filtrát
- m) Opakovat krok l)
- n) Pro odstranění stop etanolu centrifugovat 3 min/12 000 rpm, vyhodit RTA Receiver Tube
- o) Přenést RTA Spin Filter (kolonku s membránou) do RNase free Elution Tube a opatrně přidat 50  $\mu$ l (30–60  $\mu$ l) Elution Buffer přímo na střed membrány, nechat inkubovat 2 min při pokojové teplotě (15–25 °C) a centrifugovat 1 min/10 000 rpm, vyhodit membránu (RTA Spin Filter) [*eluze RNA*]
- p) Po izolaci RNA je nezbytné stanovení její kvality a kvantity pomocí spektrofotometru. Čistota RNA se hodnotí na základě stanovení poměru absorbance při 260 a 280 nm (čistá RNA má  $A_{260}/A_{280}$  přibližně 1,9–2,1).
- q) Zamrazit vzorky (při -20 °C, pro dlouhodobé uchování při -80 °C).

### 2.3.1.2 PCR reakce

#### Technické vybavení potřebné pro Real-Time RT-PCR

- ✓ Termocykler (Mx3005P qPCR System – Agilent Technologies) [Obr. 6]
- ✓ 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 mikrozumavky 1,5 ml (Eppendorf) – příprava směsi
- ✓ Pipety - 0,2–2,0  $\mu$ l, 2–20  $\mu$ l, 20–200  $\mu$ l a 100–1000  $\mu$ l (Finnpipette), kompatibilní sterilní RNase-free špičky (nejlépe s filtrem – zabránění kontaminaci)
- ✓ Autokláv – sterilizace špiček, pipet, mikrozumavek (Stolní laboratorní autokláv OT 032)
- ✓ Chladicí podložka nebo polyesterová nádoba na led
- ✓ PCR destičky – 96 jamek (Bio-Rad)
- ✓ Jednorázové rukavice



**Obr. 6** Termocykler Mx3005P qPCR

#### Chemikálie potřebné pro Real-Time RT-PCR

- ✓ Druhově specifické primery a TaqMan sondy (syntéza firmou Generi Biotech, s.r.o. podle sekvencí popsaných v uvedené publikaci) [Tab. 1]
- ✓ One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time) – TaCaRa (cat. č. RR064A) – TaqMan Real Time RT-PCR
- ✓ One Step SYBR® PrimeScript™ RT-PCR Kit II (Perfect Real Time) – TaCaRa (cat. č. RR086A) – Sybr Green Real Time RT-PCR
- ✓ DNase/RNase Free dH<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, kat. č. W4502)



## Metodika detekce PSTVd (*Potato spindle tuber viroid*) v bramboru a okrasných rostlinách pomocí Real-Time RT-PCR a technologie Luminex

**Tab. 1** Sekvence použitých primerů a TaqMan sond

Název primeru	Sekvence primeru, sondy (5' - 3')	Poznámka
PSTV-231F	GCC CCC TTT GCG CTG T	Boonham <i>et al.</i> , 2004
PSTV-296R	AAG CGG TTC TCG GGA GCT T	
PSTV-251T	[FAM ] CAG TTG TTT CCA CCG GGT AGT AGC CGA [BHQ1]	
Nad5-F	GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT	Menzel <i>et al.</i> , 2002
Nad5-R	CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA	
Nad5-P	[HEX] AGG ATC CGC ATA GCC CTC GAT TTA TGT G [BHQ1]	Botermans <i>et al.</i> , 2013

FAM (6-carboxyfluorescein); HEX (hexachlorofluorescein); TAMRA (tetramethyl-6-carboxyrhodamine); BHQ1 (Black Hole Quencher)

### Před zahájením přípravy PCR reakce nutno připravit:

- ✓ Naředit RNase-free dH<sub>2</sub>O primery a sondu na pracovní koncentraci (10 µM)
- ✓ Rozehřát na ledu primery a sondu (pokud jsou již naředěné)
- ✓ Rozehřát na ledu složky reakčního kitu

### Vlastní postup Real-Time RT-PCR reakce

#### Všeobecné pokyny:

- všechny složky kitů (One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit – Perfect Real Time; One Step SYBR® PrimeScript™ RT-PCR Kit II – Perfect Real Time) se uchovávají v mrazničce, musí být chráněny před světlem
- používané chemikálie se rozmrazí až těsně před použitím, zvortexují, odebere se požadované množství
- rozmražené vzorky RNA se udržují při 0 °C na ledu, před odebráním určeného množství se vždy promíchají
- namíchané vzorky se udržují při 0 °C na ledu nebo chladicí podložce
- pracuje se sterilně (předcházení kontaminace reakcí)

#### Příprava reakční směsi (premixu)

Nejprve se do mikrokumavky (1,5 ml) připraví tzv. premix (namíchaná reakční směs bez RNA pro všechny hodnocené vzorky. Objemy jednotlivých komponent se musí vypočítat podle počtu analyzovaných vzorků. Do reakce se navíc zařadí pozitivní kontrola (standard) a negativní kontrola (NTC – bez templátu a RNA z negativní – zdravé rostliny). Na každých 10 vzorků přidáme jeden vzorek navíc, aby se kompenzovala možná chyba pipetování. Po napipetování všech složek se premix pipetou dobře promíchá a krátce odstředí.

## Metodika detekce PSTVd (*Potato spindle tuber viroid*) v bramboru a okrasných rostlinách pomocí Real-Time RT-PCR a technologie Luminex

---

### Složení a objemy reakční směsi pro PSTVd a interní kontrolu (Nad5) – na jednu reakci (20 µl)

#### TaqMan Real-Time RT-PCR (duplex):

• 2× One Step RT-PCR Buffer III (dNTP mix, Mg <sup>2+</sup> )	10 µl (finál. konc. 1×)
• TaKaRa Ex Taq HS (5 U/µl)	0,4 µl
• PrimeScript RT enzyme Mix II	0,4 µl
• PCR Forward Primer (10 µM) – PSTVd	0,8 µl (finál. k. 400 nM)
• PCR Reverse Primer (10 µM) – PSTVd	0,8 µl (finál. k. 400 nM)
• TaqMan Probe (10 µM) – PSTVd	0,64 µl (finál. k. 320 nM)
• PCR Forward Primer (10 µM) – Nad5	0,72 µl (finál. k. 360 nM)
• PCR Reverse Primer (10 µM) – Nad5	0,72 µl (finál. k. 360 nM)
• TaqMan Probe (10 µM) – Nad5	0,56 µl (finál. k. 280 nM)
• ROX Reference Dye II (50×)	0,4 µl
• RNase Free dH <sub>2</sub> O	2,56 µl
• RNA (5–10 ng/µl, ředěno 10×)*	2,0 µl

#### Sybr Green Real-Time RT-PCR:

• 2X One Step SYBR <sup>®</sup> RT-PCR Buffer IV	10 µl (finál. konc. 1×)
• PrimeScript <sup>™</sup> 1 step Enzyme Mix II	0,8 µl
• PCR Forward Primer (10 µM)	0,8 µl (finál. k. 400 nM)
• PCR Reverse Primer (10 µM)	0,8 µl (finál. k. 400 nM)
• ROX Reference Dye II (50×)	0,4 µl
• RNase Free dH <sub>2</sub> O	5,7 µl
• RNA (5–10 ng/µl, ředěno 10×)*	1,5 µl

\*RNA analyzovaných vzorků se upraví na stejnou koncentraci.

#### Nanesení reakční směsi (premixu) na destičku (96 jamek)

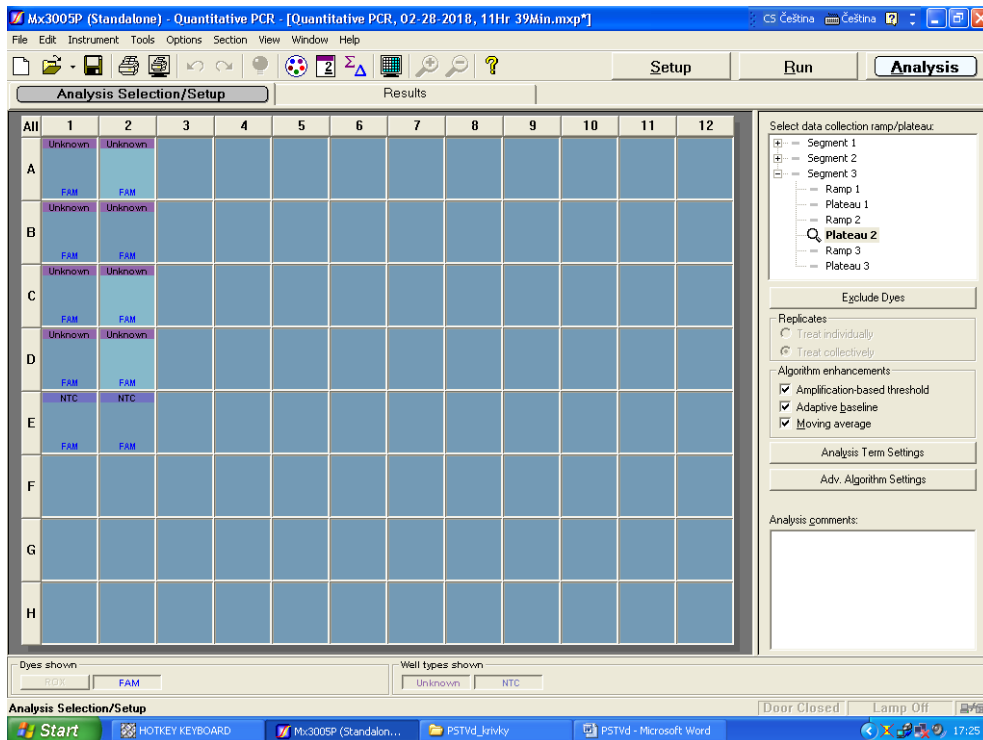
- Ze zásobního reakčního mixu se napipetuje do každé jamky na destičce určené množství reakční směsi a k tomu se přidá určený objem naředěné RNA hodnoceného vzorku. Pipetou se RNA opatrně promíchá s premixem. PCR reakce probíhá v objemu 20 µl reakční směsi.
- Do reakce se zařadí pozitivní kontrola (standard), negativní kontrola (zdravá rostlina) a NTC (*no template control*, bez templátu, slepý vzorek).
- Destička se zavíčkují průhledným krytem.
- Destičku je vhodné následně krátce stočit na centrifuze (1 500 rpm) ve speciálním rotoru aby stekl reakční mix ze stěn a odstranily se případné vzduchové bublinky.
- Pokud není možné provést PCR amplifikaci bezprostředně po přípravě, je nutné napipetovanou destičku uložit krátkodobě v chladničce, eventuálně v mrazničce.

#### Nastavení pozice vzorků, popis vzorků a nastavení protokolu podmínek PCR reakcí

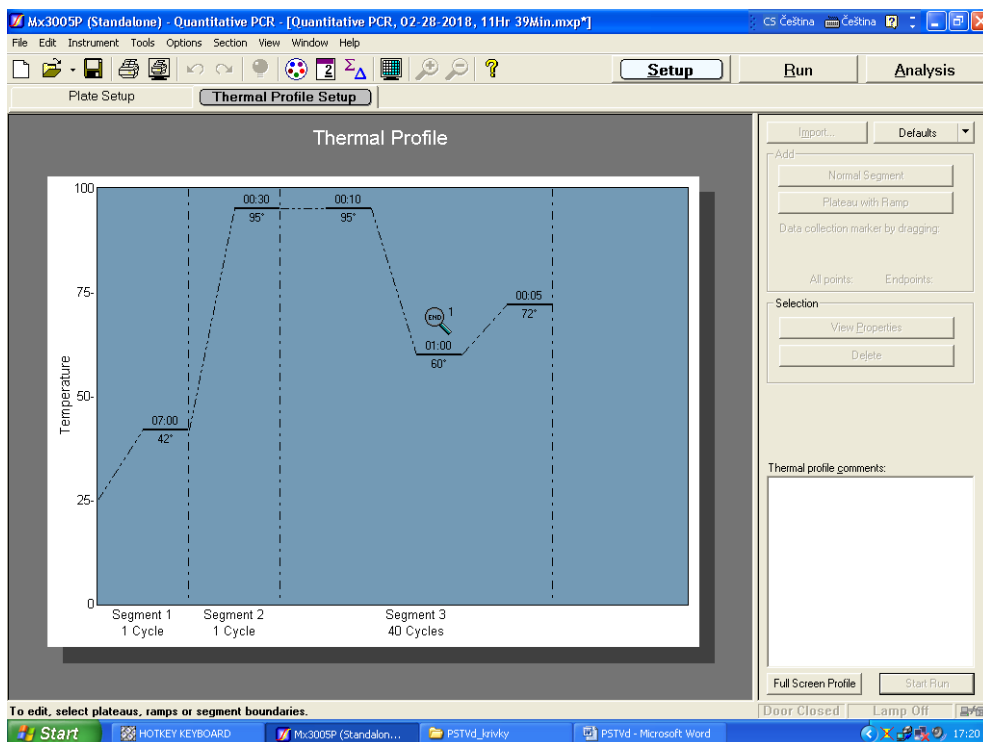
Reakce se provede v termocykleru Mx3005P qPCR System. Nastavení pozice vzorků v jednotlivých jamkách PCR-destičky (Obr. 7), popis vzorků a nastavení protokolu podmínek PCR reakcí (Obr. 8) se provede v příslušném softwaru, který je součástí termocykleru. Při použití jiného typu termocykleru se může vzhled a používání software lišit.



# Metodika detekce PSTVd (*Potato spindle tuber viroid*) v bramboru a okrasných rostlinách pomocí Real-Time RT-PCR a technologie Luminex



Obr. 7 Nastavení pozice vzorků a popis vzorků v softwaru termocykleru



Obr. 8 Nastavení protokolu podmínek PCR reakcí v softwaru termocykleru

## Reakční podmínky pro PSTVd a interní kontrolu (Nad5)

### TaqMan Real-Time RT-PCR:

- 1× 42 °C, 7 min (reverzní transkripce, prepis RNA na cDNA)
- 1× 95 °C, 30 s (první denaturace)
- 40× 95 °C, 10 s (druhá denaturace)

## Metodika detekce PSTVd (*Potato spindle tuber viroid*) v bramboru a okrasných rostlinách pomocí Real-Time RT-PCR a technologie Luminex

---

60 °C, 60 s (*annealing* primerů)  
72 °C, 5 s (syntéza nového řetězce DNA)

### Sybr Green Real-Time RT-PCR:

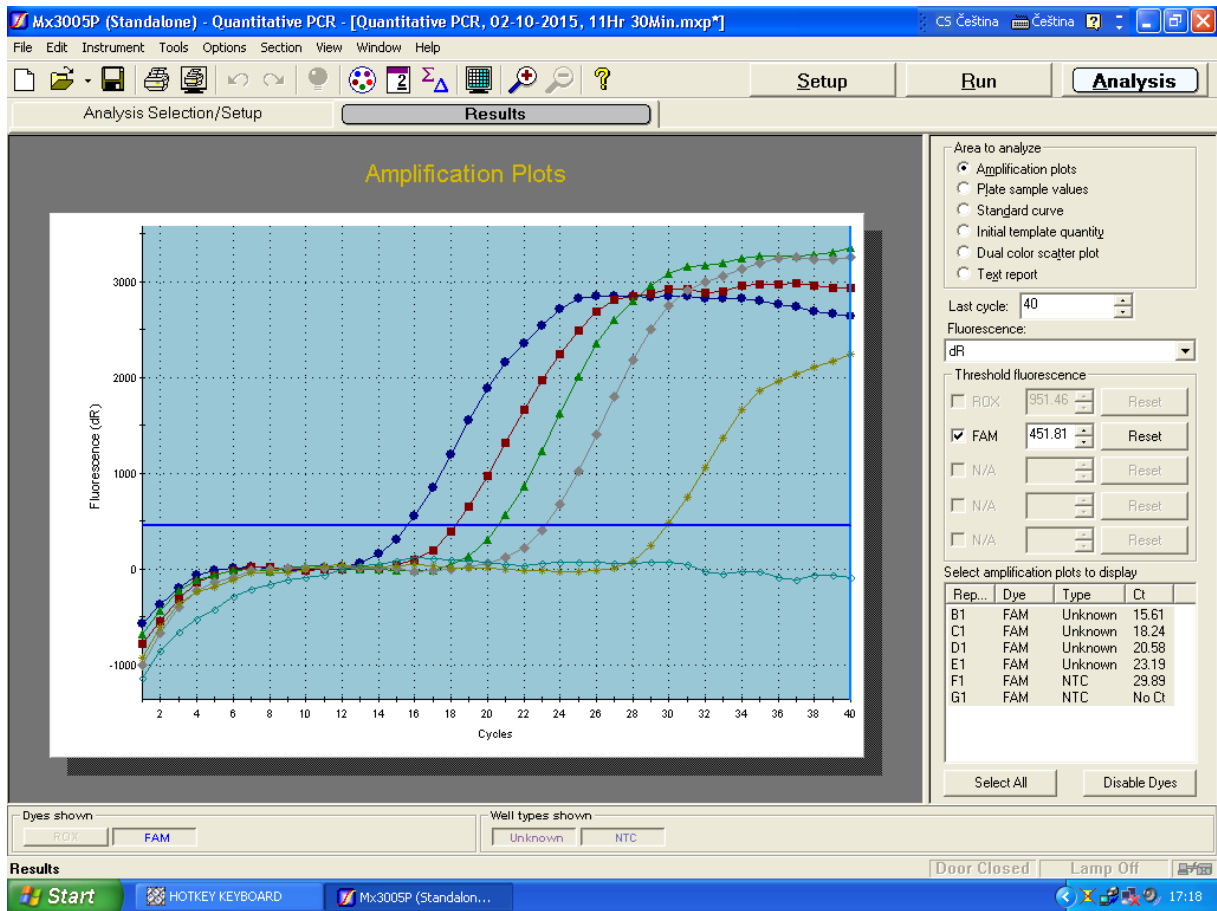
1×	42 °C, 10 min (reverzní transkripce, přepis RNA na cDNA)
1×	95 °C, 20 s (denaturace)
40×	95 °C, 10 s (denaturace)
	55 °C, 45 s ( <i>annealing</i> primerů)
	72 °C, 30 s (syntéza nového řetězce DNA)
1×	95 °C, 30 s ( <i>melting analyse</i> : 55 °C až 95 °C)
	55 °C, 60 s
	95 °C, 30 s

### Vyhodnocení Real-Time RT-PCR reakce

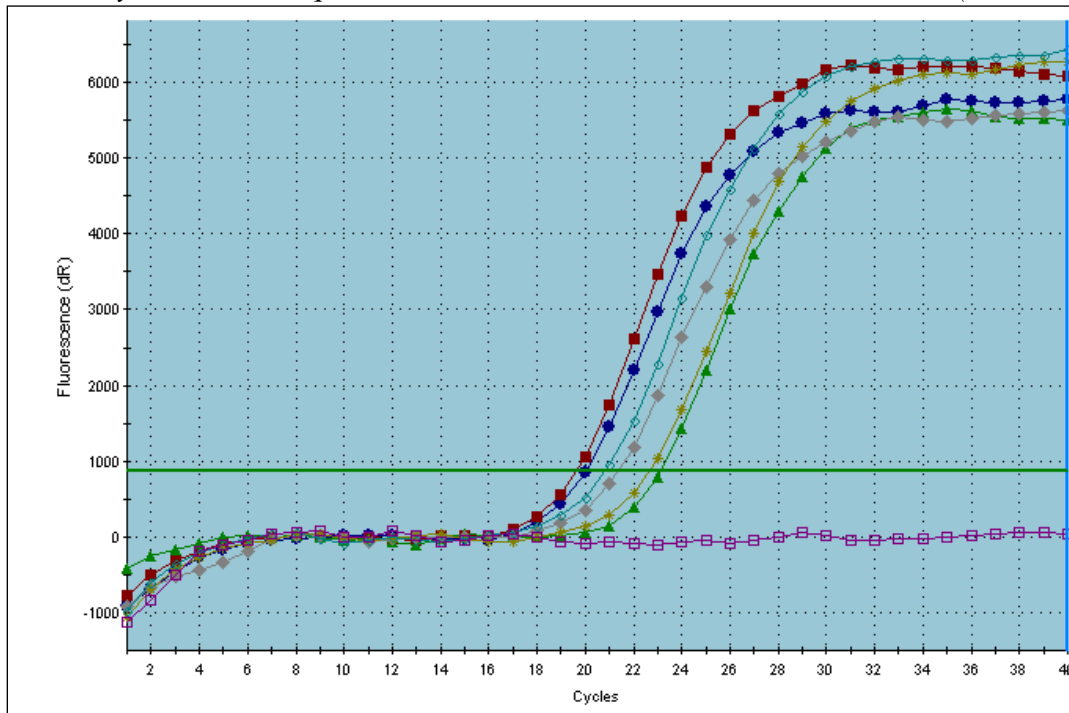
Na základě hodnot  $C_T$  (Threshold cycle) sledovaných vzorků, pozitivní kontroly (standardu) a negativní kontroly se vyhodnotí Real-Time RT-PCR reakce (Obr. 9, 10, 11). Stanoví se, zda je testovaný vzorek daného druhu rostliny negativní nebo pozitivní na PSTVd. Veškeré hodnoty  $C_t$  nižší než 30 (TaqMan Real-Time RT-PCR), resp. 35 (Sybr Green Real-Time RT-PCR) jsou považovány za pozitivní. Interní standard (*Nad5*) zařazený do testů slouží ke kontrole kvality extrahované RNA a vzniku falešně negativních výsledků. U metody Sybr Green se ověří specifita a čistota produktů po posledním cyklu pomocí analýzy teploty tání (*melting analyse*).

Vzorky pro kalibrační křivky umožňující stanovení účinností PCR. Pro hodnocení účinnosti reakcí se vytvoří kalibrační křivky z nejsilněji infikovaných vzorků. Tyto vzorky se zvolí na základě předběžného hodnocení infekce. Z těchto vzorků se vytvoří kalibrační řady (ředění: 1:1, 1:2, 1:4 a 1:8). Vzorky kalibrační řady se hodnotí současně (stejná reakční směs a reakční podmínky) s analyzovanými vzorky. Ze získaných hodnot  $C_T$  se stanoví účinnost PCR reakcí.

# Metodika detekce PSTVd (*Potato spindle tuber viroid*) v bramboru a okrasných rostlinách pomocí Real-Time RT-PCR a technologie Luminex

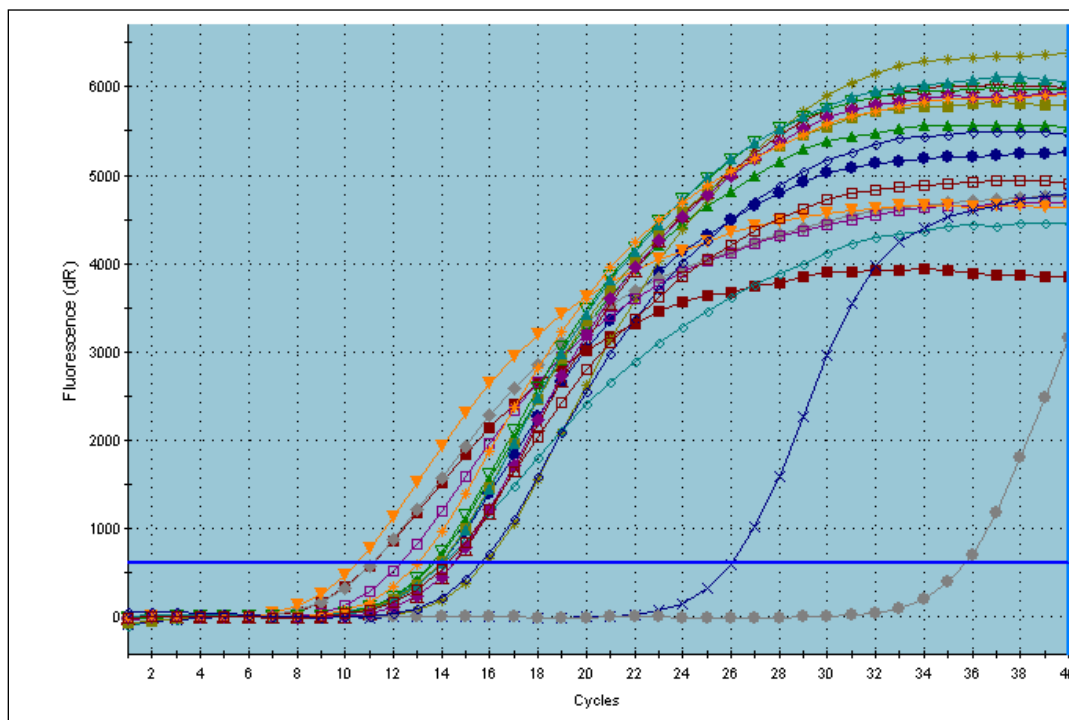


**Obr. 9** Vyhodnocení TaqMan Real-Time RT-PCR reakce – reakce PSTVd (ředící řada)



**Obr. 10** Vyhodnocení TaqMan Real-Time RT-PCR – reakce interní kontroly

## Metodika detekce PSTVd (*Potato spindle tuber viroid*) v bramboru a okrasných rostlinách pomocí Real-Time RT-PCR a technologie Luminex



Obr. 11 Vyhodnocení Sybr Green Real-Time RT-PCR – reakce PSTVd

### 2.3.2 Technologie Luminex xTAG

#### 2.3.2.1 Izolace RNA z pletiva rostlin

Izolace RNA z rostlin je stejná jako u PCR (viz. 2.3.1.1).

#### 2.3.2.2 TSPE (Target-Specific Primer Extension) a molekulární hybridizaci s mikročásticemi MagPlex-TAG s následující detekcí pomocí technologie Luminex

**Technické vybavení potřebné pro TSPE a molekulární hybridizaci s mikročásticemi MagPlex-TAG s následující detekcí pomocí technologie Luminex**

- ✓ Termocykler (PTC-100, MJ Research, INC.)
- ✓ Systém Luminex AtheNA Luminex 200 Analyser (Obr. 12)
- ✓ PC + software Xponent 3.1
- ✓ Laminární RNA/DNA box (Captair Biocap RNA/DNA nebo Köttermann 8580)
- ✓ Minicentrifuga (Biosan Multi-Spin MSC-6000)
- ✓ Vortex (Techno Kartell TK3S)
- ✓ 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), multikanálová pipeta 20–200 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

## Metodika detekce PSTVd (*Potato spindle tuber viroid*) v bramboru a okrasných rostlinách pomocí Real-Time RT-PCR a technologie Luminex

---

- ✓ Magnetický separátor
- ✓ Rotační třepačka (Biosan PST-60 HL PCR)
- ✓ Mrazicí box
- ✓ Stripy (Bio-Rad)
- ✓ Mikrotitrační palety
- ✓ Jednorázové rukavice



**Obr. 12** Luminex AtheNA Luminex 200 Analyser

### Chemikálie potřebné pro TSPE a molekulární hybridizaci s mikročásticemi MagPlex-TAG s následující detekcí pomocí technologie Luminex

- ✓ Prime Diagnostics multiplex kit Posp Uni- xTAG kit (kat. č. LX0250-250/30062014)
- ✓ Směs mikročástic MagPlex-TAG [A]
- ✓ Interní kontroly (TSPE /xTAG) pro detekci Nad5 (detekce RNA) a PospUni / pUCCR (detekce generických RNA pospiviroidů).
  - Nad5 kód mikročástic: 043
  - pUCCR kód mikročástic: 063
- ✓ Směs PCR primerů (10×) [B]
- ✓ Směs primerů TSPE (20×) [C]
- ✓ SA-PE [streptavidin-R-phycoerythrin] (1000×) [D]
- ✓ RNA: Access RT PCR systém (5× AMV/Tfl pufr, 25 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM dNTP mix, AMV reverzní transkriptáza 5 U/μl, Tfl DNA polymeráza 5U/μl, dH<sub>2</sub>O) [Promega, kat. č. A1250]
- ✓ Sephadex-G50 (purifikační kolonky) [Illustra MicroSpin G-50 Columns, GE Healthcare, kat. č. 27-5330-01]
- ✓ Platinum GenoType Tsp DNA Polymerasa 5U/μl, TSPE 10× pufr, 50 mM MgCl<sub>2</sub> (místo TSPE 10× pufr lze použít 10× PCR Rxn pufr) [Invitrogen, kat. č. 11448-024]
- ✓ Biotin-14-dCTP (0,4 mM) [Invitrogen, kat. č. 19518-018]
- ✓ 20× dNTP mix (po 100 μM dATP, dGTP, dTTP): Deoxynucleotide Set, 10 mM [Sigma-Aldrich, kat. č. DNTP10-1KT]
- ✓ 2× T<sub>m</sub> hybridizační pufr (0,4 M NaCl, 0,2 M Tris, 0,16% TritonX100; pH 8,0)
- ✓ 1× T<sub>m</sub> Hybridizační pufr

## Metodika detekce PSTVd (*Potato spindle tuber viroid*) v bramboru a okrasných rostlinách pomocí Real-Time RT-PCR a technologie Luminex

---

### Vlastní postup TSPE a molekulární hybridizace s mikročásticemi MagPlex-TAG s následující detekcí pomocí technologie Luminex

#### a) Multiplex PCR reakce

##### Složení a objemy reakční směsi – na jednu reakci (25 µl)

5× AMV/Tfl pufr	5 µl (finální koncentrace 1×)
25 mM MgSO <sub>4</sub>	1 µl (finální koncentrace 1 mM)
10 mM dNTP) - mix	0,5 µl (finál. kon. 200 µM každého dNTP)
Primer PCR mix [B]	2,5 µl
5 U/µl AMV reverzní transkriptáza	0,5 µl (finální koncentrace 2,5 U)
5 U/µl Tfl DNA polymeráza	0,5 µl (finální koncentrace 2,5 U)
1 µl RNA templát	1,0 µl
dH <sub>2</sub> O	14,0 µl

##### Reakční podmínky

1×	45°C, 45 min. (reverzní transkripce)
1×	94°C, 2 min (inaktivace AMV-RT a denaturace RNA/cDNA/primeru)
40×	94°C, 30 s
	55°C, 30 s
	68°C, 60 s
1×	68°C, 5 min
1×	4°C, ∞

#### b) Purifikace PCR produktu (Illustra MicroSpin G-50 Columns)

- 1) Třepání kolonky 2 min
- 2) Povolení víčka o ¼ otáčky, odlomení spodního uzávěru
- 3) Nasazení kolonky na sběrnou zkumavku
- 4) Odstředění 735 × g, 1 min, odstranění eluátu
- 5) Přenesení kolonky na novou zkumavku a nanesení amplifikátu (25 µl)
- 6) Odstředění 735 × g, 2 min
- 7) Eluát zamrazit na -20 °C = purifikovaný PCR produkt

#### c) TSPE PCR reakce (20 µl)

10× Rxn pufr nebo 1 x TSPE pufr*	2,0 µl (finální koncentrace 1×)
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0,5 µl (finální koncentrace 1,25 mM)
20× TAG-TSPE primer mix [C]	1,0 µl (po 500 nM)
5 U/µl Tsp DNA polymeráza	0,15 µl (finální koncentrace 0,75 U)
20× dNTP mix (-dCTP)	1,0 µl (po 100 µM)
400 µM biotin -dCTP	0,25 µl (finální koncentrace 5 µM)
dH <sub>2</sub> O	10,1 µl (*nebo 10,6 µl)
purifikovaný produkt DNA z PCR 1	5 µl (bod b)

\*namísto Tsp pufru a MgCl<sub>2</sub> lze použít 10× PCR pufr Roche: 100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>  
TSPE pufr (20 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl)

**Reakční podmínky TSPE PCR**

1×	96°C, 2 min
35×	94°C, 20 s
	58°C, 30 s
	72°C, 30 s
1×	4°C, ∞

**d) Hybridizace s mikročásticemi MagPlex-TAG**

- **Příprava pracovní směsi mikročástic (25 µl/reakce)**  
(2,5 µl koncentráту částic MagPlex-TAG [A] + 22,5 µl 2× hybridizační pufr)

pracovní směs mikročástic	25 µl
TSPE PCR produkt (krok c)	5 µl ( <i>nebo 1 µl</i> )
dH <sub>2</sub> O	20 µl ( <i>nebo 24 µl</i> )

- **Reakční podmínky molekulární hybridizace**

96°C, 90 s
37°C, 30 min

**e) Příprava pro Luminex detekci**

1. Přepipetovat produkt (krok d) do mikrotitračních palet
2. Třepat na rotační třepače 5 min
3. Umístění na magnetický separátor 60 s
4. Vylití, poklepání na filtračním papíře
5. Napipetovat 100 µl 1× T<sub>m</sub> hybridizační pufr
6. Opakovat krok 2 až 5 dvakrát
7. Vylití, poklepání na filtračním papíře
8. Pipetovat 100 µl 1× T<sub>m</sub> hybridizační pufr s 1–2 µl/ml SA-PE [D]
9. Rotační třepačka 15 min
10. Magnetický separátor 60 s
11. Vylití, poklepání na filtračním papíře
12. Pipetovat 100 µl 1× T<sub>m</sub> Hybridizační pufr
13. Rotační třepačka 5 min
14. Magnetický separátor 60 s
15. Vylití, poklepání na filtračním papíře
16. Pipetovat 100 µl 1× T<sub>m</sub> hybridizační pufr
17. Rotační třepačka 5 až 10 min

**f) Analýza a vyhodnocení Luminex – program (vlastní)**

Mag PLEX	Brána: 7500–23000
Objem: 100 µl	High PMT
Čas: 200 s	

Hranice detekce (pozitivity) je trojnásobek MFI negativní kontroly (zdravá rostlina). Interní standard (*Nad5*) zařazený do testů slouží ke kontrole kvality extrahované RNA a vzniku falešně negativních výsledků.

**2.4 Příklad praktického využití**

Do pokusu bylo zařazeno 14 vzorků rostlin (*Solanum tuberosum*, *S. jasminoides*, *S. muricatum* a *Brugmansia* spp.) udržované v kolekci izolátů *in vitro* a jako skleníkové rostliny.



## Metodika detekce PSTVd (*Potato spindle tuber viroid*) v bramboru a okrasných rostlinách pomocí Real-Time RT-PCR a technologie Luminex

V následující tabulce (Tab. 2) jsou porovnány všechny diagnostické metody PSTVd v bramboru a okrasných rostlinách, kde jsou zaznamenány hodnoty Ct (Real-Time RT-PCR – SYBR Green a TaqMan) a specifické fluorescence (MFI) u technologie Luminex xTAG.

Tab. 2 Porovnání diagnostických metod PSTVd (průměrné hodnoty Ct a MFI)

Název izolátu	Real-Time RT-PCR (Ct)			Luminex xTAG (MFI)	
	SYBR Green	TaqMan	Nad5	PSTVd	Nad5
<i>Solanum tuberosum</i> cv. Russet Burbank	9,8 +	13,0 +	18,8 +	23938 +	24474 +
<i>S. jasminoides</i> 6239/51 na <i>S.t.</i> cv.Vendula	10,0 +	13,4 +	19,3 +	24515 +	25489 +
<i>S. jasminoides</i> 4791 na <i>S.t.</i> cv. Vendula	9,5 +	11,8 +	21,0 +	24183 +	24802 +
<i>S. muricatum</i> 5039/2 na <i>S.t.</i> cv. Vendula	10,5 +	13,1 +	20,1 +	24196 +	24555 +
<i>S. jasminoides</i> 4997/12-1	14,5 +	16,4 +	19,3 +	25514 +	25397 +
<i>S. jasminoides</i> 4998/4	15,7 +	18,1 +	21,6 +	24964 +	25147 +
<i>S. jasminoides</i> 5013/4	14,0 +	15,8 +	19,8 +	24495 +	24549 +
<i>S. jasminoides</i> 6239/25-26	13,7 +	15,5 +	21,5 +	26693 +	25260 +
<i>Brugmansia</i> 6150/9	14,1 +	15,9 +	20,9 +	20211 +	19336 +
<i>S. muricatum</i> 5039/2 PS	10,5 +	11,9 +	19,9 +	17697 +	16475 +
<i>S. jasminoides</i> 6239/11	13,7 +	15,7 +	22,0 +	22637 +	20981 +
<i>S. jasminoides</i> 6239/51	14,0 +	15,9 +	20,9 +	23910 +	23479 +
<i>S. muricatum</i> 5039/1	13,1 +	16,9 +	18,3 +	25481 +	24563 +
<i>S. jasminoides</i> 6239/40	14,3 +	15,3 +	21,7 +	25079 +	25118 +
pozitivní kontrola	11,2 +	13,0 +	19,5 +	25620 +	25880 +
negativní kontrola	-	32,2 -	21,3 +	1412 -	26268 +
pufr – blank	-	39,3 -	-	41 -	28 -

Z výsledků je patrné, že testované izoláty PSTVd byly všemi metodami specificky a spolehlivě detekovány. Mezi oběma variantami Real-Time RT-PCR nebyly prokázány významné rozdíly za předpokladu odpovídající melting analýzy u varianty s využitím nespecifického barviva SYBR Green. V postupu Luminex xTAG, tvořící kombinaci amplifikace a TSPE vybraného úseku genomu s navazující hybridizací s paramagnetickými částicemi, byly všechny testované izoláty PSTVd rovněž specificky a spolehlivě detekovány. Reakce interního standardu *Nad5* prokázala kvalitní extrakci RNA.

### 3 Srovnání „novosti postupů“

Vzhledem k tomu, že PSTVd je řazen do Seznamu vysoce rizikových biologických agens (vyhláška č. 474/2002 Sb.) a infekce mohou být asymptomatické (latentní infekce), jsou pro detekci a identifikaci PSTVd v rostlinách nutné exaktní a citlivé laboratorní testy. Viroidy nemohou být detekovány imunologickými metodami (např. ELISA – Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay), které se běžně využívají pro diagnostiku virů, protože nemají kódující proteiny. V metodice jsou uvedeny podrobné a ověřené laboratorní manuály

postupů detekce PSTVd, které zvýší spolehlivost jeho diagnózy a umožní rozšíření použitých metod do praxe. Metodika zahrnuje komplexní postupy od odběru vzorků, přes izolace RNA, vlastní postup přípravy reakcí, kontrolu specificity až po jejich vyhodnocení. Kvalitu extrahované RNA a vznik falešně negativních výsledků lze snadno kontrolovat pomocí interního standardu (*Nad5*) zařazeného do testů. Metoda Luminex xTAG představuje novou alternativní metodu vhodnou pro detekci a identifikaci PSTVd na molekulární úrovni s citlivostí srovnatelnou s Real-Time RT-PCR. Obě metody lze pro detekci PSTVd v pletivech okrasných rostlin a bramboru doporučit, přičemž rozhodující pro výběr bude cena a rychlost testů.

### 4 Popis uplatnění Certifikované metodiky

Certifikovaná metodika je určena pro pracoviště, která se zabývají převážně diagnostikou patogenů rostlin, především pro akreditované diagnostické laboratoře státní správy (Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský), výzkumné ústavy, šlechtitelské organizace a zemědělskou praxi (pěstitelé brambor, zeleniny a okrasných rostlin). Podrobné laboratorní protokoly uvedené v metodice mohou být využity i studenty vysokých škol při výuce fytopatologických předmětů zaměřených na diagnostické metody patogenů. V metodice jsou uvedeny podrobné optimalizované pracovní protokoly umožňující rutinní detekci PSTVd v okrasných rostlinách a bramboru pomocí exaktních metod na molekulární úrovni.

Metody Real-Time PCR (TaqMan, Sybr Green) a Luminex xTAG 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 RNA. Současně však existuje možnost výhodné aplikace systému duplex (nezbytná indikace kvality purifikace RNA pomocí interní kontroly) 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.

### 5 Ekonomické aspekty

Zavedení metodiky do rutinní laboratorní praxe (laboratoře přístrojově vybavené na molekulární metody) vyžaduje tyto náklady:

- Cena za extrakci RNA z jednoho vzorku pletiva rostlin potřebné pro Real-Time PCR a Luminex xTAG je 50–160 Kč (dle zvolené extrakční sady).
- Vlastní náklady na detekci PSTVd pomocí Real-Time RT-PCR vyjde orientačně na 120–150 Kč (TaqMan, jeden test; dle zvolené reakční sady) nebo 50–70 Kč (Sybr Green; jeden test; dle zvolené reakční sady).
- Náklady na detekci PSTVd metodou Luminex xTAG činí cca 180–200 Kč (jeden test; dle zvoleného kitu).
- Pro diagnózu je nezbytné pořízení speciálního přístrojového vybavení jako je termocykler pro Real-Time RT-PCR (400–900 tis. Kč) a systém na vyhodnocení pro Luminex xTAG (1.200 000 Kč).

Ceny jsou kalkulovány na základě nejlevnější nabídky spotřebního materiálu, nezahrnují režie a jsou bez DPH. Metoda real-time RT-PCR (zejména postup Sybr Green) je v porovnání s metodou Luminex xTAG v současnosti levnější a zejména jednodušší a rychlejší. Ekonomický přínos certifikované metodiky spolehlivé diagnostiky PSTVd zhodnotí až uživatelé, což jsou převážně šlechtitelské organizace, pěstitelé a množitelé brambor sdružené v Bramborářském kroužku a Bramborářském svazu, případně i pěstitelé zeleniny a okrasných

rostlin. Včasná a citlivá detekce PSTVd ve výchozích šlechtitelských materiálech přispěje k významnému snížení ekonomických ztrát daného podniku a dojde k zamezení dalšího přenosu. Otestování vybraných výchozích šlechtitelských materiálů pomocí citlivých exaktních metod uvedených v metodice povede k finanční úspoře cca 100 tis. Kč ročně. Nález PSTVd by vedl k ekonomickým ztrátám způsobeným neprodejností infikovaného materiálu, ztrátě důvěry a konkurenceschopnosti podniku.

## **6 Seznam použité související literatury**

- Agindotan, B. & Perry, K. L. (2008). Macroarray detection of eleven potato-infecting viruses and Potato spindle tuber viroid. *Plant Disease*, 92 (5): 730–740.
- Beemster, A. B. R. & de Bokx, J. A. (1987). Survey of properties and symptoms. In: de Bokx, J. A., & van der Want, J. P. H. (eds). *Viruses of Potatoes and Seed-potato Production* (pp. 84–113) Pudoc, Wageningen.
- Boonham, N.; Pérez, L. G.; Mendez, M. S.; Peralta, E. L.; Blockley, A.; Walsh, K.; Barker, I. & Mumford, R. A. (2004). Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of Potato spindle tuber viroid. *Journal of Virological Methods*, 116: 139–146.
- Bostan, H.; Nie, X. & Singh, R. P. (2004). An RT-PCR primer pair for the detection of pospiviroid and its application in surveying ornamental plants for viroids. *J. Virol. Methods*. 116: 189–193.
- Botermans, M.; van de Vossenbergh, B. T. L. H.; Verhoeven, J. Th. J.; Roenhorst, J. W.; Hooftman, M.; Dekter, R. & Meekes, E. T. M. (2013). Development and validation of a real-time RT-PCR assay for generic detection of pospiviroids. *Journal of Virological Methods*, 187: 43–50.
- CABI. n.d. Invasive species compendium. Datasheet for Potato spindle tuber viroid. Walingford, UK, CABI. Available at <http://www.cabi.org/isc/datasheet/43659> (last accessed 23 February 2018).
- De Bokx, J. A. & Pirone, P. G. (1981). Transmission of Potato spindle tuber viroid by aphids. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 87: 31–34.
- Diener, T. O. (1979). *Viroid and Viroid Diseases*. John Wiley and Sons. Inc., New York.
- Diener, T. O. (1987). *The Viroids*. New York, USA: Plenum Press.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). (2004). Diagnostic protocols for regulated pests. PM 7/33. Potato spindle tuber viroid. *EPPO Bulletin*.
- Fernow, K. H.; Peterson, L. C. & Plaisted, R. L. (1970). Spindle tuber virus in seeds and pollen of infected plants. *American Potato Journal*, 47: 75–80.
- Grasmick, M. E. & Slack, S. A. (1985). Symptom expression enhanced and low concentrations of potato spindle tuber viroid amplified in tomato with high light intensity and temperature. *Plant Disease*, 69: 49–51.
- Gross, H. J.; Domdey, H.; Lossow, D.; Jank, P.; Raba, M.; Alberty, H. & Sängler, H. L. (1978). Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Nature*, 273, 203–208.
- Hailstones, D. L.; Tesoriero, L. A.; Terras, M. A. & Dephoff, C. (2003). Detection and eradication of *Potato spindle tuber viroid* in tomatoes in commercial production in New South Wales, Australia. *Australasian Plant Pathology*, 32: 317–318.
- Hammond, R. W. & Owens, R. A. (2006). Viroids: New and continuing risks for horticultural and agricultural crops. APSnet. St Paul, MN, American Phytopathological Society (APS). Available at <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/Viroids.aspx> (last accessed 10 December 2017).

## Metodika detekce PSTVd (*Potato spindle tuber viroid*) v bramboru a okrasných rostlinách pomocí Real-Time RT-PCR a technologie Luminex

---

- Jeffries, C. & James, C. (2005). Development of EU protocol for the detection and diagnosis of *Potato spindle tuber pospiviroid*. *Bulletin OEPP/EPPO*, 35. s., 125–132.
- Jeffries, C. (1998). *Technical guidelines for the safe movement of germplasm*. No. 19. Potato. Rome, FAO/IPGRI. 177 pp.
- Lebas, B. S. M.; Clover, G. R. G.; Ochoa-Corona, F. M.; Elliott, D. R.; Tang, Z. & Alexander, B. J. R. (2005). Distribution of *Potato spindle tuber viroid* in New Zealand glasshouse crops of capsicum and tomato. *Australian Plant Pathology*, 34: 129–133.
- Luigi, M.; Costantini, E.; Luison, D.; Mangiaracina, P.; Tomassoli, L. & Faggioli, F. (2014). A diagnostic method for the simultaneous detection and identification of pospiviroids. *Journal of Plant Pathology*, 96: 1, 151–158.
- Mackie, A. E.; McKirdy, S. J.; Rodoni, B. & Kumar, S. (2002). Potato spindle tuber viroid eradicated in Western Australia. *Australasian Plant Pathology*, 31: 311–312.
- Matoušek, J.; Orctová, L.; Ptáček, J.; Patzak, J.; Dědič, P.; Steger, G. & Riesner, D. (2007). Experimental transmission of *Pospiviroid* populations to weed species characteristic for potato and hop fields. *Journal of Virology*, 81: 11891–11899.
- Menzel, W.; Jelkmann, W. & Maiss, E. (2002). Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods*, 99, 81–92.
- Mertelik, J.; Kloudova, K.; Cervena, G.; Necekalova, J.; Mikulkova, H.; Levkanicova, Z.; Dedic, P. & Ptacek, 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.
- Mičuda, S.; Fuksa, L.; Brčáková, E.; Cermanová, J. & Geršl, V. (2006). *Molekulárně biologické metodiky ve farmakologii*. [Cit. 21. 9. 2011]. Dostupné na [www: http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/micuda/real-PCR.htm](http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/micuda/real-PCR.htm).
- Monger, W.; Tomlinson, J.; Boonham, N.; Marn, M. V. & Plesko, I. M. (2010). Development and inter-laboratory evaluation of real-time PCR assays for the detection of pospiviroids. *J. Virol. Methods.*, 169: 207–210. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.07.002.
- Navarro, B.; Silletti, M. R.; Trisciuzzi, V. N. & Di Serio, F. 2009. Characterization of Potato spindle tuber viroid infecting tomato in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 91: 723–726.
- Owens, R. A. & Diener, T. O. (1981). Sensitive and rapid diagnosis of potato spindle tuber viroid disease by nucleic acid hybridization. *Science*, 213: 670–672.
- Owens, R. A. & Verhoeven, J. Th. J. (2009). Potato spindle tuber. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2009-0804-01.
- Palukaitis, P. (1987) Potato spindle tuber viroid: investigation of the long-distance, intra-plant transport route. *Virology*, 158, 239-241.
- Pfaffl, M., W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29 (9): 2002–2007.
- Raclavský, V. (2003). *Metody molekulární genetiky*. [cit. 23. 9. 2011]. Dostupné na [www: http://biologie.upol.cz/metody/](http://biologie.upol.cz/metody/).
- Roehorst, J. W.; Jansen, C. C. C.; Kox, L. F. F.; Haan, E. G.; Bovenkamp, G. W. van den; Boonham, N.; Fisher, T. & Mumford, R. A. (2005). Application of real-time RT-PCR for large-scale testing of potato for Potato spindle tuber pospiviroid. *Bulletin OEPP*, 35 (1): 133–140.
- Salazar, L. F.; Querci, M.; Bartolini, I. & Lazarte, V. (1995). Aphid transmission of potato spindle tuber viroid assisted by potato leafroll virus. *Fitopatologia*, 30: 56–58.
- Shamloul, A. M.; Hadidi, A.; Zhu, S. F.; Singh, R. P. & Sagredo, B. (1997). Sensitive detection of potato spindle tuber viroid using RT-PCR and identification of a viroid variant



- naturally infecting pepino plants. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19 (1): 89–96; 36 ref.
- Singh, R. P. & Kurz, J. (1997). RT-PCR analysis of PSTVd aphid transmission in association with PLRV. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19: 418–424.
- Singh, R. P. (1970). Seed transmission of potato spindle tuber virus in tomato and potato. *American Potato Journal*, 47: 225–227.
- Singh, R. P. (1973). Experimental host range of the potato spindle tuber virus. *American Potato Journal*, 50: 111–123.
- Singh, R. P.; Boucher, A. & Somerville, T. H. (1992). Detection of potato spindle tuber viroid in the pollen and various parts of potato plant pollinated with viroid-infected pollen. *Plant Disease*, 76: 951–953.
- Singh, R. P.; Ready, K. F. M. & Nie, X. (2003). Viroids on solanaceous species. In Hadidi, A.; Flores, R.; Randles, J. W. & Semancik, J. eds. *Viroids*, pp. 125–133. Melbourne, Australia, CSIRO Publishing. 392 pp.
- Syller, J.; Marczewski, W. & Pawlowicz, J. (1997). Transmission by aphids of potato spindle tuber viroid encapsidated by potato leafroll luteovirus particles. *European Journal of Plant Pathology*, 103, 285–289.
- Tiberini, A. & Barba, M. (2012). Optimization and improvement of oligonucleotide microarray-based detection of tomato viruses and pospiviroids. *Journal of Virological Methods*, 185 (1): 43–51.
- Tsutsumi, N.; Yanagisawa, H.; Fujiwara, Y. & Ohara, T. (2010). Detection of Potato spindle tuber viroid by Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification. *Research Bulletin of the Plant Protection Service, Japan*, 46: 61–67.
- Vejl, P. (1997). *Polymerázová řetězová reakce*. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze.
- Verhoeven, J. T. J.; Jansen, C. C. C.; Willems, T. M.; Kox, L. F. F. & Owens, R. A. (2004). Natural infections of tomato by Citrus exocortis viroid, Columnea latent viroid, Potato spindle tuber viroid and Tomato chlorotic dwarf viroid. *Eur J Plant Pathol*, 110: 823–831.
- Verhoeven, J. Th. J.; Hüner, L.; Virscek Marn, M.; Mavric Plesko, I. & Roenhorst, J. W. (2010). Mechanical transmission of Potato spindle tuber viroid between plants of *Brugmansia suaveolens*, *Solanum jasminoides*, potatoes and tomatoes. *European Journal of Plant Pathology*, 128: 417–421.

## **7 Seznam vybraných publikací, které předcházely metodice**

- 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, 28-31 May 2013, Antalya – Turkey. Abstracts p. 23. ppt. Presentation.
- Dědič, P.; Kmoch, M. & Krpálková, A. (2016). Alternativní metody a postupy laboratorní diagnózy *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus*. Certifikovaná metodika. Výzkumný ústav bramborářský, Poradenský svaz "Bramborářský kroužek Praktické informace č. 60. Certifikační orgán ÚKZÚZ, osvědčení 6700/2016-MZE-17221 ze dne 10. 2. 2016. ISBN: 978-80-86940-68-7.

- Dědič, P.; Kmoch, M. & Mertelík, J. (2016). Detection of PSTVd originating from ornamental plants by qRT-PCR and Luminex xTAG technology. 16th EAPR Virology section meeting, 8th Annual meeting of PVY-Wide organization, May 31 – Jun 3, 2016, Ljubljana, Slovenia. Abstracts p. 79.
- Kmoch, M. & Dědič, P. (2015). Molekulární metody detekce viroidu vřetenovitosti hlíz bramboru (Potato spindle tuber viroid, PSTVd). *Úroda*, 12, LXIII, vědecká příloha, s. 195-198. ISSN 0139-6013.
- Kmoch, M. & Dědič, P. (2015). Nové možnosti citlivé detekce viroidu vřetenovitosti hlíz bramboru (Potato spindle tuber viroid, PSTVd). XX. Česká a Slovenská konference o ochraně rostlin, Praha, 1.-3.9.2015. Sborník abstraktů. s. 20.
- Kmoch, M.; Holková, L. & Pokorný, R. (2012). Hodnocení infekce obilnin patogeny rodu *Fusarium* pomocí kvantitativní PCR. *Úroda*, 9: 99–103. ISSN 0139-6013.
- 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.
- 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.
- Šíp, M.; Bystřická, D.; Kmoch, S.; Nosková, L.; Hartmannová, H. & Dědič, P. (2010). Detection of viral infections by means of an oligonucleotide microarray. *J of Virological Methods*, 165: 64–70.

## Metodika detekce PSTVd (*Potato spindle tuber viroid*) v bramboru a okrasných rostlinách pomocí Real-Time RT-PCR a technologie Luminex

---

**Název titulu:** Metodika detekce PSTVd (*Potato spindle tuber viroid*) v bramboru a okrasných rostlinách pomocí Real-Time RT-PCR a technologie Luminex  
Certifikovaná metodika

**Autoři:** Ing. Martin Kmoch, Ph.D.  
Ing. Petr Dědič, CSc.

**Vydavatel:** Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s. r. o., Dobrovského 2366, CZ-580 01 Havlíčkův Brod., Česká republika

**Vydání:** První, 2018

**Počet stran:** 29

**Náklad:** 200 ks

**Tisk:** Tiskárna Havlíčkův Brod

Text neprošel jazykovou úpravou.

ISBN: 978-80-86940-79-3

© Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o., 2018

*Publikace nesmí být přetiskována vcelku nebo po částech, přenášena nebo uváděna do oběhu pomocí elektronických, mechanických, fotografických či jiných prostředků bez výslovného souhlasu autorů.*