



# Metodika detekce Y viru bramboru (*Potato virus Y*) v listech a hlízách pomocí metod založených na PCR

Ing. Martin Kmoch Ph.D. a Ing. Petr DĚDIČ, CSc.

CERTIFIKOVANÁ METODIKA  
**2020**

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

## KOLEKTIV AUTORŮ

Ing. Martin Kmoč, Ph.D. – Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o. .... (80%)

Ing. Petr Dědič, CSc. – Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o. .... (20%)

## OPONENTI

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

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Odbor diagnostiky

Šlechtitelů 773/23, 779 00 Olomouc 9

e-mail: 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

Metodika byla vypracovaná v rámci podpory od Ministerstva zemědělství ČR na rozvoj výzkumné organizace MZe-RO1619 „Dlouhodobý koncepční rozvoj VÚB – Trvale udržitelné systémy produkce kvalitních brambor“.

V certifikované metodice byly využity izoláty Y viru bramboru pocházející ze Sbírkky fytopatogenních virů bramboru (Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o.), která je součástí Národního programu genetických zdrojů mikroorganismů a drobných živočichů hospodářského významu.

Publikaci bylo Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským uděleno osvědčení o uznání metodiky UKZUZ 224027/2020, vydané se souhlasem Odboru vědy, výzkumu a vzdělávání MZe.

## OBSAH

<b>1. CÍL METODIKY</b> .....	4
<b>2. VLASTNÍ POPIS METODIKY</b> .....	4
2.1 Úvod .....	4
2.2 Podstata použitých diagnostických metod .....	7
2.3 Vlastní postup .....	11
2.3.1 Izolace RNA z pletiv .....	11
2.3.2 PCR reakce .....	14
2.3.3 Vyhodnocení real-time RT-PCR reakce .....	19
2.4 Příklad praktického využití .....	22
<b>3. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“</b> .....	26
<b>4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY</b> .....	27
<b>5. EKONOMICKÉ ASPEKTY</b> .....	28
<b>6. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY</b> .....	29
<b>7. SEZNAM VYBRANÝCH PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE</b> .....	31

# Metodika detekce Y viru bramboru (*Potato virus Y*) v listech a hlízách pomocí metod založených na PCR

## 1. CÍL METODIKY

Cílem certifikované metodiky bylo optimalizovat molekulárně-biologické laboratorní metody detekce a determinace hospodářsky nejvýznamnějšího viru lilku bramboru (*Solanum tuberosum* L.), tj. Y viru bramboru (*Potato virus Y* – PVY). Použité metody založené na PCR (TaqMan real-time RT-PCR a SybrGreen real-time RT-PCR) zvýší citlivost detekce PVY v listech a hlízách bramboru, zajistí vyšší spolehlivost diagnostiky a významně urychlí výsledky. Protokoly byly optimalizovány pro použití v běžné diagnostické laboratoři vybavené zařízením pro molekulární biologii.

## 2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

### 2.1 ÚVOD

Brambory (*Solanum tuberosum* L.) jsou významnou zemědělskou plodinou, množenou vegetativně, u níž je infekce viry velkým problémem. Nejvýznamnější je Y virus bramboru (*Potato virus Y* – PVY), který negativně ovlivňuje produkci brambor po celém světě snížením výnosů a kvality hlíz (Singh *et al.*, 2008). Infikované rostliny bramboru obvykle tvoří menší hlízy (obr. 6) a produkují méně škrobu (Beczner *et al.*, 1984; Valkonen, 2007). Nolte *et al.* (2004) zaznamenal průměrný pokles výnosu hlíz 0,18t na ha pro každé 1% zvýšení infekce. Genom PVY je charakterizován pozitivní jednořetězcovou RNA o velikosti  $\approx 9,7$  kb (Adams *et al.*, 2012). PVY patří do druhé největší čeledi rostlinných virů *Potyviridae* a dělí se do třech hlavních kmenů (PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>O</sup> a PVY<sup>C</sup>) podle jejich sérologických (Romancer *et al.*, 1994), molekulárních (Glais *et al.*, 2002; Nie *et al.*, 2003) a biologických vlastností (systémové nebo lokální příznaky na *Nicotiana tabacum* a odolnosti *S. tuberosum*). Kmeny PVY<sup>N</sup> a PVY<sup>O</sup> se v Evropě rekombinovaly a vytvořily PVY<sup>N:O</sup> (= PVY<sup>N-wi</sup>) a PVY<sup>NTN</sup> (Boonham *et al.*, 2002). PVY se přenáší prostřednictvím infikovaných sadbových hlíz, které jsou hlavním zdrojem infekce (Valkonen, 2007). Používání certifikovaného sadbového materiálu je stěžejní v jeho omezování (Tennant *et al.*, 2015). Tento způsob přenosu je zodpovědný za globální šíření kmenů PVY, protože většina

bramborářských regionů sadbové brambory dováží z jiných oblastí. Během vegetačního období se PVY přenáší neperzistentně mšicemi z infikovaných rostlin na zdravé rostliny (primární infekce) (Brunt, 2001). Nejvýznamnějším vektorem PVY je mšice broskvoňová (*Myzus persicae*). S přenosem viru jsou rovněž spojeny ale jiné mšice, tj. m. maková (*Aphis fabae*), m. bavníková (*Aphis gossypii*), m. řešetláková (*Aphis nasturtii*), *Myzus ceres*, m. chmelová (*Phorodon humuli*) a kyjatka zahradní (*Macrosiphum euphorbiae*) (Halbert *et al.*, 2003). PVY má středně široký okruh hostitelských rostlin z několika čeledí, mezi které patří čeleď Solanaceae, která zahrnuje důležité hospodářské plodiny – brambor, tabák (*Nicotiana* spp.), rajče (*Solanum lycopersicum*), paprika (*Capsicum* spp.), jakož i plevele – lilek potměchuť (*Solanum dulcamara*), lilek černý (*S. nigrum*), šrucha zelná (*Portulaca oleracea*) (Jeffries, 1998; Boukhris-Bouhachem *et al.*, 2007). PVY napadá i některé okrasné rostliny z rodu *petunia* (*Petunia* spp.) a jiřina (*Dahlia* spp.) (Jeffries, 1998). Experimentálně je virus schopný napadnout přibližně 500 rostlinných druhů z různých čeledí (Kerlan, 2006).

PVY vytváří na rostlinách bramboru různé symptomy. Příznaky napadení a jejich intenzita na nadzemních částech rostlin se liší v závislosti na kmenu PVY, vnímavosti genotypu bramboru, podmínkách prostředí, času infekce a typu infekce (primární a sekundární). Některé kmeny PVY (PVY<sup>N-wi</sup> a PVY<sup>N:O</sup>) způsobují u většiny odrůd bramboru jen slabé příznaky nebo netvoří žádné příznaky (Warren *et al.*, 2005). Na listech bramboru vyvolává PVY mozaiku (obr. 1, 2) s různou závažností (mírná a těžká), kadeřavost (obr. 3), drsnost, zakrnělost a nekrózu (skvrny, kroužky, žilková). Na stoncích způsobují některé kmeny PVY nekrózu (obr. 4).

Obr. 1: Mozaika na listu bramboru



Obr. 2: Mozaika na listu bramboru





Obr. 3: Symptomy kadeřavosti



Obr. 4: Nekróza stonku bramboru



Při infekci může rovněž docházet k opadu a poklesu spodních listů a systémovým nekrotám. Některé kmeny PVY, hlavně PVY<sup>NTN</sup>, způsobují u citlivých odrůd nekrotickou kroužkovitost hlíz bramboru, PTNRD (Potato Tuber Necrotic Ringspot Disease) (obr. 5), která se objevuje při sklizni nebo během skladování. Nekrotická kroužkovitost je charakteristická protáhlými prstenci a oblouky s pozdější povrchovou nekrotizací.

Obr. 5: (a, b) Nekrotická kroužkovitost hlíz bramboru (PTNRD)



Odrůdy bramboru se výrazně liší v úrovni tolerance kmenům a variantám PVY. Některé genotypy jsou citlivé, jiné mohou být asymptomatické nebo vykazovat velmi mírné příznaky, a přesto je u nich zaznamenáno stejné snížení výnosu jako u odrůd s viditelnými symptomy. Asymptomatické genotypy jsou zodpovědné za zvýšení zdrojů inokula PVY v oblastech pěstování brambor (Karasev et Gray, 2013).

Závažnost infekce PVY se zvyšuje u smíšených infekcí s jinými viry, tj. *Potato virus X* – PVX (čeleď *Alphaflexiviridae*, rod *Potexvirus*) nebo *Potato virus S* – PVS (čeleď *Betaflexiviridae*, rod *Carlavirus*) (Kerlan, 2006; Valkonen, 2007).

Obr. 6: Redukce velikosti a počtu hlíz bramboru po infekci různými kmeny PVY v porovnání s kontrolou (zdravou rostlinou – levý horní roh)



V současné době je možno pro detekci a identifikaci PVY v pletivech bramboru využít celou řadu laboratorních metod s různou časovou náročností, citlivostí a spolehlivostí, do kterých řadíme molekulární postupy.

## 2.2 PODSTATA POUŽITÝCH DIAGNOSTICKÝCH METOD

### Polymerázová řetězová reakce (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 dvouřetězovce 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)<sup>1</sup>, což umožňuje nasednutí primerů na specifická místa DNA. Na dvouvláknové úseky DNA-primer se váže DNA polymeráza.

<sup>1</sup>  $T_m$  (melting temperature) primerů – teplota při které tvoří 50 % molekul DNA primerů dvouvláknovou strukturu a 50 % jednovláknovou strukturu  $T_m = 2 °C \times (A+T) + 4 °C \times (G+C)$ , optimální teplota annealingu by měla být 5 °C pod  $T_m$ .

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 PCR se cyklicky opakují. Pro dostatečnou amplifikaci původní molekuly DNA obvykle postačuje 30 cyklů. V případě, že na začátku byla ve vzorku pouze jedna 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 (qPCR)

Real-time PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) metoda je založena na klasické PCR s tím rozdílem, že termocykler 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).

PCR probíhá v následujících fázích:

- **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

Typická amplifikační křivka (Obr. 7) má esovitě zakřivený tvar a lze ji rozdělit na 3 části:

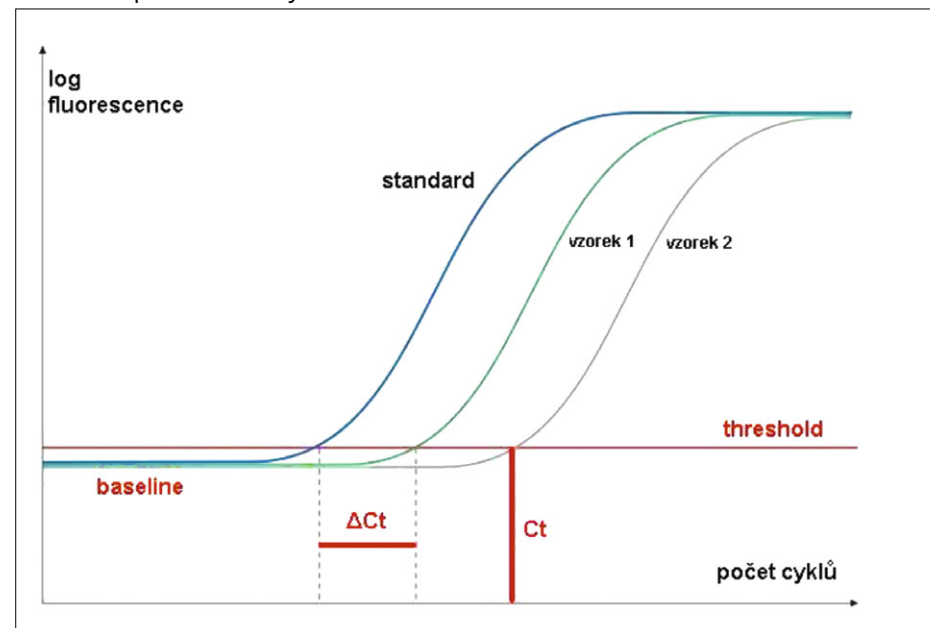
- 1) „**background**“ fázi kdy je amplifikátu tak málo, že jeho fluorescence ještě nedosahuje měřitelných hodnot
- 2) **exponenciální fázi**, kdy množství produktu exponenciálně roste (trvá asi 4–8 cyklů)
- 3) **lineární fázi** (množství produktu přibývá lineárně)

4) **plateau fázi**, 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 template molekul bylo přítomno ve vzorku na počátku reakce (Mičuda *et al.*, 2006; Raclavský, 2003).

Detekce probíhá při real-time PCR 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.

Obr. 7: Amplifikační křivky

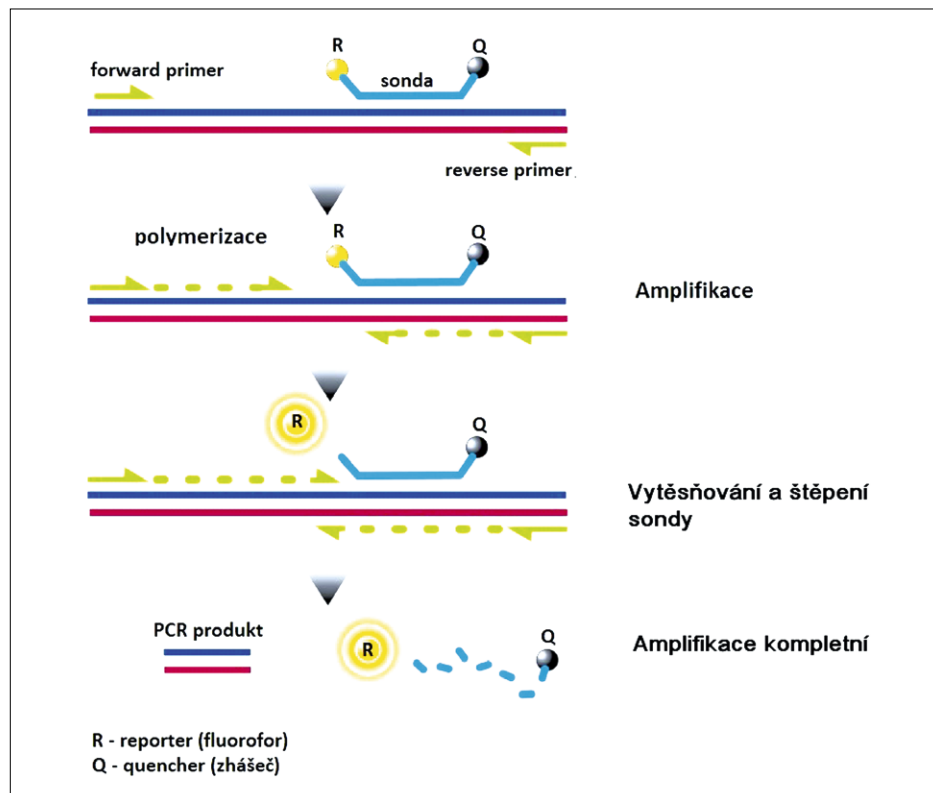


Kvantifikace DNA se provádí prostřednictvím matematické analýzy amplifikačních křivek vzniklých vnesením naměřené fluorescence oproti pořadovému číslu příslušného cyklu. Pro detekci PCR produktů lze využít nespecifické fluorescenční barvivo (SYBR® Green real-time PCR) nebo specifické sondy (TaqMan real-time PCR).

## SYBR Green real-time PCR

Pro detekci PCR produktů se nejčastěji využívá nespecifické interkalační barvivo SYBR® Green I., které se během cyklů váže na vznikající ds DNA. Vazbou na DNA se aktivuje – emituje fluorescenční záření, které je průběžně snímáno a vyhodnocováno. Nárůst fluorescenčního signálu vidíme na obrazovce jako narůstající křivku.

Obr. 8: Princip TaqMan real-time PCR



## TaqMan real-time PCR

Pro detekci PCR produktů lze použít kromě barviva SYBR® Green specifické sondy (průby), nejčastěji TaqMan. Kromě primerů se do reakce vkládá další oligonukleotid, který dosedá na amplifikovaný úsek. Tento oligonukleotid je na jednom konci označený fluorescenční značkou (fluorofor) a na druhém konci nese tzv. zhášec (quencher) (obr. 8). Pokud je fluorescenční látka v těsné

blízkosti zhášče, je její fluorescence potlačena. Vlastní PCR probíhá obvyklým způsobem až do okamžiku, kdy DNA polymeráza při syntéze nového řetězce narazí na fluorescenčně značený nukleotid (sondu). V tom okamžiku jej začne vytěšňovat z templátového vlákna a štěpí jej. Tím se uvolní fluorescenční sonda do roztoku a je možné měřit fluorescenci v průběhu amplifikace. Intenzita fluorescence je úměrná množství nasyntetizovaného PCR produktu (Mičuda *et al.*, 2006; Raclavský, 2003).

## 2.3 VLASTNÍ POSTUP

### 2.3.1 Izolace RNA z pletiv

Odebraný vzorek listů bramboru (100 mg) nebo slupek hlíz (korunková část, 25 mg) se homogenizuje v tekutém dusíku a potřebná RNA se dále extrahuje pomocí extrakční sady. Po extrakci se ve vzorcích změří 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 pletiv bramboru a pro její uchování

- Zásobní nádoba na tekutý dusík (Dewarova nádoba)
- Pracovní nádoba na tekutý dusík
- Laboratorní analytické váhy (Mettler AE 160) – na případné navážky vzorků
- Skalpel nebo ostrý nůž, pinzeta (odběr vzorku)
- Třecí misky s tloučky
- Jednorázové rukavice
- Centrifuga s otáčkami  $\geq 12\ 000$  rpm, s rotorem na plastové mikrozku-  
mavky 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 s filtrem
- Plastové mikrozku-  
mavky 1,5 ml a 2,0 ml (Eppendorf)
- Spektrofotometr (NanoDrop 2000c, případně Perkin Elmer MBA 2000)
- Mrazicí box ( $-20$  °C)
- Hlubokomrazicí box ( $-80$  °C) – pro dlouhodobé skladování vzorků

## Chemikálie potřebné pro izolaci RNA z pletiv bramboru

- Tekutý dusík
- Extrakční kit – InviTrap® Spin Plant RNA Mini Kit (Invitrogen, kat. č. 1064100300)
- $\beta$ -merkaptoetanol (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 (inhibitory RNáz) – doporučené

## Postup izolace RNA z pletiv 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
- 48 ml etanolu do Wash Buffer R2
- Přidat  $\beta$ -merkaptoetanol 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)!

- Navážit 100 mg vzorku listů nebo 25 mg slupky hlíz bramboru (korunková část) a homogenizovat (rozetřít) pomocí tloučku v třecí misce za použití tekutého dusíku (pro kvalitní homogenizaci je nutno misky s tloučky důkladně předem namrazit).
- Do mikrozkuhavky (1,5 ml) napipetovat 900  $\mu$ l Lysis Solution DCT a 9  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptoetanolu ( $\beta$ -ME).
- Přenést homogenizovaný vzorek do 1,5 ml mikrozkuhavky (homogenizovaný vzorek nesmí roztát mimo lyzační pufr s  $\beta$ -ME!).
- Mikrozkuhavky zavřít a důkladně promíchat (vortex).

- Inkubovat vortexem promíchanou směs 30 min při pokojové teplotě (*lyze buněk*).
- Centrifugovat 1 min při max. otáčkách ( $\geq 12\,000$  rpm).
- Supernatant opatrně přenést do kolonky Prefilter umístěné v 2,0 ml záchytné mikrozkuhavce Receiver Tube, centrifugovat 1 min/10 000 rpm (*purifikace lyzátu, odstranění zbytků buněk a sraženiny*).
- Odstranit kolonku Prefilter a přidat do filtrátu 500  $\mu$ l etanolu (96–100 %) a promíchat důkladně pipetou (částečné vysrážení RNA).
- Napipetovat (přelit) 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 RNA v závislosti na koncentraci solí a dalších faktorech*), vylít filtrát a vrátit RTA Spin Filter zpět do RTA Receiver Tube.
- Opakovat krok i) se zbývající částí vzorku – nanést zbytek lyzátu na stejnou kolonu.
- Přidat pipetou 500  $\mu$ l Wash Buffer R1 do RTA Spin Filter a centrifugovat 1 min/10 000 rpm (*promývání kolonky*), vylít filtrát.
- Pipetovat 700  $\mu$ l Wash Buffer R2 do RTA Spin Filter a centrifugovat 30 s/10 000 rpm (*promývání kolonky*), vylít filtrát.
- Opakovat krok l).
- Pro odstranění stop etanolu centrifugovat 3 min/12 000 rpm, vyhodit RTA Receiver Tube.
- 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) (*eluce RNA*).
- 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).
- Zamrazit vzorky (při –20 °C, pro dlouhodobé uchování při –80 °C).



## 2.3.2 PCR reakce

### 2.3.2.1 Real-time RT-PCR

#### Technické vybavení potřebné pro real-time RT-PCR

- Termocykler (Mx3005P qPCR System – Agilent Technologies) (Obr. 9)
- Počítač – 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 premixu
- 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)

Obr. 9: Termocykler Mx3005P qPCR



- Autokláv – sterilizace špiček, pipet, mikrozkušavek (Stolní laboratorní autokláv OT 032)
- Chladicí podložka nebo polyesterová nádoba na led
- PCR destičky – 96 jamek (Bio-Rad)
- Jednorázové rukavice

#### Chemikálie potřebné pro real-time RT-PCR

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

Tab. 2: Sekvence použitých primerů a TaqMan sond pro PVY a interní kontrolu (*Nad5*)

Název primeru	Sekvence primeru, sondy (5´-3´)	Poznámka
PVY-1 FP	CCA ATC GTT GAG AAT GCA AAA C	Singh <i>et al.</i> (2013)
PVY-1 RP	ATA TAC GCT TCT GCA ACA TCT GAG A	
PVY-1 Probe	(FAM) TTA GGC AAA TCA TGG CAC AT (BHQ1)	
<i>Nad5</i> -F	GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT	Menzel <i>et al.</i> (2002)
<i>Nad5</i> -R	CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA	
<i>Nad5</i> -P	(HEX) AGG ATC CGC ATA GCC CTC GAT TTA TGT G (BHQ1)	Botermans <i>et al.</i> (2013)

(*Nad5* – NADH dehydrogenase subunit 5)

#### Před zahájením přípravy PCR reakce nutno připravit:

- Naředit primery a sondu na pracovní koncentraci (10  $\mu$ M) pomocí RNase-free dH<sub>2</sub>O
- Rozpustit na ledu primery a sondu (pokud jsou již naředěné)
- Rozpustit 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, ztvortexují, odebere se požadované množství
- rozmrazené vzorky RNA se udržují při 0 °C na ledu, před odebráním určeného množství se vždy promíchají
- premix se udržuje při 0 °C na ledu nebo chladicí podložce
- pracuje se ve sterilních podmínkách (předcházení kontaminace reakcí)

### Příprava reakční směsi (premixu)

Nejprve se do mikrozkušavky (1,5 ml) připraví tzv. premix (namíchaná reakční směs pro všechny hodnocené vzorky bez RNA). 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). Reakce probíhaly v duplikátech pro eliminaci chybných výsledků. 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.

### Složení a objemy reakční směsi pro PVY 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) – PVY ..... 1,2 µl (finál. konc. 600 nM)
- PCR Reverse Primer (10 µM) – PVY ..... 1,2 µl (finál. konc. 600 nM)
- TaqMan Probe (10 µM) – PVY ..... 0,48 µl (finál. konc. 240 nM)
- PCR Forward Primer (10 µM) – *Nad5* ..... 1,2 µl (finál. konc. 600 nM)
- PCR Reverse Primer (10 µM) – *Nad5* ..... 1,2 µl (finál. konc. 600 nM)
- TaqMan Probe (10 µM) – *Nad5* ..... 0,64 µl (finál. konc. 320 nM)
- ROX Reference Dye II (50×) ..... 0,4 µl

- RNase Free dH<sub>2</sub>O ..... 1,88 µl
- RNA (5–10 ng/µl) ..... 1,0 µl

#### Sybr Green real-time RT-PCR:

- 2× One Step SYBR® RT-PCR Buffer IV ..... 10 µl (finál. konc. 1×)
- PrimeScript™ 1 step Enzyme Mix II ..... 0,8 µl
- PCR Forward Primer (10 µM) ..... 0,8 µl (finál. konc. 400 nM)
- PCR Reverse Primer (10 µM) ..... 0,8 µl (finál. konc. 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) ..... 1,5 µl

\*RNA analyzovaných vzorků se upraví na stejnou koncentraci.

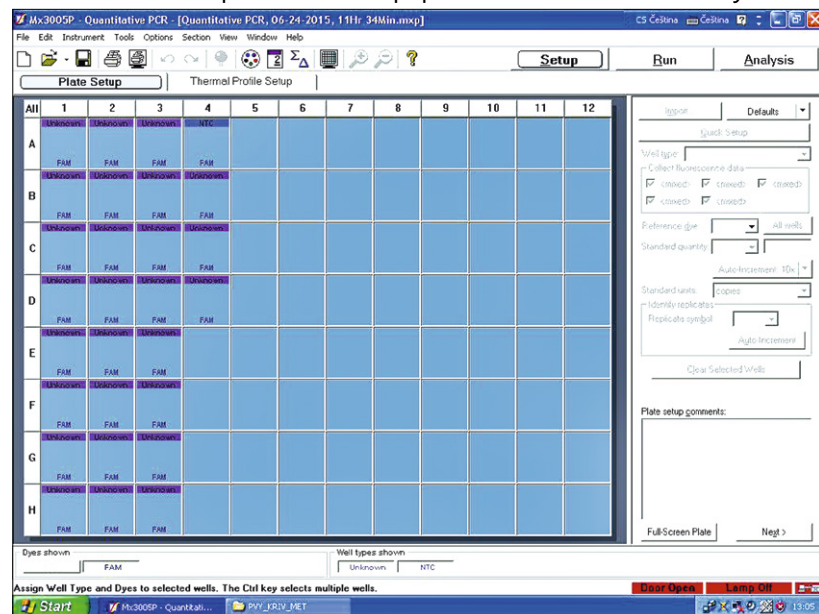
#### Nanesení reakční směsi (premixu) na destičku (96 jamek)

- Ze zásobního reakčního mixu se napipetuje do každé jamky na destičce určené množství 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 nebo zalepí samolepicí fólií.
- 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.

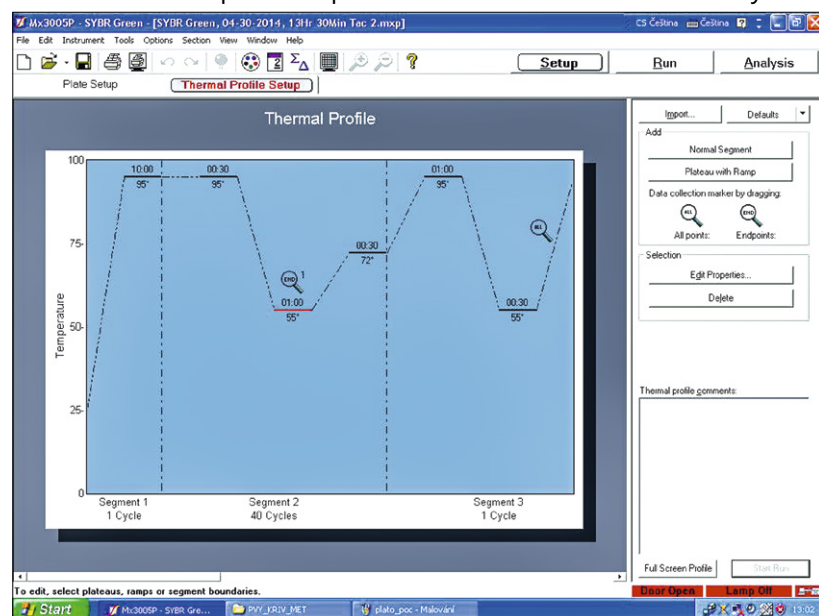
#### Nastavení pozice vzorků, popis vzorků a nastavení protokolu podmínek PCR reakcí

Reakce se provede v termocykleru Mx3005P qPCR System. Nastavení pozice vzorků v jednotlivých jamkách PCR-destičky (obr. 10), popis vzorků a nastavení protokolu podmínek PCR reakcí (obr. 11) se provede v příslušném softwaru. Při použití jiného typu termocykleru se může vzhled a používání software lišit.

Obr. 10: Nastavení pozice vzorků a popis vzorků v softwaru termocyklieru



Obr. 11: Nastavení protokolu podmínek PCR reakcí v softwaru termocyklieru



## Reakční podmínky pro PVY a interní kontrolu (*Nad5*)

### TaqMan real-time RT-PCR:

- 1× 42 °C, 7 min (reverzní transkripce, přepis RNA na cDNA)
- 1× 95 °C, 30 s (počáteční denaturace)
- 40× 95 °C, 10 s (denaturace)
- 60 °C, 60 s (*annealing* primerů)
- 72 °C, 5 s (syntéza nového řetězce DNA)

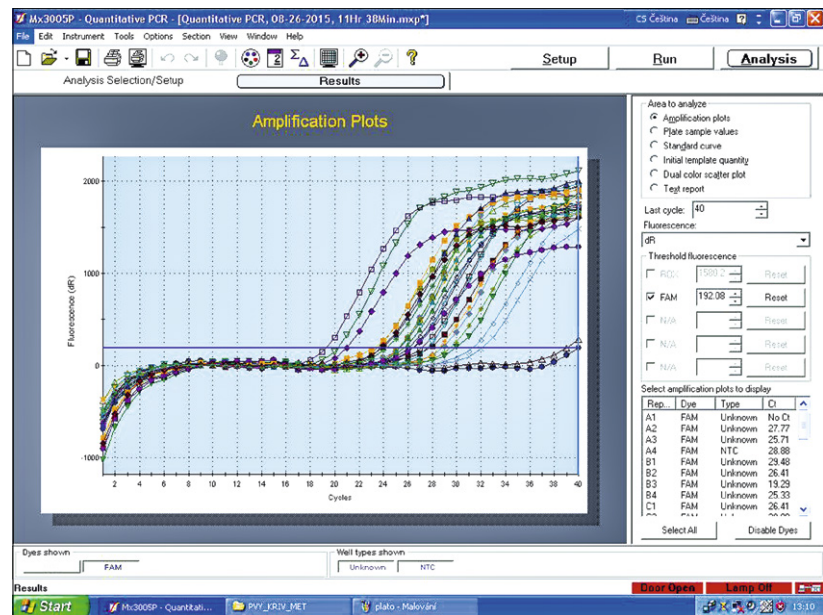
### Sybr Green real-time RT-PCR:

- 1× 42 °C, 10 min (reverzní transkripce, přepis RNA na cDNA)
- 1× 95 °C, 20 s (počáteční denaturace)
- 40× 95 °C, 10 s (denaturace)
- 60 °C, 30 s (*annealing* primerů)
- 72 °C, 10 s (syntéza nového řetězce DNA)
- 1× 95 °C, 30 s (*melting analyse*: 60 °C až 95 °C)
- 60 °C, 60 s
- 95 °C, 30 s

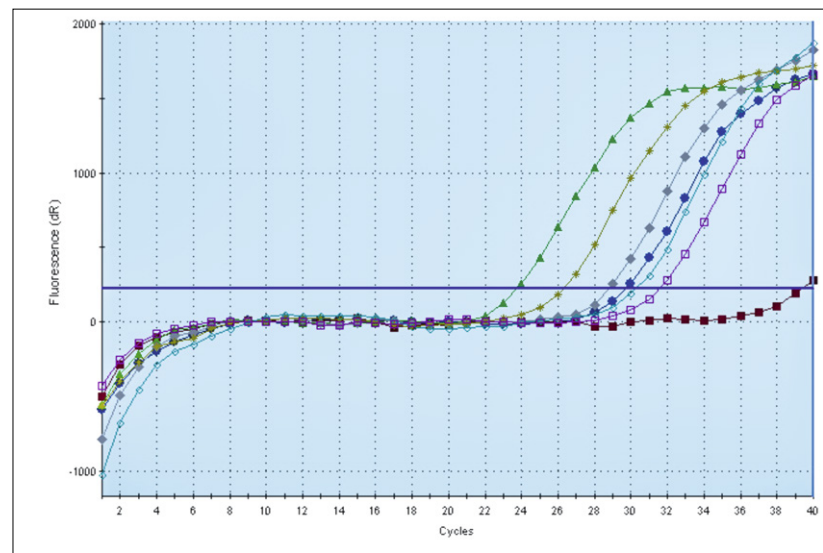
## 2.3.3 Vyhodnocení real-time RT-PCR reakce

Na základě hodnot  $C_T$  (Threshold cycle) sledovaných vzorků, pozitivní kontroly (standard), interní kontroly (*Nad5*) a negativní kontroly (zdravá rostlina) se vyhodnotí real-time RT-PCR reakce (obr. 12 až 16). Stanoví se, zda je testovaný vzorek daného druhu rostliny negativní nebo pozitivní na PVY. Veškeré hodnoty  $C_t$  nižší než 35 jsou považovány za pozitivní. Vzorky na hranici detekce ( $C_t = 35$ ) musí být překontrolovány opakovaním PCR reakce. Vzorek s  $C_t$  hodnotou vyšší než 35 (tj. 36 a více) je automaticky považován za negativní. Interní standard (*Nad5*) zařazený do testů ( $C_t \approx 20$ ) 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*) (obr. 15).

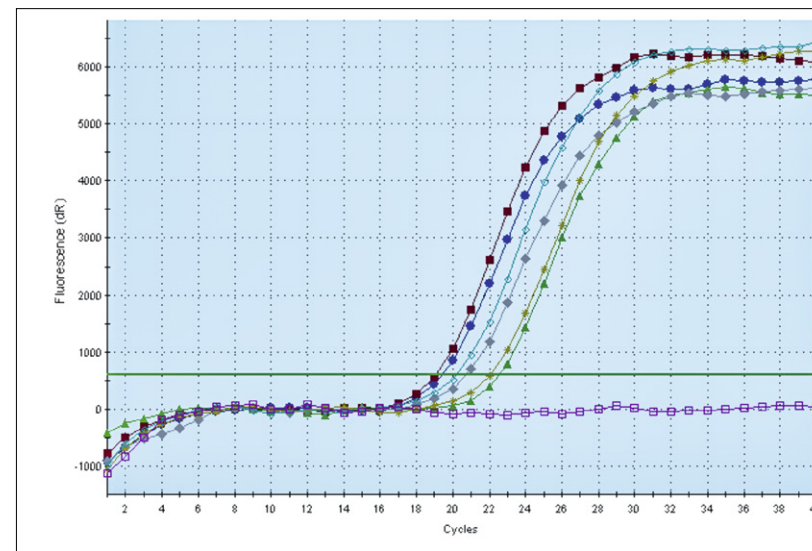
Obr. 12: Detekce PVY v sadbových hlízách bramboru metodou TaqMan real-time RT-PCR



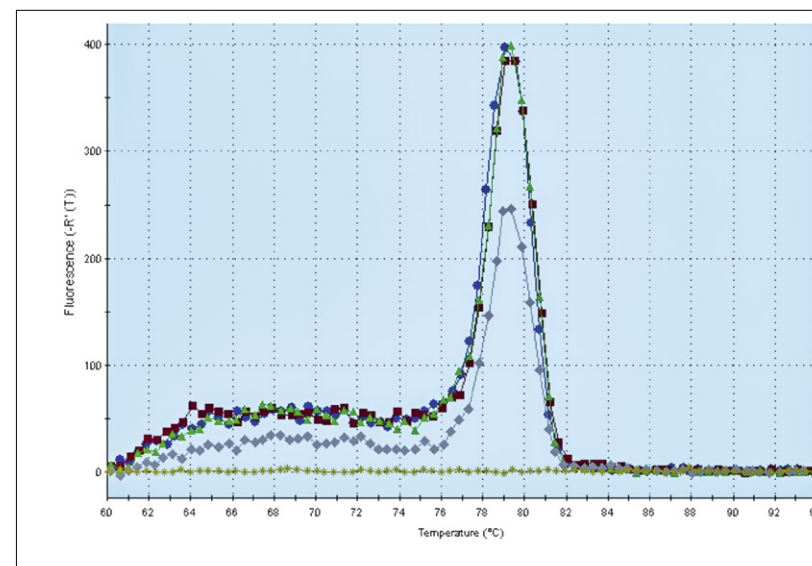
Obr. 13: Detekce PVY v sadbových hlízách bramboru metodou TaqMan real-time RT-PCR



Obr. 14: Reakce vnitřního standardu *Nad5* zařazeného do duplex TaqMan real-time RT-PCR

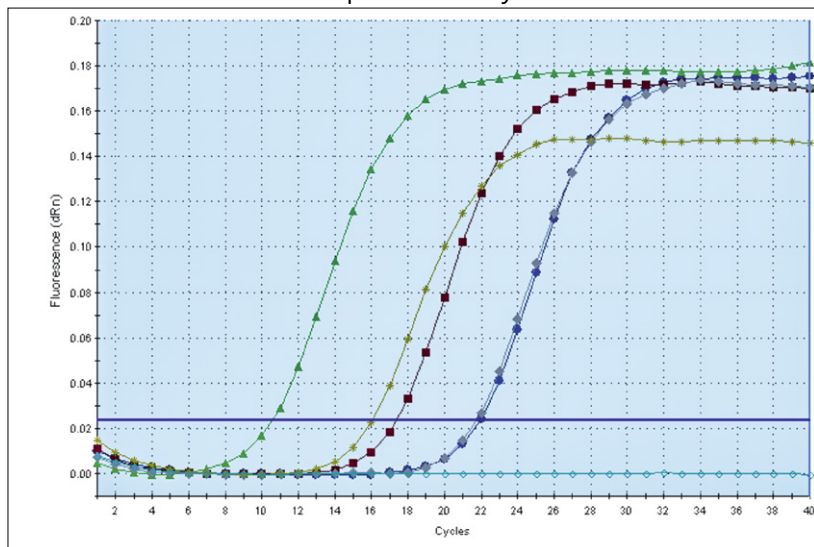


Obr. 15: Detekce PVY v listech bramboru metodou Sybr Green real-time RT-PCR – disociační křivky





Obr. 16: Detekce PVY v listech bramboru metodou Sybr Green real-time RT-PCR – amplifikační křivky



## 2.4 PŘÍKLAD PRAKTICKÉHO VYUŽITÍ

Do experimentů byly zařazeny rostliny bramboru (*Solanum tuberosum* L.) s pozitivní detekcí PVY, tj. kmeny PVY<sup>o</sup>, PVY<sup>NTN</sup> a PVY<sup>Wilga</sup> na odrůdě ‚Rosara‘. Kmeny byly determinovány na základě jejich sérologických (ELISA) a biologických vlastností (systémové nebo lokální příznaky na *Nicotiana tabacum* a odolnosti *S. tuberosum*). Negativní rostliny byly odrůdy ‚Verne‘. Díky relativně vysoké finanční náročnosti metod založených na PCR nelze testovat každou jednotlivou hlízu, resp. rostlinu zvlášť (obvykle 100 až 200 hlíz), jak je tomu u metody ELISA, a proto je nezbytné tento vzorek rozdělit na podvzorky (bulky). Díky tomu stoupá riziko zkreslení výsledků neodhalením všech napadených hlíz díky možné snížené citlivosti použité metody vniklé nařaděním. Při extrakci RNA, zvláště při použití silikagelových kolonek komerčních extrakčních sad, vyvstává riziko jejich ucpávání bobtnavým škrobem, kterého hlízy bramboru obsahují velké množství. Z tohoto důvodu je nezbytné optimalizovat hmotnost navážky vzorku, aby nedocházelo k jejímu předimenzování a následnému ucpávání kolonek. Při těchto potížích může docházet k extrakci RNA o nízké kvalitě a kvantitě a následná PCR analýza může potom vykazovat falešně negativní výsledky. Z výše uvedených problémů vycházely experimenty. Pro zjištění optimální hmotnosti navážky byla testována navážka 25, 50 a 100 mg. Hlízy bram-

boru byly nejprve omyty vodou pro odstranění zbytků půdy a následně nechány oschnout na filtračním papíře. Z každé hlízy byl odebrán pomocí skalpelu segment slupky z korunkové části. Segmenty byly přeneseny do třecí misky (10 až 80 segmentů) a homogenizovány za použití tekutého dusíku. Z homogenátu bylo odebráno 25 až 100 mg pro následnou extrakci RNA pomocí silikagelových kolonek. Při testování pro následnou certifikaci např. v akreditovaných laboratořích se odebírají hlízy pro analýzy bez ohledu, zda jsou příznakové nebo bezpříznakové (vybere se reprezentativní vzorek z dané partie o velikosti 100 až 200 hlíz). Po extrakci byla ověřena kvalita a kvantita a pomocí spektrofotometru a určena nejhodnější navážka (tj. 25 mg). Pro správný průběh PCR reakcí byla stanovena koncentrace primerů a sond. Dalším úkolem bylo zjištění hranice detekce a zjištění citlivosti optimalizované PCR metody. Pro toto zjištění byla vytvořena ředící řada složená z odebraných segmentů slupky pozitivních a negativních vzorků bramboru, tj. 1 : 1, 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40 a 1 : 80.

Tab. 3: Detekce PVY v sadbových hlízách bramboru pomocí TaqMan real-time RT-PCR (průměrné hodnoty)

Testovaný vzorek	CT (threshold cycle)			
	PVY		Interní standard	
2/194 (PVY <sup>Wilga</sup> )	14,3	+	19,6	+
2/032 (PVY <sup>o</sup> )	15,4	+	20,3	+
2/186 (PVY <sup>o</sup> )	18,0	+	20,5	+
2/047 (PVY <sup>NTN</sup> )	18,3	+	19,8	+
2 (PVY <sup>Wilga</sup> )	15,8	+	19,1	+
3 (PVY <sup>o</sup> )	17,2	+	18,9	+
4 (PVY <sup>NTN</sup> )	18,3	+	19,6	+
5 (PVY <sup>o</sup> )	14,8	+	19,3	+
6 (PVY <sup>NTN</sup> )	15,3	+	20,8	+
7 (PVY <sup>Wilga</sup> )	17,9	+	19,5	+
8 (PVY <sup>NTN</sup> )	19,4	+	20,1	+
9 (PVY <sup>o</sup> )	18,6	+	19,7	+
10 (PVY <sup>NTN</sup> )	17,5	+	20,2	+
11 (PVY <sup>NTN</sup> )	15,7	+	19,3	+
12 (PVY <sup>o</sup> )	14,1	+	20,4	+
13 (PVY <sup>o</sup> )	16,3	+	19,3	+
14 (PVY <sup>NTN</sup> )	17,1	+	19,9	+
15 (PVY <sup>o</sup> )	16,6	+	20,5	+
16 (PVY <sup>Wilga</sup> )	17,4	+	19,1	+



Tab. 3: (pokračování)

Testovaný vzorek	CT (threshold cycle)			
	PVY		Interní standard	
17 (PVY <sup>NTN</sup> )	15,2	+	20,2	+
18 (PVY <sup>O</sup> )	14,6	+	20,5	+
19 (PVY <sup>NTN</sup> )	15,3	+	18,8	+
20 (PVY <sup>NTN</sup> )	17,1	+	20,1	+
21 (PVY <sup>NTN</sup> )	18,2	+	19,4	+
29 (zdravá rostlina) K <sup>-</sup>	36,1	-	20,6	+
6/002 (zdravá rostlina) K <sup>-</sup>	37,4	-	20,4	+
Blank (pufr)	-	-	-	-

Na základě všech provedených analýz byly všechny testované vzorky zařazené do experimentů specificky a spolehlivě detekovány (tab. 3). Po vyhodnocení ředící řady byly veškeré hodnoty C<sub>t</sub> nižší než 35 považovány za pozitivní a vyšší za negativní. Pro multiplex PCR reakce je vždy nezbytná optimalizace koncentrací primerů a sond. Po provedení PCR reakcí s různými poměry množství primerů a sond byla stanovena jejich optimální finální koncentrace, tj. 600 nM každého primeru pro PVY, 240 nM TaqMan sondy pro PVY a 600 nM každého primeru pro vnitřní standard (*Nad5*), 320 nM TaqMan sondy pro vnitřní standard.

Tab. 4: Detekce PVY v listech a dormantních hlízách bramboru pomocí TaqMan real-time RT-PCR (průměrné hodnoty Ct)

Ředění	Detekce v listech				Detekce v hlízách			
	PVY		<i>Nad5</i>		PVY		<i>Nad5</i>	
1 (všechny PVY)	16,3	+	19,5	+	25,8	+	19,3	+
1 : 10	20,5	+	20,4	+	28,6	+	20,8	+
1 : 20	21,4	+	20,1	+	29,5	+	19,5	+
1 : 40	22,5	+	19,8	+	30,9	+	21,1	+
1 : 80	22,8	+	20,6	+	31,9	+	20,8	+
K <sup>-</sup> (zdravá rostlina)	36,2	-	19,8	+	36,9	-	19,5	+
Blank (pufr)	-	-	-	-	-	-	-	-

Výsledky ředící řady (tab. 4) dále ukázaly velmi vysokou citlivost použité real-time PCR metody. Z výsledků je patrné, že testované izoláty PVY byly 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. Kvalita RNA a případná inhibice real-time RT-PCR reakcí byla kontrolována zařazením vnitřního standardu (*Nad5*) do PCR. Reakce interního standardu *Nad5* prokázala kvalitní extrakci RNA. Použitý postup extrakce nukleových kyselin pomocí silikagelových kolonek byl vhodný pro získání RNA z hlíz bramboru o odpovídajících parametrech. Jako optimální navážka bylo stanoveno 25 mg vzorku. Při vyšších navážkách docházelo k ucpávání kolonek. Z hlediska kvality a kvantity RNA potřebné do PCR je výběr správného postupu extrakce RNA z pletiv bramboru stěžejní a ovlivňuje exaktnost následných PCR analýz. Hlavním omezením pro použití diagnostických technik založených na PCR je výskyt falešně negativních výsledků kvůli nežádoucímu účinku inhibitorů PCR, reagentiím nebo dysfunkci termocyklieru (Abu Al-soud *et Rådström*, 1998; Malorny *et al.*, 2004). Problémy může potencionálně způsobit kompetitivní amplifikační účinek, kdy velké množství jednoho DNA produktu inhibuje amplifikaci jiných DNA produktů (Boivin *et al.*, 2004). K ověřování negativních reakcí slouží tzv. vnitřní standard (Pater-son, 2006), protože PCR může být inhibována přítomností polysacharidů a fenolických sloučenin obsažených v hlízách bramboru (van der Wolf *et al.*, 2001).

Tab. 5: Porovnání TaqMan real-time RT-PCR a SybrGreen real-time RT-PCR

Testovaný vzorek	TaqMan real-time	SybrGreen real-time RT-PCR
1 (všechny PVY)	+	+
1 : 10	+	+
1 : 20	+	+
1 : 40	+	+
1 : 80	+	+
K <sup>-</sup> (zdravá rostlina)	-	-
Blank (pufr)	-	-

### 3. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“

Infekce brambor viry byla v minulosti kontrolována pouze pomocí vizuální diagnózy, která sloužila i jako základ pro certifikaci sadby. Existuje však mnoho faktorů, které omezují její spolehlivost. V posledních desetiletích se stal vážným problémem výskyt nových izolátů PVY, které jsou výsledkem mutací a rekombinací genomu původních kmenů PVY<sup>O</sup> a PVY<sup>N</sup>. Nové izoláty mají tendenci ke slabšímu projevu onemocnění, tzn., vytváří mírné příznaky nebo asymptomatické infekce (Van Hoof, 1980; Karasev *et al.*, 2013). Neopomenutelná je i rozdílnost ve vnímavosti jednotlivých genotypů bramboru k PVY. Díky výše uvedeným skutečnostem je identifikace nemocných rostlin bramboru během vegetace pomocí vizuální kontroly (např. selekce) nesmírně obtížná, a proto má rozhodující význam laboratorní testování. V současnosti využívaná metoda ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), založená na interakci mezi antigenem a specifickými protilátkami, je relativně levná, jednoduchá, dostatečně citlivá a použitelná pro rutinní screening. Bohužel testy ELISA nejsou spolehlivé při testování PVY v dormantních hlízách bramboru, protože jeho koncentrace jsou v nich příliš nízké. Z tohoto důvodu je testování prováděno na listech, případně klíčcích (Gugerli *et al.*, 1980). K odstranění dormance, která brání klíčení hlíz po sklizni, se používají fytohormony, tj. kyselina gibberelová a cytokininy (Hartmann *et al.*, 2011) a bromoethan nebo rindit (McDonald *et al.*, 1988). Ačkoliv to vede ke spolehlivějším výsledkům, testování je nákladné z důvodu potřeby vytápěných skleníků a značné časové náročnosti. Díky zmíněným chemickým aplikacím pro odstranění dormance hlíz jsou výsledky testů známé až za 8 až 10 týdnů po dodání sklizených hlíz do laboratoře. V našich podmínkách se sadba brambor sklízí od začátku září do poloviny října. Některé země však požadují sadbu již v říjnu až listopadu, a proto je zřejmé, že ELISA testy nejsou dostatečně rychlé.

Vzhledem k uvedeným problémům nabývají na významu molekulárně-biologické metody, mezi něž patří postupy založené na PCR. Metoda PCR spojená s reverzní transkripcí (RT-PCR) se stala účinnou pro detekci virů brambor dokonce i v dormantních hlízách. I když je RT-PCR technicky náročnější, vyžaduje vyšší úroveň odborných znalostí a je nákladnější než ELISA (potřebné chemikálie a přístrojové vybavení jsou dražší), umožňuje detekci velmi nízkých koncentrací virů. RT-PCR se považuje za 100násobně citlivější než tradiční ELISA (Mumford *et al.*, 2004). Analýza konečného produktu pomocí gelové elektroforézy je relativně časově náročná a neumožňuje automatizaci. Pro detekci

PVY v pletivech bramboru lze využít real-time RT-PCR (qPCR), která umožňuje navíc kvantifikaci viru. Hlavní výhodou metody je absence analýzy výsledných produktů pomocí gelové elektroforézy. Vzhledem k tomu, že ELISA vyžaduje pro testování PVY vyklíčení hlíz (nárůst listů) a výsledky jsou známy zhruba za osm až deset týdnů, real-time RT-PCR nabízí rychlou alternativu pro sériovou detekci PVY v dormantních hlízách bramboru, která poskytuje výsledky během dvou až tří dnů. Vzhledem k tomu, že lze provádět detekci viru přímo v hlízách, odpadá potřeba skleníkových prostor pro nárůst listů potřebných pro metodu ELISA. Real-time RT-PCR je velmi citlivá metoda detekce. Pro testování podvzorků (bulků) je real-time RT-PCR plně spolehlivá při výskytu jedné infikované hlízy v deseti. Za předpokladu, že pravděpodobnost detekce jedné infikované hlízy v podvzorku deseti hlíz je stejná jako detekce jedné infikované hlízy, pokud není v 18 bulcích po deseti hlízách zjištěn virus, existuje velmi vysoká pravděpodobnost, že hladina viru ve vzorcích není větší než 4 %.

V metodice jsou uvedeny podrobné ověřené a optimalizované laboratorní manuály postupů detekce PVY v pletivech bramboru pomocí real-time RT-PCR, které zahrnují odběr vzorků, izolaci RNA, vlastní postup přípravy reakcí, kontrolu specifity a vyhodnocení výsledků. Kvalitu extrahované RNA a vznik možných falešně negativních výsledků lze snadno kontrolovat pomocí interního standardu (*Nad5*) zařazeného do testů.

### 4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Validované a optimalizované molekulární metody diagnostiky PVY v listech a hlízách bramboru (tj., Sybr Green a TaqMan real-time RT-PCR) uvedené v metodice jsou v současnosti velmi perspektivní nejen z hlediska citlivosti, specifity a rychlosti detekce, ale i lepší záruky eliminace nežádoucích technických chyb. S ohledem na tyto přednosti lze předpokládat jejich širší uplatnění například v kontrolní praxi. Certifikovaná metodika je určena pro pracoviště, která se zabývají diagnostikou patogenů rostlin, především pro akreditované diagnostické laboratoře státní správy, šlechtitelské organizace, výzkumné ústavy a zemědělskou praxi (pěstitelé a množitelé brambor sdružené v Bramborářském kroužku a Bramborářském svazu). Podrobné laboratorní protokoly uvedené v metodice mohou sloužit studentům středních a vysokých škol při výuce fytopatologických předmětů zaměřených na diagnostické metody patogenů.

## 5. EKONOMICKÉ ASPEKTY

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

- Pro detekci PVY je nezbytné pořízení speciálního přístrojového vybavení, jako je termocykler pro real-time RT-PCR (400–900 tis. Kč)
- Cena za extrakci RNA z jednoho vzorku pletiva bramboru potřebné pro real-time PCR je 50–160 Kč (dle zvolené extrakční sady).
- Vlastní náklady na detekci PVY pomocí real-time RT-PCR jsou 100–140 Kč (TaqMan, jeden test; dle zvolené reakční sady) nebo 20–50 Kč (Sybr Green; jeden test; dle zvolené reakční sady).

Ceny jsou kalkulovány na základě nejlevnější nabídky spotřebního materiálu, nezahrnují režie a jsou bez DPH. Metoda Sybr Green real-time RT-PCR je v současnosti levnější z důvodu absence sondy. S využíváním real-time RT-PCR lze očekávat významné urychlení výsledků testů a úsporu nákladů z důvodu odstranění potřeby napěstování rostlin ve skleníkových prostorech, které vyžaduje metoda ELISA.

Včasná a citlivá detekce PVY pomocí real-time RT-PCR ve výchozích šlechtitelských materiálech přispěje k eliminaci infekce zamezením dalšího přenosu a tím ke snížení ekonomických ztrát dané šlechtitelské organizace. Otestování vybraných výchozích šlechtitelských materiálů pomocí real-time RT-PCR povede k finanční úspoře cca 200 tis. Kč ročně dané včasným záchytem a eliminací pozitivního materiálu. Izolace virus prostých materiálů patří mezi klíčové úkoly ve šlechtitelství.

Používání zdravé sadby je jedním z významných faktorů pro zvýšení produkce. Infekce pocházející z infikovaných sadbových hlíz (sekundární infekce) způsobuje nejvýznamnější snížení výnosů. Při napadení rostlin PVY dochází k 10 až 80% redukci výnosu hlíz, která může být zesílena v kombinaci s dalšími druhy virů. Při snížení výnosu konzumních brambor jenom o 10% by vznikla zemědělským podnikům při současných průměrných cenách ekonomická ztráta 20–40 tis. Kč/ha. Při snížení výnosu sadbových hlíz o 10% vznikne ekonomická ztráta cca 20 tis. Kč/ha. Vysoká infekce PVY vede dále k „sestupnění“ nebo zamítnutí sadbových materiálů, což znamená další významné ekonomické ztráty pro zemědělské podniky zaměřené na produkci sadby. Zdravý sadbový materiál patří k nejdůležitějším způsobům eliminace virů.

## 6. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- Abu Al-Soud, W. – Rådström, P. (1998). Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (10): 3748–3753.
- Adams, M.J. – Zerbini, F.M. – French, R. – Rabenstein, F. – Stenger, D.C., et al. (2012). Potyviridae. In: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. (eds) Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego, California and London, s. 1069–1089.
- Bechner, L. – Horváth, J. – Romhány, I. – Forster, H. (1984). Studies on the Etiology of Tuber Necrosis Ringspot Disease in Potato. *Potato Res.*, 27: 339–352.
- Boivin, G. – Côté, S. – Déry, P. – De Serres, G. – Bergeron, M.G. (2004). Multiplex real-time PCR assay for detection of influenza and human respiratory syncytial viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (1): 45–51.
- Boonham, N. – Walsh, K. – Preston, S. – North, J. – Smith, P. – Barker, I. (2002). The detection of tuber necrotic isolates of *Potato Virus Y*, and the accurate discrimination of PVY<sup>0</sup>, PVY<sup>N</sup> and PVY<sup>C</sup> strains using RT-PCR. *J. Virol. Meth.*, 102: 103–112.
- 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.
- Boukhris-Bouhachem, S. – Hullé, M. – Rouzé-Jouan, J. – Glais, L. – Kerlan, C. (2007). *Solanum elaeagnifolium*, a potential source of *Potato virus Y* (PVY) propagation. OEPP/EPPO Bulletin, 37: 125–128.
- Brunt, A. A. (2001). The Main Viruses Infecting Potato Crops. In: “Virus and Virus-like Diseases of Potatoes and Production of Seedpotatoes”, (Ed.): G. Loebenstein, P. H. Berger, A. A. Brunt, R. H. Lawson, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, s. 65–67.
- Glais, L. – Tribodet, M. – Kerlan, C. (2002). Genomic variability in *Potato Potyvirus Y* (PVY): evidence that PVY<sup>NW</sup> and PVY<sup>NTN</sup> variants are single to multiple recombinants between PVY<sup>0</sup> and PVY<sup>N</sup> isolates. *Arch. Virol.*, 147: 363–378.
- Gugerli, P. – Gehriger, W. (1980). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of *Potato leafroll virus* and *Potato virus Y* in potato tubers after artificial break of dormancy. *Pot. Res.*, 23: 353–359.
- Hafsa, A.B. – Nabi, N. – Zellama, M.S. – Chaouachi, M. (2018). NGS Data screening of *Potato virus Y* infection: The near-complete sequence of Tunisian PVY isolate characterized from potato leaves sample. *Journal of Research in Biological Sciences*, 3: 63–69.
- Halbert, S.E. – Corsini, D.L. – Wiebe, M.A. (2003). *Potato virus Y* transmission efficiency for some common aphids in Idaho. *Amer. J. Pot. Res.*, 80: 87–91.
- Hartmann, A. – Senning, M. – Hedden, P. – Sonnewald, U. – Sonnewald, S. (2011). Reactivation of meristem activity and sprout growth in potato tubers require both cytokinin and gibberellin. *Plant Physiology*, 155 (2): 776–796.
- Jeffries, C.J. (1998). Potato. FAO/IPGRI Technical, Guidelines for the Safe Movement of Germplasm (19): 62–63.
- Karasev, A.V. – Gray, S.M. (2013) Genetic diversity of *Potato virus Y* complex. *American Journal of Potato Research*, 90: 7–13.
- Kerlan, C. (2006). *Potato virus Y*. AAB descriptions of plant viruses, no 414. Available at <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=414>.
- Malorny, B. – Paccassoni, E. – Fach, P. – Bunge, C. – Martin, A. – Helmuth, R. (2004). Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (12): 7046–7052.

- McDonald, J.G. – Coleman, W.K. (1988). A reevaluation of bromoethane in comparison to rindite for the post-harvest detection of *Potato virus Y* in tubers by ELISA. *American Journal of Potato Research*, 65 (9): 547–550.
- 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.
- Mumford, R.A. – Fisher, T. – Elmore, J. – Vickers, D. – Swan, H. – Walsh, K. – Barker, I. – Boonham, N. (2004). The development of a routine direct tuber testing method as a rapid and reliable alternative to the traditional growing-on test. 12th EARP Virology Section Meeting Rennes, France, 2004: abstracts of oral presentations and poster presentation. Available: <http://www.rennes.inra.fr/eapr2004/abstracts.htm>.
- Nie, X.Z. – Singh, R.P. (2002). Probable geographical grouping of PVY<sup>N</sup> and PVY<sup>NTN</sup> based on sequence variation in P1 and 5'-UTR of PVY genome and methods for differentiating North American PVY<sup>NTN</sup>. *J. Virol. Meth.*, 103: 145–156.
- Nolte, P. – Whitworth, J.L. – Thornton, M.K. – McIntosh, C.S. (2004). Effect of seed-borne *Potato virus Y* on performance of Russet Burbank, Russet Norkotah and Shepody potatoes. *Plant Disease*. 88: 248–252.
- Paterson, R.R.M. (2006). Internal amplification controls have not been employed in fungal PCR hence potential false negative results. *J. Appl. Microbiol.*, 102: 1–10.
- Romancer, M.L. – Kerlan, C. – Nedellec, M. (1994). Biological characterisation of various geographical isolates of *Potato virus Y* inducing superficial necrosis on potato tubers. *Plant Pathol.*, 43: 138–144.
- Singh, M. – Singh, R.P. – Fageria, M.S. – Nie, X. – Coffin, R. – Hawkins, G. (2013). Optimization of a Real-Time RT-PCR Assay and its Comparison with ELISA, Conventional RT-PCR and the Grow-out Test for Large Scale Diagnosis of *Potato virus Y* in Dormant Potato Tubers. *Am. J. Potato Res.*, 90: 43–50.
- Singh, R.P. – Valkonen, J.P.T. – Gray, S.M. – Boonham, N. – Jones, R.A.C. *et al.* (2008). The naming of *Potato virus Y* strains infecting potato. *Archives of Virology*, 153: 1–13.
- Tennant, P. – Fermin, G. (2015). Virus diseases of tropical and subtropical crops. The University of the West Indies, Mona, Jamaica. ISBN 9781780644264.
- Valkonen, J.P.T. (2007). Viruses: economical losses and biotechnological potential. In: Vreugdenhil, D. – Bradshaw, J. – Gebhardt, C. – Govers, F. – Mackerron, D.K.L. *et al.* (eds) *Potato Biology and Biotechnology Advances and Prospects*. Elsevier, Oxford, United Kingdom, s. 619–641.
- Van der Wolf, J.M. – van Beckhoven, J.R.C.M. – Bonanats, P.J.M. – Schoen, C.D. (2001). New technologies for sensitive and specific routine detection of plant pathogenic bacteria. in: *Plant Pathogenic Bacteria*, De Boer, S.H. ed. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands. s. 77–79.
- Van Hoof, H.A. (1980). Aphid vectors of *Potato virus Y*<sup>N</sup>. *Neth. J. Pl. Path.*, 86: 159–162.
- Warren, M. – Krüger, K. – Schoeman, A.S. (2005). *Potato virus Y* (PVY) and *Potato leaf roll virus* (PLRV): Literature review for potatoes South Africa. Department of Zoology and Entomology, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, University of Pretoria.

## 7. SEZNAM VYBRANÝCH PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- 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. In: 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. Havlíčkův Brod: 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. In: 16th EAPR Virology section meeting, 8th Annual meeting of PVY-Wide organization, May 31 – Jun 3, 2016, Ljubljana, Slovenia. Abstracts. s. 79.
- Kmoch, M. – Dědič, P. (2015). Molekulární metody detekce viroidu vřetenovitosti hlíz bramboru (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd). *Úroda*, LXIII (12, vědecká příloha): 195–198. ISSN 0139-6013.
- Kmoch, M. – Dědič, P. (2015). Nové možnosti citlivé detekce viroidu vřetenovitosti hlíz bramboru (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd). In: XX. Česká a Slovenská konference o ochraně rostlin, Praha, 1.-3.9.2015. Sborník abstraktů. s. 20.
- Kmoch, M. – Dědič, P. (2018). Metodika detekce PSTVd (*Potato spindle tuber viroid*) v bramboru a okrasných rostlinách pomocí Real-Time RT-PCR a technologie Luminex. Certifikovaná metodika (osvědčení UKZUZ 155885/2018). První vydání. Havlíčkův Brod: Výzkumný ústav bramborářský. ISBN 978-80-86940-79-3.
- Kmoch, M. (2018). Detekce PVY (*Potato virus Y*) v listech a hlízách bramboru pomocí TaqMan real-time RT-PCR. *Úroda* LXVI (12, vědecká příloha): 205–208. ISSN 0139-6013.
- Kmoch, M. (2019). Zjišťování přítomnosti PVY (*Potato virus Y*) v sadbových hlízách bramboru pomocí real-time RT-PCR. In: Osivo a sadba - XIV. národní odborný a vědecký seminář: sborník referátů. Praha: Česká zemědělská univerzita, katedra rostlinné výroby, s. 144–149. ISBN 978-80-213-2732-0.
- Šíp, M. – Bystrická, D. – Kmoch, S. – Nosková, L. – Hartmannová, H. – Dědič, P. (2010). Detection of viral infections by means of an oligonucleotide microarray. *Journal of Virological Methods*, 165: 64–70.





**VÝZKUMNÝ ÚSTAV  
BRAMBORÁŘSKÝ  
HAVLÍČKŮV BROD**

Řada PRAKTICKÉ INFORMACE – číslo 82

**METODIKA DETEKCE Y VIRU BRAMBORU (*POTATO VIRUS Y*)  
V LISTECH A HLÍZÁCH POMOCÍ METOD ZALOŽENÝCH NA PCR**

Certifikovaná metodika (osvědčení UKZUZ 224027/2020).

Metodika byla uplatněna v roce 2020.

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

Text neprošel jazykovou úpravou.

Vydání první. Náklad: 50 výtisků.

Obrázky: archiv autorů. Grafická úprava: Jiří Trachtulec.

**ISBN 978-80-86940-85-4**

© Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s. r. o., 2020. *Tato publikace nesmí být přetiskována vcelku nebo po částech, přenášena nebo uváděna do oběhu pomocí elektronických, mechanických, fotografických či jiných prostředků bez výslovného svolení autorů.*

**[www.vubhb.cz](http://www.vubhb.cz)**