národní
úložiště
šedé
literatury

Metodika detekce virů obilnin a trav pomocí SYBR Green I RT-qPCR

Jarošová, Jana; Dráb, Tomáš; Beoni, Eva; Kumar, Jiban
2016

Dostupný z http://www.nusl.cz/ntk/nusl-317265

Dílo je chráněno podle autorského zákona č. 121/2000 Sb.

Tento dokument byl stažen z Národního úložiště šedé literatury (NUŠL).

Datum stažení: 25.04.2024

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní nusl.cz .

VÝZKUMNÝ ÚSTAV ROSTLINNÉ VÝROBY, v.v.i.

METODIKA DETEKCE VIRŮ OBILNIN A TRAV
pomocí SYBR Green I RT-qPCR

Jarošová, Dráb, Beoni a Kumar

Praha, 2016

VÝZKUMNÝ ÚSTAV ROSTLINNÉ VÝROBY, v.v.i.

Metodika detekce virů obilnin a trav pomocí SYBR Green I RT-qPCR

Jarošová, Dráb, Beoni a Kumar

Praha, 2016

Metodika detekce virů obilnin a trav pomocí SYBR Green I RT-qPCR

Autoři:
Ing. Jana Jarošová, Ph.D
Mgr. Tomáš Dráb, Ph.D.
Ing. Eva Beoni, Ph.D
Ing. Jiban Kumar, Ph.D*

Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i.
Drnovská 507, 161 06 Praha-Ruzyně
*korespondující autor: e-mail: jiban@vurv.cz

Tato práce byla financována z projektu NAZV QJ1230159 a QH81269.

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2016
ISBN: 978-80-7427-204-2

Anotace (česky)**:**

Čeleď *Poaceae* je zemědělsky nejdůležitější čeledí rostlin na světě. Čeleď *Poaceae* je také hostitelem mnoha patogenů včetně více než sta známých druhů virů. Rozložení výskytu jednotlivých druhů virů se liší v závislosti na hostitelích, zeměpisných a jiných podmínkách. Tato metodika poskytuje popis způsobu detekce devíti virů obilnin a trav: virus mozaiky sveřepu (BMV), virus žluté zakrslosti ječmene (BYDV), latentní virus jílku (LoLV), virus nekrotické mozaiky ovsa (ONMV), virus mozaiky jílku (RgMV), půdou přenosný virus mozaiky obilnin (SBCMV), virus skvrnitosti spartiny (SpMV), virus zakrsalosti pšenice (WDV), a virus čárkovité mozaiky pšenice (WSMV) pomocí metody SYBR Green I RT-qPCR.

Anotace (anglicky):

The family *Poaceae* is one of the most important groups of plants in the terms of agricultural production. The family *Poaceae* also hosts many pathogens including >100 known virus species. The distribution of the viruses varies according to hosts, geographical and other conditions. In this methodology we provide assays for detection of nine cereal and grass viruses (*Brome mosaic virus*-BMV, *Barley yellow dwarf virus*-BYDV, *Lolium latent virus*-LoLV, *Oat necrotic mottle virus*-ONMV, *Ryegrass mosaic virus*-RgMV, *Soil-borne cereal mosaic virus*-SBCMV, *Spartina mottle virus*-SpMV, *Wheat dwarf virus*-WDV a *Wheat streak mosaic virus*-WSMV) by SYBR Green I RT-qPCR.

Oponenti:

Mgr. Šárka Linhartová, Ph.D.
Vedoucí Laboratoře virologie
Odbor diagnostiky
ÚSTŘEDNÍ KONTROLNÍ A ZKUŠEBNÍ ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝ
Šlechtitelů 23/773, 779 00 Olomouc.

Ing. Tomáš Moravec, Ph.D.
Vedoucí Laboratoře virologie
ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BOTANIKY AVČR, v.v.i.
Rozvojová 313, 16502 Praha 6-Lysolaje

Metodika Byla certifikována
Ústředím kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským (ÚKZÚZ),
Pod OSVĚDČENÍ:UKZUZ 056120/2016

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Hroznová 2, 656 06 Brno

v y d á v á

O S V Ě D Č E N Í

(UKZUZ 056120/2016)

o uznání uplatněné certifikované metodiky
v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje"

Název metodiky:

„Metodika detekce virů obilnin a trav pomocí SYBR Green I RT-qPCR"

Autoři:
Ing. Jana Jarošová, Ph.D.; Mgr. Tomáš Dráb, Ph.D.; Ing. Eva Beoni, Ph.D.; Ing. Jiban Kumar, Ph.D.

Název organizace:
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

Místo vydání metodiky:
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.; Drnovská 507, 161 06 Praha 6 - Ruzyně

Metodika byla zpracovaná v rámci řešení výzkumných projektů č. NAZV QJ1230159 „Monitoring, diagnostika a práh škodlivosti viróz obilnin a jejich přenašečů v souvislostech stále se měnícího klimatu" a QH81269 „Inovace diagnostických metod a ochranných opatření vůči virovým zakrslostem obilnin a jejich vektorům".

Brno 16. května 2016

(Jméno a funkce zástupce odborného útvaru státní správy): **Ing. Daniel Jurečka**
ředitel ústavu

(Podpis zástupce odborného útvaru státní správy): .....

(Razítko odborného orgánu státní správy):

ČESKÁ REPUBLIKA ÚSTŘEDNÍ KONTROLNÍ A ZKUŠEBNÍ ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝ * BRNO *

Obsah

Cíl 8

Úvod 8

Přehled uváděných virů obilnin a trav 9

Symptomatika 10

1. BYDV 10

2. WDV 11

3. ONMV 13

4. BMV: 14

5. RgMV 14

6. WSMV 16

7. SBCMV 17

Metody detekce 18

Sérologické metody diagnostiky 18

Molekulární metody detekce 19

1. Protokol přípravy vzorku 22

A) Odběr vzorku 22

B) Homogenizace 22

2) Protokol izolace RNA 22

3) Protokol izolace DNA (pro detekci WDV) 24

4) Protokol detekce RNA virů (BYDV, BMV, LoLV, ONMV, RgMV, SBCMV. SpMV, WSMV) pomocí Real-time RT-PCR 25

5) Protokol detekce WDV pomocí Real-time PCR 28

6) Interpretace výsledků 28

Využití molekulární metod pro monitoring virů obilnin a trav 29

Závěr 32

Srovnání „novosti postupů“ 32

Seznam použité literatury 33

Seznam publikací, které předcházely metodice 38

Cíl

Cílem metodiky bylo vyvinout rutinní diagnostickou metodu schopnou spolehlivě a citlivě detekovat devět virů obilnin a trav – BMV, BYDV, LoLV, ONMV, RgMV, SBCMV, SpMV, WDV, a WSMV.

Úvod

Čeleď *Poaceae* představuje jednu z nejúspěšnějších skupin rostlin a je jednoznačně nejvýznamnější z hlediska zemědělské produkce. Rostliny této čeledi pokrývají obrovské plochy zemědělské i neobhospodařované půdy. *Poaceae* ale rovněž hostí mnoho patogenních organismů včetně více jak 100 druhů virů (Lapierre a Signoret, 2004), což je téměř 20% veškerých známých rostlinných virů (Brunt *et al.*, 1996). Virózy obilnin jsou známy a způsobují škody všude na světě, kde se obilniny pěstují (Slykhuis, 1976). Virus žluté zakrslosti ječmene (BYDV, kmeny PAS, PAV a MAV) (Kundu *et al.*, 2009b; Jarošová *et al.*, 2013) a virus zakrslosti pšenice (WDV) (Kundu *et al.*, 2009a) v České republice svým výskytem převládají a mohou způsobovat vysoké ztráty na výnosech. Jediným způsobem, jak snížit dopad těchto virů na výnosy obilnin, je pěstovat odolné odrůdy (Ordon *et al.*, 2009). Krom těchto virů je mnoho dalších, které se obvykle objevují méně často a způsobují méně závažné choroby. Mezi ně patří virus čárkovitosti pšenice (WSMV) (Gadiou *et al.*, 2009), virus mozaiky sveřepu (BMV) (Gadiou a Kundu, 2010). Nicméně v Evropě byl zaznamenán i výskyt dalších virů napadajících obilniny a trávy – virus zakrslosti ječmene (BDV) a virus zakrslosti ovsa (ODV) (Schubert *et al.*, 2007) nebo virus čárkovité mozaiky pšenice (WSMV) a virus nekrotické mozaiky ovsa (ONMV) (Rabenstein a Huss, 2013). V zemích sousedících s ČR patří mezi nejdůležitější viry obilnin viry přenášené půdou rodů *Bymovirus* a *Furovirus* (přehled v Kuhne, 2009).

Detekce virů napadajících *Poaceae* je zaměřena v drtivé většině pouze na nejrozšířenější viry a na hostitelské zemědělské plodiny. V rutinní diagnostice se využívá převážně sérologické metody ELISA, ačkoliv v posledních letech na významu nabývají techniky založené na detekci nukleových kyselin patogenu, převážně pak technika reverzní transkripce RNA a následné polymerázové řetězové reakce DNA (RT-PCR). Kvantitativní varianta této techniky, RT-qPCR, umožňuje nejen detekci, ale i kvantifikaci množství patogenu ve vzorku (Jarošová a Kundu, 2010); a obecně se vyznačuje vyšší citlivostí a efektivitou ve smyslu času a nákladů (Izzo *et al.*, 2012). Využití těchto technik umožní detekci i méně rozšířených a známých virů jak v obilninách, ale i v plevelných a volně rostoucích travinách.

Přehled uváděných virů obilnin a trav

Virus žluté zakrslosti ječmene (*Barley yellow dwarf virus*, BYDV) spolu s virem zakrslosti pšenice (WDV) patří mezi nejdůležitější patogeny obilnin v ČR (Kundu et al., 2009b). BYDV patří do čeledi *Luteoviridae* která zahrnuje několik kmenů z rodu *Luteovirus* (PAV, PAS, MAV), *Polerovirus* virus žluté zakrslosti obilnin (*Cereal yellow dwarf virus*-RPV, -RPS) a nezařazené členy *Luteoviridae* (RMV, SGV, GPV) (Miller *a* Rasochová, 1997).

Virus zakrslosti pšenice (*Wheat dwarf virus*, WDV) se v posledních letech stává jednou z nejdůležitějších chorob obilnin v ČR. WDV patří do rodu *Mastrevirus*, má jako jeden z mála rostlinných virů +ssDNA genom a na území ČR byl prvně popsán Dr. J. Vackem v roce 1961. WDV má dva kmeny, ječný (WDV-B) a pšeničný (WDV-W) (Kundu *et al.*, 2009a).

Virus čárkovité mozaiky pšenice (*Wheat streak mosaic virus*, WSMV) se vyskytuje celosvětově ve všech pěstitelských oblastech pšenice. Napadá pšenici, ječmen, kukuřici a mnoho dalších druhů *Poaceae* včetně plevelných trav (Burrows *et al.*, 2009). WSMV je přenášen roztočem *Aceria tosichella* Keifer (Stenger *et al.*, 1998). U pšenice a kukuřice byl také prokázán přenos semenem (Dwyer *et al.*, 2007). Ztráty mohou být až 100% (Burrows *et al.*, 2009). Je to obzvláště závažný patogen Velkých Planin v Severní Americe (Christian a Willis, 1993; French a Stenger, 2003). WSMV byl detekován na území tehdejšího Československo v osmdesátých letech (Vacke et al., 1986), avšak v posledních letech se tento virus vyskytuji častěji, a to hlavně u pšenice (Kudela *et al.*, 2008; Gadiou *et al.*, 2009; Svobodová a Kumar, 2015).

Půdou přenosný virus mozaiky obilnin (*Soil-borne cereal mosaic virus*, SBCMV) se od roku 1960, kdy byl poprvé zaznamenán v Itálii, rozšířil do mnoha evropských zemí včetně Francie, Německa, Itálie, Dánska, Polska a UK. SBCMV způsobuje závažné výnosové ztráty u pšenice, dosahující až 70% (Rattia *et al.*, 2004). SBCMV je přenášen *Polymyxou graminis*. Infekční spory mohou v půdě vytrvat až 10 let (Richard-Molard, 1985).

Virus nekrotické skvrnitosti ovsa (*Oat necrosis mottle virus*, ONMV), charakteristický úzkým spektrem hostitelských rostlin (Gill, 1976) byl popsán v roce 1996 Bruntem *et al.* jako ssRNA virus s výskytem převážně v USA. ONMV byl nicméně detekován v roce 2002 v Německu (Rabenstein *et al.*) a v roce 2004 v Turecku (Ilbagi *et al.*, 2005). ONMV je řazen do rodu *Tritimovirus* (Rabeinstein *et al.*, 2002).

Latentní virus jílku (*Lolium latent virus*, LoLV) je ssRNA virus, vyskytující se přirozeně v jílcích (*Lolium* spp.) se zjištěným spektrem minimálně 25 rostlinných druhů, včetně rýže a několik dvouděložných druhů. LoLV se přenáší vegetativně, mechanickou

inokulací, a také vektorem mšicí střemchovou, *Rhopalosiphum padi* (Li *et al.*, 2008). Výskyt byl zjištěn v Německu, Francii, Nizozemí, UK a USA (Maroon-Lango *et al.*, 2006), v ČR byl rovněž detekován u planě rostoucích trav (Dráb *et al.*, 2014).

Virus mozaiky jílku (*Ryegrass mosaic virus*, RgMV) je ssRNA virus z čeledi *Potyviridae*, rodu *Rymovirus*. Je přenášen roztoči čeledi vlnovníkovitých a je běžným patogenem jílků v mnoha zemích. Dokáže výrazně snížit výnosy víceletých travin (Xu *et al.*, 2001). Krom travin je schopen napadat i oves, pšenici a rýži (Brunt *et al.*, 1996).

Virus mozaiky sveřepu (*Brome mosaic virus*, BMV) se vyskytuje v mnoha zemích po celém světě, z virů má jeden z nejširších záběrů hostitelských rostlin z čeledi *Poaceae*, a ve svých hostitelích si udržuje poměrně vysoký titr viru (Lane, 1981). BMV napadá mnoho druhů čeledi *Poaceae*, včetně sveřepu (*Bromus inermis*), ze kterého byl poprvé izolován. Snižuje také výnosy kukuřice a ječmene. BMV je přenášen převážně mechanicky, ačkoli byl prokázán přenos háďátky rodu *Xiphinema* v laboratorních podmínkách (Schmidt *et al.*, 1963).

Virus skvrnitosti spartiny (*Spartina mottle virus*, SpMV) byl poprvé identifikován v roce 1980 (Jones, 1980). Napadá traviny, poprvé byl izolován z trávy *Spartina anglica*.

Symptomatika

1. Virus žluté zakrslosti ječmene-BYDV

Typickými symptomy napadení je zlatožluté až oranžové zbarvení listů a retardace růstu (obr. 1). Žloutnutí postupuje od špiček a okrajů listů a zachvacuje postupně celou listovou čepel. Žloutnutí většinou začíná 7 - 20 dnů po infekci a může být předcházeno tvorbou vodovatých skvrn na listech (D'Arcy, 1995). Zakrslost doprovází deformace listů a listových čepelí (u ovsa se listy stáčí do ruliček), redukce nadzemní i podzemní biomasy, poruchy metání, sterilita kvítků, redukce počtu klásků a tvorba zadinového zrna. V dalším stádiu choroby se může objevovat nekróza cévních svazků a redukce kořenového systému. Napadené rostliny nemetají nebo nevytvářejí semena. Symptomy jsou v některých případech těžko odlišitelné od příčin neparazitického původu (Čača *et al.*, 1981).

Obrázek 1. Příznaky BYDV u ječmene (foto J. Kumar, VÚRV, v.v.i.)

2. Virus zakrsalosti pšenice-WDV

Hlavním příznakem virové zakrslosti pšenice u kulturních obilnin společným pro všechny odrůdy je zakrslost rostlin způsobená omezením dlouživého růstu (obr. 2). Nejvíce patrné jsou příznaky v době obvyklé pro počátek sloupkování. Častými příznaky jsou odumření terminálního listu, po němž následuje odumření zbytku odnože, deformace, prohýbání listů. Žloutnutí starších listů (obr. 3), předcházející jejich odumření, začíná od špiček. Inkubační doba se pohybuje v polních podmínkách za příznivých vegetačních podmínek od tří až šesti týdnů (Ripl *et al.*, 2008).

Obrázek 2. Ohníčkovitá infekce WDV na pšenici (foto J. Kumar, VÚRV, v.v.i.)

Obrázek 3. Sekundární infekce WDV na pšenici (foto J. Kumar, VÚRV, v.v.i.)

3. Virus nekrotické mozaiky ovsa-ONMV

Napadá oves (*Avena sativa*) a jiné druhy rodu *Avena* a mnohé trávy včetně *Poa*, *Bromus* a *Lolium*. Infekce často začíná chlorotickými čárkami na vzcházejících listech, které se rozvíjejí v nepravidelné světle a tmavě zelené skvrny na listech (obr. 4). Tyto pak přecházejí v nekrózy. Pochvy listů jsou taktéž skvrnité a posléze nekrotické. Zakrslost není výrazná. Skvrny a mozaika jsou výrazné při teplotách okolo 15-18°C a nekrózy se za vyšších teplot objevují dříve a jejich intenzita je vyšší (Gill, 1976).

Obrázek 4. Listy ovsa s nekrotickou mozaikou (Foto T. Dráb VÚRV, v.v.i.)

Další trávy náchylné viróze jsou: *Bromus mollis, B. racemosus, B. secalinus, B. tectorum, Lolium multiflorum, L. temulentum, Poa annua, P. compressa, P. pratensis* a *P. trivialis*.

Hordeum vulgare (ječmen), *Triticum aestivum* (pšenice), *Secale cereale* (žito) a *Zea mays* (kukuřice) jsou vůči chorobě imunní. Další imunní traviny jsou *Agropyron elongatum, A. intermedium, A. repens, Agrostis alba, A. palustris, A. tenuis, Bromus inermis, Dactylis glomerata, Elymus junceus, Festuca elatior, F. rubra, F. rubra var. commutata, Lolium perenne, Phalaris arundinacea, Phleum pretense* (Gill, 1976).

4. Virus mozaiky sveřepu -BMV

BMV napadá mnoho jednoděložných čeledi *Poaceae*, včetně ječmene a kukuřice. U ječmene BMV způsobuje žlutě až světle hnědé proužky (obr. 5). U kukuřice lze zaznamenat léze nebo proužky, u mladých sazenic pak dochází k nekrózám a uhynutí rostlin (Wooley a Kao, 2004).

Obrázek 5. List ječmenu napadený BMV.
(Foto Wooley. R.S.; Kao S.C.)

5. Virus mozaiky jílku-RgMV

RgMV dokáže způsobit závažné škody především na *Lolium multiflorum,* hybridu *L.* x *boucheanum* a *L. perenne.* Na čepeli a pochvách listů se objevují jasně zelené, difúzní viditelné skvrny (obr. 6), které mohou nekrotizovat. V pokročilých stádiích se objevuje výrazná mozaika. Často jsou napadeny všechny listy na rostlině. S postupem nekróz, listy jeden po druhém odumírají. Stonky bývají také napadeny, takže celá rostlina předčasně usychá. Po kosení rostlina znovu obrůstá, často bez vzniku viditelných symptomů (Raynal *et al.*, 1989).

Rozchází se studie týkající se některých možných hostitelských druhů rostlin. Nicméně zcela jistě RgMV napadá oves setý (*Avena sativa*) a oves hluchý (*Avena fatua*), dále *Lolium multiflorum, L. perenne, Dactylis glomerata, Agrostis scabra, Bromus arvensis* a *Poa annua*, Na těchto hostitelích obvykle způsobují lehkou světle zelenou mozaiku na listech. Izoláty z Anglie a Kanady byli také schopné infikovat *Cynosurus cristatus*. Americké izobáty dále infikovaly *Bromus commutatus, B. mollis, B. racemosus, B. secalinus, B. tectorum, Festuca elatior, Hordeum leporinum, Lolium remotum, L. temulentum* a pšenici Michigan Amber (Bruehl *et al*., 1957). Britské izobáty byly schopny přenosu na *Alopecurus agrestis, Bromus sterilis, Festuca pratensis*, rýži setou (*Oryza sativa*), *Poa pratensis* a *P. trivialis*, ale nenapadal pšenici (Mulligan, 1960). Slykhuis a Paliwal (1972) zkoušeli několikrát infikovat pšenici a rýži, nicméně neúspěšně.

Obrázek 6. Listy jílku (*Lolium multiflorum*) napadené RgMV.
(Foto F. Rabenstein, Julius Kühn Institute)

6. Virus čárkovité mozaiky pšenice-WSMV

Napadá pšenici (*Triticum aestivum*), oves (*Avena sativa*), ječmen (*Hordeum vulgare*), žito (*Secale cerale*), kukuřici (*Zea mays*), čirok (*Sorghum vulgare*), proso (*Panicum, Setaria,* a *Echinochloa* spp.). Specifickým symptomem je žlutozelená mozaika na listech (obr. 7). V polních podmínkách se symptomy projeví spolu s nástupem teplejšího počasí od poloviny do konce jara. Infikované rostliny vykazují mozaiky listů a napadlé odnože jsou povadlejší a polehlejší v porovnání s odnožemi zdravými. Symptomy přetrvávají až do zralosti rostlin. Mezi běžné symptomy se řadí i zakrslost. U čiroku se mohou objevit sporadicky nekrotické skvrny (French a Stenger, 2002).

Napadá také mnoho plevelných a volně rostoucích trav, včetně rodů *Aeiglops, Agropyron, Bouteloua, Bromus, Cenchrus, Digitaria, Echinochloa, Elymus, Eragrostis, Haynaldia, Hordeum, Lolium, Panicum, Phalaris, Poa, Orizopsis, Setaria,* a *Stipa*. Nenapadá *Agropyron repens, Bromus inermis, Hordeum jubatum*, rýži (*Oryza sativa*) nebo cukrovou třtinu (*Saccharum officinarum*) (French a Stenger, 2002).

Obrázek 7. Pšenice postižená virem čárkovitosti pšenice (WSMV). (Foto Jiban Kumar, VÚRV, v.v.i.)

7. Půdou přenosný virus mozaiky obilnin-SBCMV

SBCMV je přenášen půdní houbou *Polymyxa graminis*, částice viru jsou přenášeny pomocí zoospor a odpočívajících spor (cyst). Viruliferní cysty mohou v půdě přečkat až 10 let (Ratti *et al.*, 2004). SBCMV napadá pšenici, triticale, žito (Kühne, 2009).

Charakteristické žluté mozaiky (obr. 8) na listech se objevují na nově rostoucích listech na počátku jara při chladném počasí. Může se jednat o mírnou skvrnitost na spodních listech nebo výraznou mozaiku na praporcovém listu; nebo také napadené rostliny nemusí symptomy na listech vůbec vykazovat. Infekce ovlivňuje růst rostliny (zakrslost) a také snižuje výnosy, dle různých zdrojů o 20 až 50% (Kühne, 2009).

Obrázek 8. Šlechtitelské linie pšenice na pokusném pozemku vykazující symptomy nákazy SBCMV (foto Illinois Agricultural Experiment Station).

Výskyt všech výše jmenovaných virů byl zaznamenán na území ČR v letech minulých, nebo se vyskytuje v sousedství ČR (Německo, Polsko, Slovensko). Výskyt žádného z těchto virů se tedy nedá vyloučit ani v ČR, naopak, u některých již byl výskyt potvrzen (WSMV), u jiných je velmi pravděpodobný. Mnoho viróz se nemusí symptomaticky projevovat, nebo jsou symptomy lehce zaměnitelné a abiotickými stresy. Rutinně, avšak ani experimentálně, se však kromě BYDV a WDV žádné jiné viry obilnin na území ČR nesledují.

Metody detekce

Detekce a identifikace virů je velikou výzvou od vzniku rostlinné virologie jako samostatné disciplíny, a od té doby bylo vyvinuto obrovské množství metod umožňujících určit virové patogeny (Boonham *et al.*, 2007). Přesná diagnóza organismů způsobujících choroby je nezbytným předpokladem účinné kontroly (Boonham *et al.*, 2003) a ve studiích epidemiologie a ekologie virů kritickým faktorem (Wheelis *et al.*, 2002). Do současnosti bylo vyvinuto a je každodenně využíváno mnoho metod (elektronová mikroskopie, ELISA, PCR, RT-PCR, TaqMan, reverse PAGE, hybridizace nukleových kyselin, metagenomické přístupy, biologické testy) (Boonham *et al.*, 2003). Běžné metody nacházející uplatnění v rutinní diagnostice zahrnují různé variace polymerázové řetězové reakce (PCR), sérologických testů jako enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), a dále imunofluorescenční testy na protilátky (Melcher *et al.*, 2008; Menzel *et al.*, 2002; Webster *et al.*, 2004). Jednotlivé metody se liší svou citlivostí, náročností provedení a v neposlední řadě náklady.

Při rutinním testování se obvykle rostlinný materiál (osivo, sadba, vzorky ze zemědělsky obhospodařovaných ploch) testuje na předem dané spektrum patogenů danou jednou, max. dvěma metodami. Výběr vzorků může být náhodný, nebo mu může předcházet vizuální zhodnocení příznaků odborným pracovníkem nebo zemědělcem.

V současné době se v České Republice obvykle rutinně testuje sérologicky nebo zjišťováním nukleové kyseliny viru ve vzorku pomocí RT-PCR.

Sérologické metody diagnostiky

Metody enzymové imunoanalýzy patří k důležitým technikám stanovení řady makromolekul (především proteinů), jejich komplexů (např. viry, buňky), ale i nízkomolekulárních látek (např. hormony, růstové regulátory). Základem všech sérologických technik a jejich modifikací je reakce protilátky s antigenem. Virové částice mají na povrchu plášťového proteinu specifické struktury, které nazýváme epitopy. Jestliže izolovaný (purifikovaný) virus naočkujeme do vhodného obratlovce, nejčastěji králíka, vytvoří ve svém těle proti těmto bílkovinám specifické protilátky zvané imunoglobuliny G (IgG).

Běžně využívanou sérologickou metodou je v rostlinné virologii DAS-ELISA test, kde virový antigen nejdříve reaguje se specifickými protilátkami (obvykle jako imuno -γ-globulin nebo IgG frakce antiséra) navázanými na povrch pevného nosiče a je pak detekován specifickými protilátkami značenými enzymem, který v případě pozitivního vzorku zviditelní reakci rozkladem vhodného chromogenního substrátu (tj. změnou barvy). Protilátky vázané na pevný nosič a protilátky značené mohou a nemusí být ze stej-

ného zdroje. Vzhledem k tomu, že je virus umístěn mezi dvě molekuly protilátek, nazývá se metoda double antibody sandwich (DAS) ELISA (Naidu a Hughes, 2003). Ve všech případech je výstupní informací provedeného ELISA testu soubor hodnot absorbance. Protože ELISA testem je stanovován proteinový antigen virionu, hodnota absorbance nás neinformuje přímo o stavu virové částice a o její schopnosti vyvolat infekci (Navrátil *et al.*, 2012). V praxi je DAS-ELISA relativně vysoce specifická (Naidu a Hughes, 2003).

ELISA se stala od momentu, kdy ji poprvé do rostlinné virologie uvedli Clark a Adams (1977) velmi populární volbou detekce virů v rostlinném materiálu, hmyzích vektorech, semenech i vegetativním rozmnožovacím materiálu. Díky své přizpůsobivosti, citlivosti a výši nákladů je ELISA stále využívána v mnoha případech, především pokud se jedná o testování vysokého počtu vzorků najednou (Naidu a Hughes, 2003).

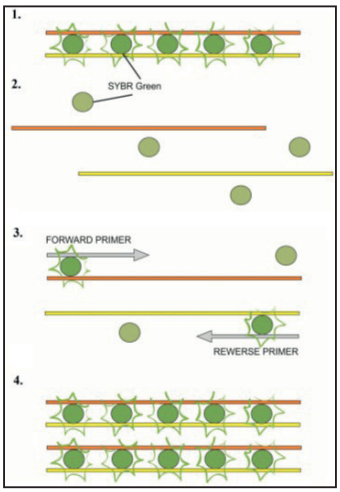
Molekulární metody detekce

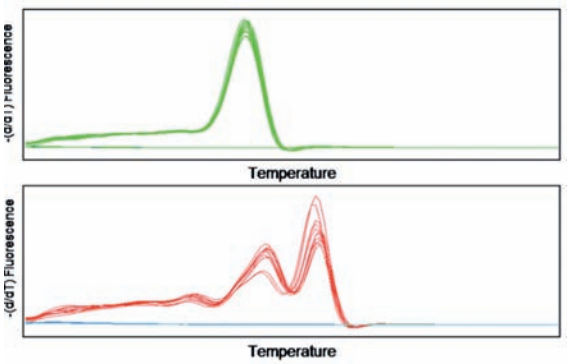
Metody molekulární detekce se poprvé objevily v sedmdesátých letech a od té doby stále nabývají v rutinní diagnostice na významu. Princip PCR byl poprvé představen Kerry Mullisem v roce 1983 (Mullis, 1990). PCR je *in vitro* metoda pro enzymatickou syntézu definované sekvence DNA. Reakce využívá dvou oligonukleotidových primerů, které hybridizují s protichůdnými vlákny DNA a od jejich 3´- konců je zahájena syntéza komplementárních řetězců. Syntéza nových komplementárních vláken je katalyzována termostabilní DNA polymerázou (např. Taq DNA - polymeráza). Opakování cyklu, které zahrnují denaturaci DNA templátu (denaturation), hybridizaci primeru (annealing) a syntézu komplementárních vláken DNA (extension), má za výsledek exponenciální nárůst počtu specifických DNA fragmentů. PCR je velice citlivá metoda, která umožňuje detekci DNA ve vzorku tím, že určenou sekvenci namnoží do té míry, že ji můžeme po separaci gelovou elektroforézou a obarvení snadno detekovat.

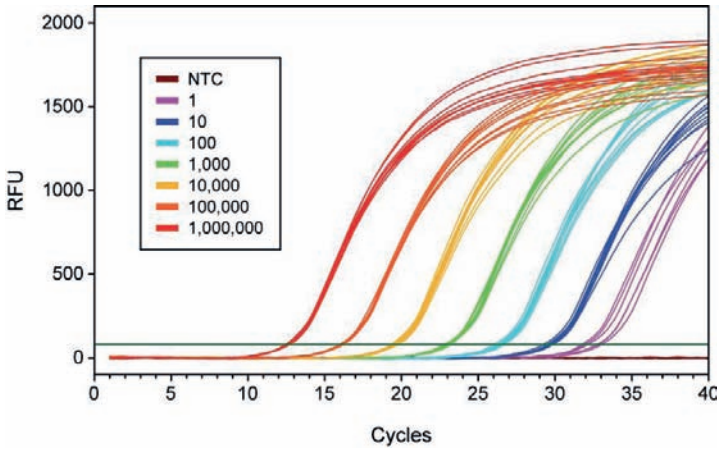
Většina rostlinných virů je tvořena pouze RNA. DNA polymeráza není schopna využít RNA jako matrici pro syntézu nového řetězce, proto musí být RNA nejprve přepsána na jednořetězovou DNA (cDNA), která posléze vstupuje jako templát do PCR (RT-PCR).

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (nejčastěji označované jako Real-time RT-PCR nebo RT-qPCR) je metoda založena na principu klasické PCR, umožňuje však kvantifikaci sledovaného úseku RNA. Na rozdíl od běžné RT-PCR, kde se analyzuje až výsledný produkt pomocí elektroforézy v agaróze, je při Real-time RT-PCR zaznamenáván každý cyklus PCR ve skutečném čase. Záznam amplifikace je založen na principu fluorescence, kdy se používají sondy (fluorescenční látky), které se váží specificky nebo nespecificky na amplifikované DNA. Běžně se používají fluorescenční kyaninová barviva SYBR® Green (obr. 9a), která fluoreskují po vazbě na menší žlábek dsDNA.

Fluorescence SYBR green I je po vazbě na DNA až 1000x vyšší a fluorescenční signál se zvyšuje se vzrůstajícím množstvím PCR produktu. Signál se měří buď na konci elongace nebo kontinuálně. Je zřejmé, že barviva, která se nespecificky vážou na DNA, nemohou být použita u mnohonásobných reakcí, a jejich hlavním omezením je nemožnost odlišení nespecifických produktů (obr. 9b). Real-time PCR je založena na konceptu C_t hodnoty (C_t jako cycle of treshold, cyklus prahu) (obr. 9c) (Lysková, 2008).







Obrázek 9a. Princip SYBR Green Real time PCR. Barvivo SYBR Green se váže na jakoukoli dvouvlákennou DNA (dsDNA), čímž začne emitovat fluorescenci, kterou je přístroj schopen zachytit. Nárůst množství dsDNA (tedy PCR produktu) vede k nárůstu intenzity fluorescence, která je po každém cyklu změřena přístrojem.

Obrázek 9b. Analýza křivky tání. Pokud pro Real-time PCR využíváme SybrGreen, můžeme velmi snadno kontrolovat, jestli v průběhu reakce vznikají nespecifické produkty či primery-dimery. Je k tomu využívána křivka tání, tzv. melting curve, která využívá toho, že různé PCR produkty mají různé teploty tání. Nespecifické produkty mají obvykle teplotu tání nižší než specifické. Křivka tání ukazuje změnu intenzity fluorescence při různých teplotách. Pokud má křivka tání pouze jeden vrchol, reakce je čistě specifická, pokud křivka má dva a více vrcholů, znamená to, že kromě specifických produktů vznikají také nespecifické.

Obrázek 9c. C_t hodnota reflektuje cyklus, kdy dochází k nárůstu fluorescence nad práh pozadí, které se v reakci vyskytuje. Tato fluorescence je zachycena detektorem. Jedná se tedy o bod, kdy se křivka nárůstu fluorescence protíná s prahem pozadí (modrá lineární čára). Číslo tohoto cyklu je zaznamenáno a dále využíváno právě jako C_t hodnota.

Real-time kvantitativní PCR se stala nejpřesnější a nejcitlivější metodou, která byla doposud vyvinuta (Dorak, 2006). Metodiky detekce a kvantifikace patogenů pomocí RT-qPCR od roku 1999 přibývají. Jsou rychlejší, přesnější a citlivější v porovnání s tradičně využívanými metodami detekce a kvantifikace, a mohou být použity naprosto univerzálně (tab. 1). Z těchto důvodů jsou využívány pro diagnostiku zemědělských vzorků i pro aplikované účely (Gachon *et al.*, 2003).

Tabulka 1. Souhrn technických vlastností Real-time PCR, v porovnání s jinými v současnosti využívanými technikami (zdroj Gachon *et al.*, 2004).

Počet šipek označuje úroveň náročnosti vyžadované u jednotlivých parametrů. Znaménka '+' a '-' označují schopnost dané techniky uspokojit jednotlivé požadavky.

Cíl	Rychlost	Citlivost	Specificita	Kvantifikace	Spolehlivost	Náklady
Technické požadavky	→	→→→	→→	→→→	→→→	
Real-time PCR	+++	+++	+++	+++	+++	-
Southern blot	-	--	Proměnlivá	-	+	+
ELISA	+++	--	Proměnlivá	+	+	+++

Je jednoznačné, že rozvoj širokého využití qPCR metod v rutinní diagnostice je limitován jediným faktorem; a to jsou stále relativně vysoké náklady na přístrojové vybavení a reagencie. Je však pravděpodobné, že v budoucnosti bude tato technologie stále přístupnější (Gachon *et al.*, 2004).

1) Protokol přípravy vzorku

A) Odběr vzorku

Odebíráme na prvním místě rostliny symptomatické, nebo rostliny, na nichž byl zaznamenán výskyt vektorů. Pokud v porostu takové rostliny nejsou, odebíráme náhodně více vzorků z různých míst porostu. U mladých rostlin je možno odebírat celé nadzemní části nebo jen listy, u starších rostlin je opět možné obojí, nicméně z hlediska úspory času při homogenizaci a kvality izolované RNA je vhodnější odebírat jen mladší listy bez stébel. Při odběru dbáme na zabránění kontaminace z rostliny na rostlinu (pracujeme v rukavicích, nůžky, skalpel nebo jiné nástroje omýváme mezi odběry jednotlivých vzorků lihem, vzorky uskladňujeme každý zvlášť). Odebrané vzorky uchováváme v chladu a co nejdříve buď ihned homogenizujeme, nebo uskladníme na -80°C.

B) Homogenizace

Pro izolaci RNA i DNA potřebujeme 0,1 g rostlinného pletiva. Jednodušší je ovšem homogenizovat větší množství vstupního materiálu a z homogenátu 0,1 g odvážit. Vzorky homogenizujeme v tekutém dusíku, u vzorků uchovávaných na -80°C dbáme na to, aby nedošlo k jejich rozmražení, ideálně odebíráme z mrazicího boxu po každém vzorku zvlášť. Vzorek pečlivě homogenizujeme v předmražené třecí misce a do 2 ml sterilní mikrozkumavky odvážíme maximálně 0,1 g homogenátu, lepších výsledků izolace RNA lze dosáhnout s 60-70 mg vzorku. Mikrozkumavky je také možno předmrazit krátkým ponořením do tekutého dusíku. Je velmi důležité nepřesáhnout danou váhu, neboť u kolonkových metod izolace NA dochází v tomto případě ke sníženému výtěžku i kvalitě NA. Jakmile máme vzorky navážené, je opět nutno zabránit jejich rozmražení před samotnou izolací - vhodné je uchování v tekutém dusíku nebo v mrazicím boxu.

2) Protokol izolace RNA

Existuje mnoho způsobů izolace RNA. Zde je uveden tzv. kolonkový způsob metody izolace. Tato izolační metoda je založena na zjištění, že nukleové kyseliny v přítomnosti tzv. chaotropních solí adherují na silikátový povrch. Výhodou metody založené na adsorpci na silikát je rychlost a pohodlnost, proto jsou na ní založeny komerční soupravy (kity) pro rutinní extrakce NA. Kity jsou optimalizovány pro použití na konkrétní typ

a množství vzorku a poskytují standardizované výsledky. Pohodlnost použití kitů je dále zvýšena tím, že obvykle používají nástavce do mikrozkumavek, obsahující jemný filtr, který zadrží silikátové částice. Zpracování pak probíhá tak, že jsou roztoky promývány přes kolonku (filtr se zachycenými částicemi). Namísto tradičního silikátu kity často využívají speciální pryskyřice a mají různě upravené složení pufrů tak, že např. preferují při adsorpci molekuly NA určitého velikostního rozpětí.

V našem případě doporučujeme použití komerční soupravy Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma - kat.č. STRN10, STRN50 a STRN250).

Protokol izolace RNA komerční soupravou Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma)

Lyzace

1. Předem si nachystat směs lyzačního pufru s 2-mercaptoethanolem (na každý vzorek je zapotřebí **500µl Lysis solution** a 5 µl 2-ME)
2. Předem si nachystat rovněž mikrozkumavky s kolonkou s modrým kroužkem (Filtration column), s kolonkou s červeným kroužkem (Binding column) a další dvě mikrozkumavky bez kolonek.
3. Do homogenizovaného vzorku napipetovat 500 µl lyzačního roztoku předem namíchaného s 2-mercaptoethanolem a 2 minuty vortexovat.

Přečištění-filtrace

4. Všechny vzorky vložit do vodní lázně a inkubovat **5 min při 56 °C**. Centrifugovat vše **3 min při 14000 RPM**.
5. Přepipetovat supernatant na **Filtration column** (modrý kroužek), zavřít a centrifugovat 1 min při **14000 RPM.**

Navázání RNA na kolonku

6. Kolonku zahodit a připipetovat po **500 µl Binding solution**, zvortexovat a **700 µl** napipetovat na **Binding column.** To provést postupně se všemi vzorky.
7. Poté kolonky centrifugovat **1 min při 14000 RPM.** Vylít supernatant, osušit Collection tube o filtrační papír, vrátit do ní kolonku, napipetovat zbytek směsi a centrifugovat **1 min při 14000 RPM**.
8. Vylít supernatant, osušit Collection tube o filtrační papír a vrátit do ní kolonku.

Promytí RNA na kolonce

9. Do kolonky napipetovat **500 µl Wash Solution 1** a centrifugovat **1 min při 14000 RPM**.
10. Vylít supernatant, osušit Collection tube o filtrační papír a vrátit do ní kolonku.

11. Do kolonky napipetovat **500 µl Wash Solution 2** a centrifugovat **30 s při 14000 RPM**.
12. Vylít supernatant, osušit Collection tube o filtrační papír a vrátit do ní kolonku.
13. Do kolonky **znovu** napipetovat **500 µl Wash Solution 2** a centrifugovat **30 s při 14000 RPM**.
14. Vylít supernatant, osušit Collection tube o filtrační papír a vrátit do ní kolonku.
15. Do kolonky **znovu** napipetovat **500 µl Wash Solution 2** a centrifugovat **30 s při 14000 RPM**.
16. Vylít supernatant, osušit Collection tube o filtrační papír a vrátit do ní kolonku.
17. Do kolonky znovu napipetovat **500 µl Wash Solution 2** a centrifugovat **30 s při 14000 RPM.**

Vypláchnutí RNA z kolonky

18. Přendat kolonku do nové mikrozkumavky a centrifugovat **1 min při 14000 RPM,** aby se kolonka osušila.
19. Poté kolonku vyjmout a vložit opatrně do nové **popsané** 2 ml eppendorfky (jsou v kitu). Do středu kolonky (přímo na membránu) napipetovat **50 µl Elution Solution**, zavřít víčko a nechat stát **1 min** při **pokojové teplotě**. Centrifugovat kolonku **1 min při 14000 RPM.** Vyndat kolonku z eppendorfky a zahodit ji.
20. Změřit koncentraci RNA.
21. Naředit vzorek pomocí autoklávované ddH_20 na koncentraci 30 ng/µl.

Kvalitu izolované RNA měříme spektrofotometricky (NanoDrop2000, ThermoScientific, USA). Měří se při vlnových délkách 260, 230 a 280 nm. To umožní hodnocení čistoty vzorku, očekávané poměry jsou 2.0 pro RNA. Poměr absorbancí 260/280 menší než 1.75 svědčí pro obsah kontaminujících bílkovin. Absorbance při 230 nm značí nečistoty, jako jsou sacharidy, fenolické sloučeniny, aromatické složky. Při výpočtu koncentrace optická hustota 1 odpovídá přibližně 40 mg/l pro RNA.

3) Protokol izolace DNA (pro detekci WDV)

1. Připravit si zmrazený homogenizovaný vzorek v 1,5 ml mikrozkumavce.
2. Přidat 0.5 ml guanidin thiokyanátu (GuTC) předehřátého na 60 °C
   a. ddH_2O, 1 M Guanidine thiocyanate, 20 mM Na_2H-EDTA, 0.1 M MOPS, pH 4.6, + 2% 2-merkaptoetanol (přidávat těsně před použitím).
   b. inkubovat ve vodní lázni po dobu 60 min při 60°C.
3. přidat 0.5 ml fenol-chloroform-isoamylalkoholu (25:24:1).
   a. zvortexovat
   b. centrifugovat na 14 000 rpm, 4 °C, 10 min
   c. odpipetovat vodní (horní) vrstvu do nové 1.5 ml mikrozkumavky
4. přidat roztok RNAzy A 12 µg (3 µl za koncentrace 4 µg/µl)
   a. zvortexovat

b. inkubovat 10 min při 37 °C

5. přidat roztok proteinázy K 10 µg (1 µl při koncentraci 10 µg/ul)
   a. zvortexovat
   b. inkubovat 20-30 min při 37 °C

6. přidat 0.5 ml fenol-chloroform-isoamylalkoholu (25:24:1)
   a. zvortexovat
   b. centrifugovat na 14 000 rpm, 4 °C, 10 min
   c. odpipetovat vodní (horní) vrstvu do nové 2,0 ml mikrozkumavky se špičatým dnem

7. přidat 0.1x obsah 3M NaAc
   a. přidat 2x obsah vychlazeného čistého etanolu
   b. nechat na -80 °C po dobu 1 hod
   c. centrifugovat při 13 000 g, 4 °C, 20 min
   d. vylít etanol

8. přidat 1 ml 70% EtOH
   a. centrifugovat při 13 000 g, 4 °C, 10 min
   b. vylít etanol

9. ponechat po dobu 10 min při pokojové teplotě, případně vysušit ve vakuové sušičce (cca. 5 minut)

10. přidat 50 µl ddH2O

11. skladovat při -20 °C

4) Protokol detekce RNA virů (BYDV, BMV, LoLV, RT-

Tento protokol popisuje postup pro použití přístroje Real-time 7300 od firmy Applied Biosystems, protokol pro použití s jinými přístroji může být lehce odlišný.

Při použití 96-jamkových destiček je vhodné si nejprve udělat návrh umístění jednotlivých vzorků na destičku a podle něj postupovat. Ideálně použijeme každý vzorek v triplikátu, včetně pozitivní kontroly (RNA izolovaná z rostliny s potvrzenou infekcí BYDV) a negativní kontroly (RNA izolovaná ze zdravé rostliny), případně použijeme jako templát pouze destilovanou vodu pro kontrolu, zda nejsou primery kontaminovány. Pro kontrolu kvality vyizolované RNA se používá vnitřní kontrola jednotlivých vzorků – primery pro detekci přítomnosti genu pro eukaryotický elongační faktor pšenice (eEF1α). Pokud se detekce tohoto genu u vzorku nevydaří, lze předpokládat problém s kvalitou izolované RNA.

Návrh destičky tedy vypadá např. takto:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Vzorek 1 BYDV	Vzorek 2 BYDV	Pozitivní kontrola BYDV	Negativní kontrola BYDV	Vzorek 1 BMV	Vzorek 2 BMV	Pozitivní kontrola BMV	Negativní kontrola BMV	Vzorek 1 LoLV	Vzorek 2 LoLV	Pozitivní kontrola LOLV	Negativní kontrola LOLV
B	Vzorek 1 BYDV	Vzorek 2 BYDV	Pozitivní kontrola BYDV	Negativní kontrola BYDV	Vzorek 1 BMV	Vzorek 2 BMV	Pozitivní kontrola BMV	Negativní kontrola BMV	Vzorek 1 LoLV	Vzorek 2 LoLV	Pozitivní kontrola LOLV	Negativní kontrola LOLV
C	Vzorek 1 BYDV	Vzorek 2 BYDV	Pozitivní kontrola BYDV	Negativní kontrola BYDV	Vzorek 1 BMV	Vzorek 2 BMV	Pozitivní kontrola BMV	Negativní kontrola BMV	Vzorek 1 LoLV	Vzorek 2 LoLV	Pozitivní kontrola LOLV	Negativní kontrola LOLV
D	Vzorek 1 ONMV	Vzorek 2 ONMV	Pozitivní kontrola ONMV	Negativní kontrola ONMV	Vzorek 1 RGMV	Vzorek 2 RGMV	Pozitivní kontrola RGMV	Negativní kontrola RGMV	Vzorek 1 EEF1A	Vzorek 2 EEF1A	Pozitivní kontrola EEF1A	Negativní kontrola EEF1A
E	Vzorek 1 ONMV	Vzorek 2 ONMV	Pozitivní kontrola ONMV	Negativní kontrola ONMV	Vzorek 1 RGMV	Vzorek 2 RGMV	Pozitivní kontrola RGMV	Negativní kontrola RGMV	Vzorek 1 EEF1A	Vzorek 2 EEF1A	Pozitivní kontrola EEF1A	Negativní kontrola EEF1A
F	Vzorek 1 ONMV	Vzorek 2 ONMV	Pozitivní kontrola ONMV	Negativní kontrola ONMV	Vzorek 1 RGMV	Vzorek 2 RGMV	Pozitivní kontrola RGMV	Negativní kontrola RGMV	Vzorek 1 EEF1A	Vzorek 2 EEF1A	Pozitivní kontrola EEF1A	Negativní kontrola EEF1A
G												
H												

Mastermix se skládá z 10 µl Power SYBR Green RNA-to-Ct™ 1-Step Kit (Applied Biosystems), primerů pro jednotlivou detekci (tab. 2) v koncentraci 250 nM a celkové koncentraci RNA 3 ng/µl – vše doplníme do 20 µl vodou.

Reverzní transkripce probíhá po dobu 30 min za teploty 48°C a amplifikace má následující podmínky: 2 min inkubace při 95°C následované 40 cykly o 15 s při 95°C, a 60 s při 61°C; a nakonec krok tvorby disociační křivky (15 s při 95°C, 60 s při 60°C, a 15 s při 95°C).

Tabulka 2. Seznam primerů používaných v této metodice. * Teplota Tm se liší pro ječný (80.2°C) a pšeničný (77.8°C) kmen WDV.

Virus	Primery	5′ sequence 3′	Produkt (bp)	Product Tm	Odkaz
BMV	BMV-F BMV-R	^{364}GTTCACCGATAGACCGCTG^{382} ^{434}AAGAGCCCGGAATGTCAAGA^{415}	70	76.4	(Ferns & Garson, 2006)
BYDV	JanRa PVinterF	^{3475}TGTTGAGGAGTCTACCTATTTG^{3454} ^{3182}GTTGAGTTTAAGTCACACGC^{3201}	294	84	(Jarosova & Kundu, 2010)
LoLV	LoLV-F LoLV-R	^{3318}AGATGCCCGTCAATCCACCTACTAC^{3342} ^{3448}GGTCTTGCTTGTTTCTGTGTGTGC^{3425}	131	80.5	(Dráb *et al.*, 2014)
ONMV	ONMV-F ONMV-R	^{8407}AGGCAACACTGGCTCTTTCA^{8426} ^{8603}GCTCAACTCGTGGCTGGTA^{8585}	197	79.4	(Dráb *et al.*, 2014)
RgMV	RgMV-F RgMV-R	^{9239}CATCAGGGGCAAGGCATCTA^{9258} ^{9382}TGGGCAGACAGTTACAGCAT^{9363}	144	80.5	(Dráb *et al.*, 2014)
SBCMV	SBCMV-F SBCMV-R	^{1448}AATGGGAAAGCGTGGTTGACTGTG^{1471} ^{1653}AAGTGCCGAGCGTATTGTATGCCT^{1630}	206	78.9	(Dráb *et al.*, 2014)
SpMV	SpMV-F SpMV-R	^{633}YGTGGARACGGACTCAGCGAAGAA^{656} ^{722}GCATCCCARGCATCRCTATCTGTC^{698}	90	75.9	(Dráb *et al.*, 2014)
WDV	UniWDVf UniWDVrv	^{1381}TCCGCGCTAGGACAGTCACT^{1401} ^{1533}AAGATTGGCTCAAGGATATGACTCC^{1509}	128	77.8°C nebo 80.2°C*	(Gadiou *et al.*, 2011)
WSMV	WSMV-F WSMV-R	^{9075}AAGTGCAGAACAGCGTTG^{9092} ^{9213}AAACTGTGCGTGTTCTCC^{9196}	139	81.6	(Tatineni et al., 2010)
eE1α	Elf1A-for Elf1A-rev	CAGTGCTGGACTGCCACA CTCCACCACCATGGGCTT	164	81-84	Jarošová & Kundu, 2010)

5) Protokol detekce WDV pomocí Real-time PCR

Tento protokol popisuje postup pro použití přístroje Real-time 7300 přístroje od firmy Applied Biosystems, protokol pro použití s jinými přístroji může být lehce odlišný. Při použití 96-jamkových destiček je vhodné si nejprve udělat návrh umístění jednotlivých vzorků na destičku a podle něj postupovat (viz detekce RNA virů výše).

Mastermix se skládá z 10 µl Power SYBR Green PCR Master mixu (Applied Biosystems), primerů UniWDVf a UniWDVrv o jednotlivé koncentraci 0,8 µM a 2 µl DNA – vše doplníme do 20 µl vodou.

Amplifikace má následující podmínky: 10 min inkubace při 95°C následované 40 cykly o 15 s při 95°C, a 60 s při 60°C; a nakonec krok tvorby disociační křivky (15 s při 95°C, 60 s při 60°C, a 15 s při 95°C).

6) Interpretace výsledků

Výsledné hodnoty lze v přístrojích od Applied Biosystems stáhnout v tabulce ve formátu.csv kompatibilní s excelem. U každé jednotlivé hodnoty je třeba zkontrolovat několik dat:

1. **Triplikáty:** jsou C_t hodnoty totožné / velmi podobné?
2. **Teplota T_m výsledného produktu:** odpovídá teplotě udávané v tabulce č. 2? (Odlišnost v řádu několika málo desetin stupně může indikovat odlišný kmen viru (Garvey et al., 2014)).
3. Kontrola disociační křivky analýzy tání: má pouze jeden vrchol (tedy nedošlo ke vzniku nespecifických produktů během amplifikace)?
4. Není problém s detekcí endogenní kontroly, tedy detekcí genu eEF1α? Pokud ano, značí to pravděpodobné problémy s kvalitou izolované RNA/DNA, popř. problémy s reagenciemi v mastermixu a výsledky celého vzorku jsou tím zpochybněny.

Poté je nutno rozhodnou, která hodnota C_t lze ještě být chápána jako pozitivní výsledek a která jako již negativní. Obvykle jsou hraniční hodnoty okolo 35-40 cyklů. Vhodné je pro každý jednotlivý přístroj a detekovaný virus provést diluční ředění pozitivního vzorku a sledovat, při jakých Ct hodnotách má ještě vypovídající hodnotu (body a); b); c); d) – viz výše – jsou splněny) a kdy jsou již výsledky nepřesné. Samozřejmě i u této metody existuje tzv. hraniční pole, kdy je nutno výsledky potvrdit/vyvrátit jinou metodou.

Validace metody

Námi navržené primery byly validovány společně s primery navrženými jinými autory (Ferns & Garson, 2006, Tatineni et al., 2010) na 62 vzorcích obilnin a trav odebraných v různých regionech České republiky. U všech testovaných vzorků bylo podezření na virovou infekci. U 16 vzorků byla virová infekce skutečně potvrzena v následujícím zastoupení: virus čárkovité mozaiky pšenice (10 případů), virus mozaiky jílku (3 případy) a latentní virus jílku 9 (případ). Byly rovněž zaznamenány dva případy směsné infekce WSMV a RgMV. Validace byla popsána v impaktovaném časopise (Drab et al., 2014).

Využití molekulární metod pro monitoring virů obilnin a trav

V České Republice byl doposud potvrzen výskyt několika virů obilnin – BMV, BYDV, LoLV, RgMV, WDV, WSMV (Kundu *et al.*, 2009a,b; Gadiou *et al.*, 2009; Gadiou a Kundu, 2010; Dráb *et al.*, 2014). Výskyt mnoha dalších virů lze s jistou pravděpodobností předpokládat – v okolních zemích je ekonomicky závažným patogenem SBCMV, a byl potvrzen výskyt ONMV, SpMV (Schubert *et al.*, 2007; Rabenstein a Huss, 2013). Z výše jmenovaných je rutinně detekován pouze BYDV a WDV, ostatní viry monitorovány nejsou a pro většinu z nich ani neexistuje metodika detekce.

Metoda Real-time PCR je jednou z nejpřesnějších a nejcitlivějších metod, které byly doposud vyvinuty. Metodiky detekce a kvantifikace patogenů pomocí Real-time RT-PCR od roku 1999 přibývají. Jsou rychlejší, přesnější a citlivější v porovnání s tradičně využívanými metodami detekce a kvantifikace, a mohou být použity naprosto univerzálně. Z těchto důvodů jsou využívány pro diagnostiku zemědělských vzorků i pro aplikované účely.

Analýza ekonomie využití metodiky SYBR Green I RT-qPCR pro rutinní detekci a monitoring virů obilnin a trav

Tabulka 3: Finanční náročnost metod detekce virů obilnin.

Metodiky	Potřebné kity	Cena za kit	Cena na analýzu jednoho vzorku	Citlivost metody
ELISA	Sérum (Sediag)	Cca. 9000 Kč/500 reakcí	36 Kč	
	Destičky (Sediag)	3 000 Kč/ 60 destiček	cca. 2 Kč	
	Krycí fólie (Sediag)	4 500 Kč / 100 ks	cca. 1 Kč	
	Plast		cca. 20 Kč	
	CELKEM		**60 Kč**	*
One-step RT-PCR	Izolace RNA (Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich)	30 780 Kč / 250 vzorků	123 Kč	
	Reverzní transkripce + PCR (QIAGEN One-Step RT-PCR Kit)	11 800 Kč / 200 reakcí à 25 µl	60 Kč	
	Agaróza (LE SeaKemp Lonza)	5 000 Kč / 500 g / cca 1000 gelů	cca 5 Kč	
	TAE pufr do elektroforézy (Thermo Scientific 50X TAE Buffer)	1 913 Kč/ 1 l koncentrátu	1,90 Kč	
	Barvivo SYBR Safe (Thermo Fischer Scientific)	2 315 Kč / 400 µl	3 Kč	
	Gene Ruler 100 bp Plus Ready-to-use (Thermo Fischer Scientific)	1 932 Kč	8 Kč	
	Primery (100 µM)	cca. 350 Kč	0,04 Kč	
	Plast		cca 20 Kč	
	CELKEM		**221 Kč**	**
Two-step RT-PCR	Izolace RNA (Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich)	30 780 Kč / 250 vzorků	123 Kč	
	Sada dNTPS (100 mM každý, Promega) – ředění 10 mM	5 518 Kč	4,10 Kč	
	RNasin (Jena Bioscience)	1 220 Kč	5,40 Kč	
	Random Hexamers (Jena Bioscience)	680 Kč	5,40 Kč	
	M-MLV (10 000 U, Promega)	1 914 Kč	23 Kč	
	Go-Taq 2 Polymerase (Promega)		6,20 Kč	
	dNTPs 100 mM každý, Promega) – ředění 2,5 mM	5 518 Kč	4,10 Kč	
	Primery (100 µM)	cca. 350 Kč	0,04 Kč	
	Agarózový gel (podrobně rozepsáno u One-step RT-PCR)		18 Kč	
	Plast		cca. 60 Kč	
	CELKEM		**243 Kč**	**1/2*
PCR (WDV)	Guanidin thiokyanát (Sigma Aldrich)	2 399 Kč / 100 g		
	Na_2H-EDTA (Sigma Aldrich)	808 Kč / 50 g		
	MOPS (Sigma Aldrich)	1 037 Kč / 25 g		
	2-Mercaptoethanol (Sigma Aldrich)	977 Kč / 100 ml		
	= směs výše uvedených látek v daném poměru (viz. metodika)	395 Kč / 100 ml směsi	cca. 2 Kč	
	RNáza A (4 mg/ml, Promega)	2 169 Kč / 1 ml	6,50 Kč	

PCR (WDV)	Proteináza K (20 mg/ml, Fisher ThermoScientific)	762 Kč / 1 ml	0,40 Kč	
	Fenol-Chloroform-Izoamylalkohol (Sigma Aldrich)	2 166 Kč / 100 ml	11 Kč	
	Octan sodný (Sigma Aldrich)	1 226 Kč / 250 g	0,30 Kč	
	EtOH Pure	600 Kč / 1 l	1 kč	
	Go-Taq 2 Polymerase (Promega)		6,20 Kč	
	dNTPs 100 mM každý, Promega) – ředění 2,5 mM	5 518 Kč	4,10 Kč	
	Primery (100 µM)	cca. 350 Kč	0,04 Kč	
	Agarózový gel (podrobně rozepsáno u One-step RT-PCR)		18 Kč	
	Plast		cca. 80 Kč	
	CELKEM		130 Kč	**1/2*
SYBR Green I qPCR	Izolace DNA (rozpis viz. výše)		32 Kč	
	Power SYBR Green PCR Master mix (Applied Biosystems)	11 130 Kč / 5 ml	22, 30 Kč	
	Primery (100 µM)	cca. 350 Kč	0,04 Kč	
	Destička (The Applied Biosystems® MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate)	1 784 Kč / 10 destiček à 96 jamek	1, 90 Kč	
	Krycí fólie (The Applied Biosystems® MicroAmp® Optical Adhesive Film)	5 920 Kč / 100 fólií	59, 20 Kč	
	Plast		cca. 80 Kč	
	CELKEM		**197 Kč**	***
SYBR Green I RT-qPCR	Izolace RNA (Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich)	30 780 Kč / 250 vzorků	123 Kč	
	qPCR (Power SYBR Green RNA-to-CtTM 1-Step Kit (Applied Biosystems))	15 272 Kč / 250 reakcí à 20 µl	30,60 Kč	
	Destička (The Applied Biosystems® MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate)	1 784 Kč / 10 destiček à 96 jamek	1, 90 Kč	
	Krycí fólie (The Applied Biosystems® MicroAmp® Optical Adhesive Film)	5 920 Kč / 100 fólií	59, 20 Kč	
	Primery (100 µM)	cca. 350 Kč	0,02 Kč	
	Plast		cca. 50 Kč	
	CELKEM		**265Kč**	***

Z ekonomického hlediska se jako nejlevnější jeví sérologická metoda ELISA. Nicméně její nízká cena je rovněž vykoupena i nízkou citlivostí této metody, jelikož se zabývá pouze přítomnost virového antigenu, nikoliv jeho schopností vyvolat infekci. Metody založené na molekulární analýze jsou výrazně přesnější, ale i finančně náročnější. Nejpřesnější metodou je real-time PCR, u které je vysoká citlivost zajištěna díky vysoké teplotě nasedání primerů, což snižuje riziko falešné pozitivity. Její cena je v přepočtu na vzorek mírně vyšší než cena klasické PCR (pro DNA viry) nebo RT-PCR (pro RNA viry), nicméně její spolehlivost a citlivost je výrazným argumentem pro využití právě této metody při diagnostice virových patogenů obilnin. Velkou výhodou metody

(RT)-qPCR je rovněž skutečnost, že v jednom běhu přístroje lze analyzovat více vzorků najednou (cca. 25 u přístroje s adaptérem na 96-jamkovou destičku, více než 100 u přístroje s adaptérem na 384 jamkovou destičku), čímž se ušetří čas, peníze, lidská práce i přístroj na provádění analýz.

Závěr

Monitoring virových chorob obilnin a ostatních zemědělských plodin je důležitou součástí fytopatologických opatření. Při výskytu patogenu v určité oblasti lze přijmout preventivní opatření a tím zabránit vysokým ztrátám na výnosu, které virové choroby způsobují. Je rovněž velmi důležité kontrolovat trvalé travní porosty, které jsou známy jako rezervoáry virových patogenů, a z nichž je možnost přenosu na kulturní plodiny. Tato metodika poskytuje návod na velmi citlivou a přesnou detekci 9 obilných virů a umožňuje tudíž zachytit výskyt nejen běžných, ale i nově se objevujících virových patogenů. Včasná diagnostika je jednou z nejúčinnějších metod prevence výskytu epidemií chorob.

Srovnání „novosti postupů“

V ČR dosud nebyla známa metoda schopná identifikace následujících virů obilnin a trav: BMV, LoLV, ONMV, RgMV, SBCMV, SpMV. Nebyla ani vytvořena metodika pro detekci metodou Real-time RT-PCR pro žádný z obilných virů.

Seznam použité literatury

Boonham N., Tomlinson J., Mumford R. 2007. Microarrays for rapid Identification of plant viruses. Annual Review of Phytopathology. 45: 307–28.

Boonham N., Walsh K., Smith P., Madagan K., Graham I., Barker I. 2003. Detection of potato viruses using microarray technology: towards a generic method for plant viral disease diagnosis. Joural of Virological Methods 108: 181-187.

Brunt A. A., Crabtree K., Dallwitz M. J., Gibbs A. J., Watson L., Zurcher E.J. (eds.) 1996. onwards. `Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996.' URL http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/

Burrows M., Franc G., Rush C., Blunt T., Ito D., Kinzer K., Stack J. 2009. Occurrence of viruses in wheat in the Great Plains region, 2008. Plant Health Progress doi, 10.

Čača Z. 1981. Zemědělská fytopatologie. SZN Praha, 336 stran, 1. vydání.

D'Arcy C. J. 1995. Symptomology a host range of barley yellow dwarf. In: C.J. D'Arcy, P.A. Burnett (Eds.), Barley Yellow Dwarf: 40 Years of Progress. The American Phytopathological Society, St Paul, MN, pp. 9-28.

Dorak T. M. 2006. Polymerase chain reaction. Abingdon. 376pp.

Dráb T., Svobodová E., Ripl J., Jarošová J., Rabenstein F., Melcher U., Kundu J. K. 2014. SYBR Green I based RT-qPCR assays for the detection of RNA viruses of cereals and grasses. Crop and Pasture Science, 65(12): 1323-1328.

Dwyer G. I., Gibbs M. J., Gibbs A. J., Jones R. A. C. 2007. Wheat streak mosaic virus in Australia: Relationship to isolates from the Pacific Northwest of the USA and its dispersion via seed transmission. Plant Disease 91:164-170.

Ferns R., Garson J. 2006. Development and evaluation of a real-time RT-PCR assay for quantification of cell-free human immunodeficiency virus type 2 using a Brome Mosaic Virus internal control. Journal of Virological Methods 135, 102-8.

French R., Stenger D. C. 2002. Wheat streak mosaic virus. In: Descripton of Plant Viruses web. Dostupné na: http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=393

French R., Stenger D. C. 2003. Evolution of Wheat streak mosaic virus: Dynamics of population growth within plants may explain limited variation. Annual Revue of Phytopathology 41:199-214.

Gadiou S., Kundu J. K. 2010. Complete genome sequence of a *Brome mosaic virus* isolate from the Czech Republic. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 46: 178–182.

Gadiou S., Kudela O., Ripl J., Rabenstein F., Kundu J. K., Glasa M. 2009. An amino acid deletion in *Wheat streak mosaic virus* capsid protein distinguishes a homogeneous group of European isolates and facilitates their specific detection. Plant Disease 93: 1209–1213.

Gadiou S., Ripl J., Jaňourová B., Jarošová J., Kundu J. K. 2012. Real-time PCR assay for the discrimination and quantification of wheat and barley strains of *Wheat dwarf virus*. Virus Genes 44(2):349-55

Gachon C., Mingam A., Charrier B. 2004. Real-time PCR: what relevance to plant studies?. Journal of Experimental Botany 55 (402):1445-1454.

Garvey C. E., McGowin C. L., Foster T. P. 2014. Development and evaluation of SYBR Green-I based quantitative PCR assays for herpes simplex virus type 1 whole transcriptome analysis. Journal of Virological Methods 201:101-111.

Gill C. C. 1976. Oat necrotic mottle virus. In: Description of plant viruses web. Dostupné na: http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=169

Christian M. L., Willis W. G. 1993. Survival of wheat streak mosaic virus in grass hosts in Kansas from wheat harvest to fall wheat emergence. Plant Disease 77:239-242.

Ilbagi H; Citir A; Yorganci U. 2005. Occurrence of virus infections on cereal crops and their identifications in the Trakya region of Turkey. Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection 112: 313-320.

Izzo M. M., Kirkland P. D., Gu X., Lele Y., Gunn A. A., House J. K. 2012. Comparison of three diagnostic techniques for detection of rotavirus and coronavirus in calf faeces in Australia. Australian Veterinary Journal 90:122–129.

Jarošová J., Kundu J. K. 2010. Validation of reference genes as internal control for studying viral infections in cereals by quantitative real-time RT-PCR. BMC Plant Biology 10: 146

Jarošová J., Chrpová J., Šíp V., Kundu J. K. 2013. A comparative study of the *Barley yellow dwarf virus* species PAV and PAS: distribution, accumulation and host resistance. Plant Pathology 62: 436–443.

Jones P. 1980. Leaf mottling of *Spartina* species caused by a newly recognised virus, spartina mottle virus. Annals of Applied Biology, 94: 77–81.

Kúdela O., Kúdelová M., Nováková S., Glasa M. 2008. First Report of Wheat streak mosaic virus in Slovakia. Plant Disease 92: 1365.

Kühne T. 2009. Soil-borne viruses affecting cereals—Known for long but still a Great. Virus Research 141: 174-183.

Kundu J. K., Gadiou S., Červená G. 2009*a*. Discrimination and genetic diversity of *Wheat dwarf virus* in the Czech Republic. Virus Genes 38: 468–474.

Kundu J. K., Jarošová J., Gadiou S., Červená G. 2009*b*. Discrimination of three BYDV species by one-step RT-PCR-RFLP and sequence based methods in cereal plants from the Czech Republic. Cereal Research Communications 37: 541–550.

Lane L. C. 1981. Bromoviruses. Pages 333-375 in: Handbook of Plant Virus Infections Comparative Diagnosis. E. Kurstak, ed. Elsevier/ North Holland Biomedical Press, Amsterdam.

Lane C. 1974. „The bromoviruses.“ Advances in virus research 19: 151.

Lapierre H., Signoret P. A. 2004. Viruses and virus diseases of *Poaceae* (Gramineae). Institut national de la recherche agronomique. Paris, 853 p.

Li, R., Maroon-Lango, C., Mock, R., Hammond, J. 2008. Lolium latent virus. V: Characterization, diagnosis *a* management of plant viruses. Volume 4: grain crops *a* ornamentals. Editoři Rao, G. P.;Bragard, C.;Lebas, B. S. M. Plant Pathogens Series - 4 (ISBN 1-933699-34-5). pp. 215-220

Lysková L. 2008. Real-time PCR a jeho využití v klinické molekulární diagnostice. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně. Lékařská fakulta.

Maroon-Lango C. J., Hammond J., Warnke S., Li R., Mock R. 2006. First Report of Lolium latent virus in Ryegrass in the United States. Plant Disease 90: 528.

Melcher U., Muthukumar V., Wiley G. B., Min B. E., Palmer M. W., Verchot-Lubicz J., Ali A., Nelson R. S., Roe B. A., Thapa V., Pierc M. L. 2008. Evidence for novel viruses by 22 analysis of nucleic acids in virus-like particle fractions from Ambrosia psilostachya. Journal of Virological Methods 152: 49-55.

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.

Miller W. A., Rasochová L. 1997. Barley yellow dwarf viruses. Annual review of phytopathology 35(1):167-190.

Mulligan T. E. 1960. The Transmission by Mites, Host-Range and Properties of Ryegrass Mosaic Virus. Annals of Applied Biology 48(3): 575-579.

Mullis K. B. 1990. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. Annual Biology Clinical 48: 579–582.

Naidu R. A., Hughes J. D. A. 2003. Methods for the detection of plant viral diseases in plant virology in Sub-Saharan Africa. Proceedings of plant virology, IITA, Ibadan, Nigeria, 233-260.

Ordon F., Habekuss A., Kastirr U., Rabenstein F., Kuhne T. 2009. Virus resistance in cereals: sources of resistance, genetics and breeding. Journal of Phytopathology 157: 535–545.

Rabenstein F., Huss H. 2013. Studies on grass viruses in Austria. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs 63: 11–14.

Schubert J., Habekuss A., Kazmaier K., Jeske H. 2007. Surveying cereal-infecting geminiviruses in Germany – diagnostics and direct sequencing using rolling circle amplification. Virus Research 127: 61–70.

Rabenstein F., Seifers D. L., Schubert J., French R., Stenger D. C. 2002. Phylogenetic relationships, strain diversity and biogeography of tritimoviruses. Journal of General Virology 83: 895-906.

Rattia C., Budge G., Ward L., Clover G., Rubies-Autonell C., Henry C. 2004. Detection and relative quantitation of Soil-borne cereal mosaic virus (SBCMV) and Polymyxa graminis in winter wheat using real-time PCR (TaqMan®). Journal of Virological Methods 122: 95–103.

Raynal G., Gondran J., Bournoville R., Courtillot M. 1989. Ennemis et maladies of the prairies. INRA Paris: 249 S.

Richard-Molard M. S. 1985. Rhizomania: a world-wide danger to sugar beet. Span 28: 92–94.

Ripl J., Holý K., Kocourek F., Kumar J. 2008. Metodika ochrany obilnin vůči viru zakrslosti pšenice a jeho vektoru křísku polnímu. Metodika pro praxi. VÚRV v.v.i. Praha.

Seifarth W., Spiess B., Zeilfelder U., Speth C., Hehlmann R., Leib-Mösch C. 2003. Assessment of retroviral activity using a universal retrovirus chip. Journal of Virological Methods112(1-2):79-91.

Schmidt H., Fritzsche F., Lehmann W. 1963. Transmission of Rye-grass mosaic virus by nematodes. Naturwissenschaften, 50(10).

Slykhuis J. T. 1976. Wheat spindle streak mosaic virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No 167.

Slykhuis J. T., Paliwal Y. C. 1972. Ryegrass mosaic virus. In: Description of Plant Viruses web. Dostupné na: http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=86.

Stenger D. C., Hall J. S., Choi I. R., French R. 1998. Phylogenetic relationships within the family Potyviridae: wheat streak mosaic virus and brome streak mosaic virus are not members of the genus Rymovirus. Phytopathology 88: 782–787.

Svobodová E., Kumar J. 2015: Výskyt virových chorob obilnin ve třech krajích České republiky. Úroda 63: 7:20-22

Tatineni S, Graybosch R. A., Hein G.L., Wegulo S. N., French R. 2010. Wheat Cultivar-Specific Disease Synergism and Alteration of Virus Accumulation During Co-Infection with Wheat streak mosaic virus and Triticum mosaic virus. Phytopathology 100: 230-8.

Vacke J. 1961. Wheat dwarf virus disease. Biologia Plantarum, 3(3): 228-233.

Vacke J., Zacha V., Jokeš M. 1986. Identification of virus in wheat new to Czechoslovakia. Proc. X. Czechoslovak Plant Prot. Conference, Brno, pp. 209-210.

Webster C. G., Wylie S. J. Jones M. G. K. 2004. Diagnosis of plant viral pathogens. Current Science 86:1604-1607.

Wheelis M., Casagrande R., Madden L. V. 2002. Biological Attack on Agriculture: Low-Tech, High-Impact Bioterrorism: Because bioterrorist attack requires relatively little specialized expertise and technology, it is a serious threat to US agriculture and can have very large economic repercussions. BioScience 52 (7):569-576.

Wooley R. S., Kao C. C. Brome mosaic virus. In: Description of Plant Viruses web.

Dostupné na: http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=405.

Xu J., Schubert J., Altpeter F. 2001. Dissection of RNA-mediated ryegrass mosaic virus resistance in fertile transgenic perennial ryegrass (Lolium perenne L.) The Plant Journal, 26:265–274.

Seznam publikací, které předcházely metodice

Dráb T., Svobodová E., Ripl J., Jarošová J., Rabenstein F., Melcher U., Kundu J. K. 2014. SYBR Green I based RT-qPCR assays for the detection of RNA viruses of cereals and grasses. Crop and Pasture Science 65(12): 1323-1328.

Gadiou S., Kundu J. K. 2010. Complete genome sequence of a *Brome mosaic virus* isolate from the Czech Republic. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 46:178–182.

Gadiou S., Kudela O., Ripl J., Rabenstein F., Kundu J. K., Glasa M. 2009. An amino acid deletion in *Wheat streak mosaic virus* capsid protein distinguishes a homogeneous group of European isolates and facilitates their specific detection. Plant Disease 93:1209–1213.

Gadiou S., Ripl J., Jaňourová B., Jarošová J., Kundu J. K. 2012. Real-time PCR assay for the discrimination and quantification of wheat and barley strains of *Wheat dwarf virus*. Virus Genes 44(2):349-55

Jarošová J., Kundu J. K. 2010. Validation of reference genes as internal control for studying viral infections in cereals by quantitative real-time RT-PCR. BMC Plant Biology 10: 146

Jarošová J., Chrpová J., Šíp V., Kundu J. K. 2013. A comparative study of the *Barley yellow dwarf virus* species PAV and PAS: distribution, accumulation and host resistance. Plant Pathology 62:436–443.

Kundu J. K., Gadiou S., Červená G. 2009*a*. Discrimination and genetic diversity of *Wheat dwarf virus* in the Czech Republic. Virus Genes 38:468–474.

Kundu J. K., Jarošová J., Gadiou S., Červená G. 2009*b*. Discrimination of three BYDV species by one-step RT-PCR-RFLP and sequence based methods in cereal plants from the Czech Republic. Cereal Research Communications 37:541–550.

Kundu J. K. 2008. First Report of barley yellow dwarf virus- PAS in wheat and barley grown in the Czech Republic. Plant Dis. 92 (11): 1587.