národní
úložiště
šedé
literatury

Metodika detekce pšeničného a ječného kmene viru zakrslosti pšenice v jejich vektoru křísku polním pomocí PCR - RFLP

Jaňourová, Blanka; Ripl, Jan; Kumar, Jiban
2009

Dostupný z http://www.nusl.cz/ntk/nusl-123483

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

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

Datum stažení: 28.04.2024

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní nusl.cz .

VÝZKUMNÝ ÚSTAV ROSTLINNÉ VÝROBY, V.V.I.

Metodika detekce pšeničného a ječného kmene viru zakrslosti pšenice v jejich vektoru křísku polním pomocí PCR - RFLP

Metodika pro Státní rostlinolékařskou správu

Praha, 2009

Metodika detekce pšeničného a ječného kmene viru zakrslosti pšenice v jejich vektoru křísku polním pomocí PCR - RFLP

Ing. Blanka Jaňourová

Ing. Jan Ripl

Ing. Jiban Kumar, Ph.D*

Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i.

odbor rostlinolékařství, oddělení virologie

Drnovská 507, 161 06 Praha-Ruzyně

*korespondující autor: e-mail: jiban@vurv.cz

Tato práce byla financována z projektu QH81269

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2009

ISBN: 978-80-7427-027-7

Anotace (česky):

Zakrslost pšenice (původce *Wheat dwarf virus* - WDV) patří mezi nejvýznamnější choroby obilnin v ČR. Na našem území může způsobit velké hospodářské škody na pšenici, ječmeni, tritikále, žitě a ovsu. Jediným dosud známým přenašečem WDV je křísek polní. Jiné přenosy viru nejsou známy. V této metodice jsou uvedeny metody polymerázové řetězové reakce (PCR) pro citlivou detekci viru zakrslosti pšenice v křísku polním a RFLP pro specifickou identifikaci ječného a pšeničného kmene.

Anotace (anglicky):

Wheat dwarf (causal agent *Wheat Dwarf Virus* - WDV) is one of the most important cereal diseases in the Czech republic where it can cause huge economic losses in wheat, barley, triticale, rye as well as in oat. *Psammotettix alienus* is the only known vector of WDV while another way of transmission is unrecognized. This methodology describes a PCR assay for sensitive detection of *Wheat Dwarf Virus* in *Psammotettix alienus*, and RFLP assay for barley and wheat strains specific identification.

Mgr. Hana Orságová
hlavní specialista diagnostik
Odbor diagnostiky
Šlechtitelů 773/23
Olomouc 779 00

RNDr. Noemi Čeřovská, CSc.
vedoucí laboratoře virologie
Ústav experimentální botaniky AV ČR v.v.i.
Na Karlovce 1a, 160 00 Praha 6

Obsah

1 Cíl metodiky 5

2 Vlastní popis metodiky 5
2.1 Úvod 5
2.2 Současná klasifikace a hostitelské spektrum WDV 6
2.3 Symptomy onemocnění 6
2.4 Vektor WDV, křísek polní (*Psammotettix alienus*) 8
2.4.1 Biologie kříska polního 8
2.4.2 Popis kříska polního 9
2.5 Způsob přenosu WDV a ekologie choroby 10
2.6 Diagnostika WDV 11
2.6.1 Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction-PCR) 12
2.6.2 Délkový polymorfizmus restrikčních fragmentů (Restriction fragment length polymorphism-RFLP) 20
2.6.3 Hodnocení diagnostické citlivosti a specifity 22
2.7 Závěr 23

3 Srovnání „novosti“ postupů 23

4 Popis uplatnění certifikované metodiky 23

5 Seznam související literatury 24

6 Seznam publikací, které předcházely metodice 26

1 Cíl metodiky

Cílem metodiky bylo vyvinout rutinní diagnostickou metodu pro spolehlivou detekci a rozlišení kmenů viru zakrslosti pšenice v jejich vektoru křísku polním. Pomocí včasné diagnostiky viru v přenašeči je možné určit přibližný procentuální podíl infekčních jedinců- přenašečů viru v porostu a tak předpovědět míru potenciální nákazy rostlin na daném území ještě před samotnými infekcemi rostlin nebo v jejich počátečním stádiu.

2 Vlastní popis metodiky

2.1 Úvod

Zakrslost pšenice (původce virus zakrslosti pšenice, *Wheat dwarf virus*-WDV) patří mezi nejdůležitější virové choroby v ČR. Virovou etiologii choroby počátkem šedesátých let minulého století na území tehdejšího Československa objevil a popsal J. Vacke. (Vacke, 1961). WDV je rozšířen hlavně v Evropě, jeho výskyt byl rovněž zjištěn v posledních letech v severní Africe a Číně. V oblastech pěstování ozimých obilnin patří WDV mezi nebezpečného původce onemocnění se složitou ekologií a schopností vyvolat silné poškození rostlin následované jejich předčasným odumřením. Z hospodářsky významných rostlin škodí v České republice na pšenici (*Triticum aestivum*), ječmeni (*Hordeum vulgare*), tritikále (*Triticosecale*) a žitě (*Secale cereale*), velmi vnímavou hostitelskou rostlinou je i oves (*Avena sativa)*. Zvýšený výskyt choroby se závažným poškozením porostů je nejčastěji v nižších polohách středních, severních, západních a východních Čech a nižších polohách Moravy. Změny klimatu jsou u nás spojeny se stále častějším výskytem dlouhých teplých podzimů, tyto podmínky vedou k vyšší hospodářské škodlivosti viru. V případech, kdy je prováděna insekticidní ochrana porostů, roste nákladovost pěstování obilnin. V posledním desetiletí několikrát došlo v řadě oblastí k epidemickému výskytu WDV u ozimých obilnin, který vyústil v řadě případů k vysokým výnosovým ztrátám, případně k předčasné likvidaci porostu.

Předložená metodika se zaměřuje na diagnostiku a rozlišení jednotlivých kmenů virové zakrslosti pšenice ve vektoru tohoto závažného onemocnění pomocí molekulárních metod PCR-RFLP. Úvodní kapitoly jsou věnovány stručnému popisu onemocnění a vektora choroby, kříska polního. Možnosti ochrany proti viru zakrslosti pšenice a monitoring výskytu přenašeče jsou podrobně popsány v práci „Metodika

ochrany obilnin proti viru zakrslosti pšenice a jeho vektoru křísku polnímu“ (Ripl et al., 2008). Výše zmíněná práce, ze které byly čerpány poznatky o tomto viru a jeho přenašeči, křísku polním, předcházela předložené metodice.

2.2 Současná klasifikace a hostitelské spektrum WDV

WDV je DNA virus, jehož molekula DNA je složena z jednoho kruhového vlákna. Tento virus patří do rodu Mastrevirus čeledi Geminiviridae (Stanley et al., 2005). Genome WDV se skládá ze čtyř otevřených čtecích rámců (open reading frames-ORFs) seskupujících se do dvou jednotek: tzv. virion-sense ORFs kódující protein potřebný pro pohyb (movement protein-MP) a obalový protein (coat protein-CP) a tzv. komplementární ORFs kódující replikační protein RepA a RepB (Schalk et al., 1989).

Současná nomenklatura rozděluje virus na tři kmeny: pšeničný kmen, ječný kmen a ovesný kmen (Schubert et al., 2007). Na území České republiky se vyskytuje kmen pšeničný (WDV-W) a ječný (WDV-B). Jednotlivé kmeny se geneticky liší (Kundu et al., 2009), proto mají různou virulenci a hostitelské okruhy. Pšeničný kmen je virulentnější a má široké spektrum hostitelských rostlin čeledi lipnicovité (*Poaceae*). Kromě pšenice, ječmene, ovsa, žita a tritikále se pšeničný kmen vyskytuje na planě rostoucích a plevelných travách jako jsou oves hluchý (*Avena fatua*), sveřepy (*Bromus inermis, B. sterilis, B. tectorum*), jílky (*Lolium multiflorum, L. perenne*), lipnice roční (*Poa annua*) a chundelka metlice (*Apera spica-venti*) (Vacke a Cibulka, 1999; Vacke, 1972). Hostiteli ječného kmene jsou ječmen, některé druhy rodu oves (*Avena spp.*) a zaječí ocásek (*Lagurus spp*.) (Lindsten a Vacke, 1991; Vacke et al., 2004). Uvedený výčet hostitelů však zdaleka není úplný. Významnými rezervoáry WDV v agroekosystému jsou obilní výdroly, plevelné jednoleté trávy (oves hluchý, chundelka metlice, sveřepy a lipnice roční). Dalšími rezervoáry jsou některé druhy trav vytrvalých travních společenstev. U těchto druhů trav není v jejich přirozených stanovištích přesně známa jejich reakce na infekce.

2.3 Symptomy onemocnění

Hlavním příznakem virové zakrslosti pšenice u kulturních obilnin společným pro všechny odrůdy je zakrslost rostlin způsobená omezením dlouživého růstu. Nejvíce patrné jsou příznaky v době obvyklé pro počátek sloupkování. Zakrslost rostlin se vyskytuje i u žluté zakrslosti ječmene (původce virus žluté zakrslosti ječmene, *Barley*

yellow dwarf virus- BYDV), tento příznak proto není specifický. Další příznaky virové zakrslosti pšenice se již nevyskytují vždy, jsou rozdílné u jednotlivých druhů obilnin a mají menší diagnostický význam. Častými příznaky jsou odumření terminálního listu, po němž následuje odumření zbytku odnože, deformace, prohýbání listů. Žloutnutí starších listů, předcházející jejich odumření, začíná od špiček. Inkubační doba se pohybuje v polních podmínkách za příznivých vegetačních podmínek od tří až šesti týdnů. V tomto období probíhá vývoj choroby latentně. Na velmi časných výsevech lze první symptomy zaznamenat již na podzim, jinak jsou symptomy choroby zaznamenatelné až po přezimování (Vacke, 1972). Na přezimovaných rostlinách je prvním příznakem žloutnutí starších listů, což není pro virové zakrslosti specifický symptom, naopak specifické je, že nedochází k prodlužování a napřimování odnoží. Pro narušení normálního vývoje je nutná silná infestace rostliny virem, proto jsou intenzita i projev příznaků závislé na růstové fázi v době infekce a latentním období.

U později napadených rostlin má choroba mírnější průběh. Virus zakrslosti pšenice se často hlavně u ozimých obilnin v porostech vyskytuje ve směsných infekcích s virem žluté zakrslosti ječmene.

Obr 1 A-C: Ječmen infikovaný WDV a D: zdravá kontrola (Foto J. Vacke. VÚRV, Praha)

Obr 2 A-C**:** Pšenice infikovaná WDV a D- zdravá kontrola (Foto J. Vacke. VÚRV, Praha)

2.4 Vektor WDV, křísek polní (*Psammotettix alienus*)

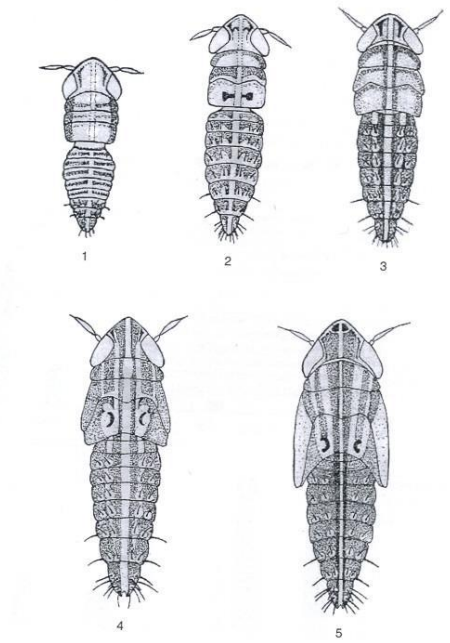
2.4.1 Biologie kříska polního

Křísek polní *Psammotettix alienus* (Dahlbom, 1850) je jediný dosud známý přenašeč viru zakrslosti pšenice. Jedná se o holarktický druh s potravní vazbou na řadu druhů rostlin čeledi lipnicovité, vyskytující se na polích, loukách a mezích (Guglielmino a Virla, 1997). V našich podmínkách vytváří 2 – 3 generace, i když třetí generace je většinou jen částečná (Malenovský, 2006). Přezimujícím stadiem je vajíčko nakladené do pletiv obilnin a částečně i trav, ze kterého se líhnou nymfy prvního instaru zpravidla v polovině května, v teplých letech již koncem dubna (Vacke, 1971). Dospělci první generace se objevují obvykle počátkem června, kdy dochází k částečné migraci jedinců z porostů ozimých obilnin na jařiny, popř. na travnatá stanoviště. Nymfy 2. generace se z větší části líhnou ještě před sklizní obilnin, zbytek až po sklizni. Týden po sklizni se na strništi nachází jak dospělci, tak nymfy všech instarů, které početně převládají. Ze sklizených ploch migrují postupně se líhnoucí imága na stanoviště s bohatší vegetací, jako jsou travnaté plochy a obilní výdroly. Na podzim, po vzejití ozimů, následuje přelet na vzešlé výsevy (Vacke, 1971). Populační maximum kříska polního je dosahováno v srpnu a září na výdrolu obilí (Manurung et al., 2000). Dospělci a nymfy kříska přežívají v porostech ozimých obilnin do prvních mrazů. Dvoudenní teploty pod mínus 5 °C křísky zahubí (Busch, 2008). Do jara přežívají jen diapauzní vajíčka. Počet vajíček nakladených jednou samicí je v rozmezí 24 až 175 kusů a při letních teplotách trvá jejich vývoj 9 – 14 dní (Vacke, 1971). První diapauzní vajíčka jsou kladena od konce srpna (2 - 20 % vajíček), 100 % diapauzních vajíček je kladeno od poloviny září. Kladení diapauzních vajíček závisí na délce dne (Manurung, 2002). Délka vývoje nymf od vylíhnutí z vajíčka po přeměnu v dospělce trvá na pšenici při teplotách kolísajících mezi 18 a 26 °C 26 až 34 dnů (Vacke, 1971) a za 7 dní po vylíhnutí dospělce je samice schopna klást první vajíčka nové generace (Manurung et al., 2005). Délka života dospělců je značně variabilní, od několika dnů až po šest týdnů, výjimečně i 8 - 10 týdnů (Vacke, 1971). Křísku polnímu vyhovuje teplé a suché počasí. Chladné počasí v časném létě má negativní vliv na vývoj nymf, což se může projevit snížením populační hustoty následujících generací a přetrvat i do dalšího roku. Naopak teplý podzim prodlužuje dobu kladení diapauzních vajíček a následný rozvoj populace v dalším roce (Lindblad a Arenö, 2002).

2.4.2 Popis kříska polního

Tělo dospělce je špinavě nažloutlé až žlutohnědé. Vrchní strana hlavy je kratší než šířka mezi očima, asi tak dlouhá jako pronotum, víceméně zřetelně a typicky skvrnitá, temeno vpředu pravoúhlé. Na světle hnědém postklypeu je příčně hnědé pruhování. Na předohrudi je pět, často nezřetelných bělavých podélných pruhů, přední okraj předohrudi je rezavě žlutý a hnědě tečkovaný. U předního okraje středohrudi jsou čtyři skvrnky. Přední křídla jsou delší než zadeček, žilky bělavé hnědě až černě skvrnitě vroubené. U světlých jedinců jsou žilky vroubeny jen místy. Nohy jsou světle okrově bělavé, na zadních holeních jsou u kořenů trnů černé tečky. Zadní chodidla tmavá. Velikost 3 až 4,5 mm (Javorek, 1978). Nymfy jsou podobné dospělcům, avšak nemají vyvinuta křídla a pohlavní orgány (proměna nedokonalá). V průběhu vývoje prochází pěti instary, které se od sebe liší především velikostí. Pátý instar má zřetelně vyvinuty pochvy křídel, které přesahují za polovinu tělesné délky. Zbarvení těla je buď světlé nebo tmavé, přičemž obě barevné formy se mohou vyskytovat na stejném stanovišti současně (Manurung et al., 2005).

Obr 3 Dospělec kříska polního. (Foto K. Holý)



Obr 4 Nymfy kříska polního (Manurung et al. 2005)

2.5 Způsob přenosu WDV a ekologie choroby

Dosud je schopnost přenosu viru WDV z nemocných na zdravé rostliny bezpečně potvrzena jen u jediného přenašeče – křiska polního. Virus se přenáší perzistentně nepropagativně (nemnoží se v těle přenašeče). Není přenosný transovariálně (přes vajíčko na potomstvo) ani mechanicky či osivem. Přenos viru začíná sáním floemové šťávy s částicemi viru z napadené rostliny, které jsou po průchodu trávicím traktem vektora transportovány do slinných žláz. Později při opětovném sání se virová inokula dostávají spolu se slinami do rostliny a tím dochází k infekci zdravých rostlin. Křísek polní je schopen získat virus již při 5-ti minutovém sání na infikované rostlině. Vironosní křísci mohou úspěšně přenést virus na zdravou rostlinu během 15-ti minutového sání. Preinfekční doba viru u křísků bývá obvykle 1 až 4 dny. Křísek polní uchovává WDV v těle a přenáší jej po dobu až 50 dní, což znamená prakticky po celý svůj život. (Vacke, 1971). I když je křísek polní jediným známým vektorem WDV, dva další druhy rodu *Psammotettix* (*P. confirmis* a *P. helvolus*) a dalších více než 15 druhů se může v podmínkách střední Evropy vyskytovat v porostech obilnin (Mehner et al., 2003). Potenciálními vektory WDV tak mohou být ještě další druhy křísků, zejména uvedené dva druhy z rodu *Psammotettix*. Věrohodné potvrzení nebo vyvrácení této hypotézy je předmětem dalšího výzkumu. Všechny instary nymfy a dospělci jsou schopni přenášet tento virus, avšak akvizice WDV u jednotlivých instarů obvykle kolísá (Mehner et al., 2003). Přenos viru dospělci může být buď lokální v rámci porostu, nebo daleký při migraci na nová stanoviště. Protože nymfy nemají vyvinutá křídla, přenášejí virus lokálně. Velmi atraktivní jsou mladé rostliny šťavnatých kulturních obilnin. Křísci se proto v létě ve velkém množství stěhují na obilní výdroly a na podzim na nové výsevy ozimů (kde dochází k primární infekci porostu). Z hlediska infekčního cyklu a vývoje choroby je tato primární infekce porostu velice důležitá. Nejnáchylnější jsou rostliny do fáze třetího listu, zejména porosty s časným zavlečením viru mohou být chorobou zcela zničené. Na jaře dochází k šíření infekce nymfami vylíhlými z přezimujících vajíček a nakaženými při sání na nemocných rostlinách (sekundární rozšiřování infekce v porostu). Hostitelem křiska polního jsou i nekulturní plané trávy, předpokládá se proto i migrace mezi volnými plochami a obhospodařovanými pozemky a dlouhé migrační období. Některé odrůdy obilnin křísek polní více preferuje, odrůdová preference je proto určitým faktorem rozhodujícím o míře napadení porostů. Zajímavá je i uváděná střídavá

infekceschopnost a neinfekceschopnost nakažených jedinců jak u dospělců, tak u nymf. (Vacke, 1971).

2.6 Diagnostika WDV

Pro diagnostikování virového onemocnění je možné aplikovat několik metod. Mezi metody s významem pro rostlinolékařskou diagnostiku patří:

- **Polní diagnostika**
- **ELISA test**
- **Testování pomocí PCR**

Polní diagnostika je založena na symptomatice. Je zde nutná určitá zkušenost hodnotitele, neumožňuje nám bezpečně zjistit příčinný vir. Její aplikovatelnost přichází až v době, kdy se na rostlinách projevují příznaky, což je u ozimů někdy koncem března a v průběhu dubna. Projev příznaků umožňuje zhodnotit závažnost poškození porostu v celé jeho ploše i se snadným vyhledáváním případných ohnisek napadení. Velká vypovídací hodnota je však snížena obdobím, kdy je možné polní diagnostiku provádět, pro likvidaci silně zasaženého porostu a jeho řádné nahrazení jinou plodinou je příliš pozdě.

ELISA test je laboratorní sérologická metoda využívající protilátek, kdy je vzorek testován na přítomnost virového proteinu. K diagnostice virů v rostlinném materiálu se používá jeho modifikace DAS-ELISA test (Double Antibody Sandwich – Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Kromě příslušného přístrojového vybavení je nutné mít k dispozici specifické protilátky na protein viru. Je možné zpracovat velké množství vzorků, je nutné však pečlivě přistupovat k jejich odběru, aby byl získán dostatečně reprezentativní vzorek. Odběr reprezentativního vzorku je vůbec nejzodpovědnější částí diagnostiky ELISA testem. ELISA test je spolehlivým nástrojem pro rozlišení příčinného viru příznakových rostlin. Citlivost testu je určitým rizikem v latentní fázi choroby.

Testování vzorků pomocí PCR (Polymerase Chain Reaction) představuje při diagnostice viru WDV laboratorní detekci výskytu virové DNA v odebraném vzorku s mimořádnou citlivostí zaručenou mnohonásobným namnožením vhodné části DNA, jejíž přítomnost se poté stanoví gelovou elektroforézou. Pro pozitivní výsledek stačí teoreticky zachytit i jedinou molekulu DNA – jedinou částici viru v testovaném vzorku. Nevýhodou je vysoká cena testování většího množství vzorků.

2.6.1 Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction-PCR)

V této metodice je uveden protokol pro duplex PCR. V reakci jsou požity primery pro univerzální detekci pšeničného a ječného kmene WDV. Amplifikovaný produkt délky 802 bp nás jednak informuje o přítomnosti resp. nepřítomnosti viru WDV ve vzorku křiska polního a jednak slouží jako výchozí produkt pro následné štěpení restrikční endonukleázou (RFLP), jímž lze určit kmen viru. Druhý pár primerů amplifikuje úsek DNA části konzervativního úseku ribozomální DNA čeledi *Cicadellidae*. Tento úsek slouží jako tzv. vnitřní kontrola, která potvrzuje správnost izolace DNA a provedení PCR.

2.6.1.1 Odběr vzorků

Odběr křiska polního provádíme na podzim na vzešlých výdrolech, v ponechaném zeleném strništi anebo na mezích a travnatých cestách v blízkosti budoucích ozimů a potom včas 1x na vzešlých ozimech. K odběru používáme smýkání entomologickou sítí. Smýkáme za slunného a bezvětrného počasí po oschnutí rostlin. Aktivita křísků klesá, je-li teplota nižší než 10°C, optimální teplota pro smýkání je od 15 °C. Do sítě mohou být odchyceni dospělci i nymfy. Pro spolehlivou determinaci druhu používáme pouze dospělce, které vybíráme ze smýkadla exhaustorem. Poté homogenizujeme každého jednotlivého křiska samostatně (viz. kapitola 8.2) a z takto připravených vzorků izolujeme DNA.

Odběr na jaře provádíme u nymf 1x na ozimech (od poloviny května, kdy lze již předpokládat vylíhnutí nymf z vajíček). Vybíráme přednostně prosvětlená řidší místa porostů. Jarní infekce ozimů a jařin však nemají takový význam a hospodářsky škodlivé jsou pouze zřídka. U jařin jsou většinou infikovány rostliny v okrajových partiích pozemku.

2.6.1.2 Homogenizace

Před samotnou homogenizací vložíme křiska polního (vždy jednoho jedince) do 1,5 ml zkumavky. Umístěním mikrozkumavky do tekutého dusíku nebo do mrazícího boxu provedeme usmrcení křiska. Takto připravené vzorky můžeme uchovávat při teplotách pod mínus 20° C až po několik let.

Vlastní homogenizaci nelze provádět běžným způsobem třením vzorku v třecí misce v tekutém dusíku. Vzorek je příliš malý pro tento způsob zpracování a rozhodně by nebylo možné přenést tento vzorek kvantitativně z třecí misky do mikrozkumavky k následné izolaci DNA. Proto se k homogenizaci používá minishaker (Pellet pestles a Cordless motor, Sigma – katalogové č. Z359971 (Obr 5, 6), kterým se křísek rozdrtí přímo ve zkumavce. Homogenizaci provádíme těsně před samotnou izolací DNA.

K homogenizaci použijeme chemikálie z komerčního extrakčního kitu MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit firmy Epicentre. Nejdříve si tedy do zkumavky o objemu řádově několik ml (velikost zkumavky zvolíme podle odpovídajícího množství vzorků, které se chystáme homogenizovat) připravíme lyzační roztok smícháním 300 µl Tissue and Cell Lysis Solution a 1 µl Proteinase K na jeden vzorek (roztok připravujeme vždy čerstvý a pro takový počet vzorků, z něhož budeme následně izolovat DNA). Do 1,5 ml zkumavky s křískem přidáme 10 µl připraveného lyzačního roztoku a pomocí minishakeru kříska rozdrtíme tak, aby v roztoku nebyly viditelné větší části (cca 30 – 60 s, popřípadě i déle). Poté doplníme objem na 300 µl z připraveného roztoku (tj. přidáme 290 µl lyzačního roztoku).

Důsledná homogenizace (rozdrcení kříska ve zkumavce) je velice důležitým krokem pro získaní požadovaného množství DNA. Ponechání větších částic kříska v homogenátu může vést k citelnému snížení extrahované DNA ve vzorku, což by mohlo zapříčinit falešné negativní výsledky při následné PCR. Také je důležité vždy měnit homogenizační tyčinku (Obr 6 B) pro každý vzorek. Tyčinky musí být vždy před použitím sterilizovány v autoklávu.

Obr 5 Minishaker – bezdrátový motor (Sigma) s homogenizační tyčinkou

Obr 6 Motor (**A**) a výměnná homogenizační tyčinka (**B**) (Sigma)

2.6.1.3 Izolace DNA

Pro izolaci celkové DNA z kříska polního doporučujeme použít komerční extrakční kit MasterPure™ DNA and RNA Purification Kit firmy Epicentre Biotechnologies. Kromě tohoto kitu jsme testovali i komerční extrakční soupravy GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma) a DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Ovšem námi vyizolovaná DNA těmito kity nedosahovala požadovaných parametrů. Naměřená koncentrace DNA získaná pomocí kitu firmy Qiagen byla velice nízká (řádově 10 x nižší než u kitu firmy Epicentre) a koncentrace DNA extrahovaná kitem firmy Sigma byla dokonce spektrofotometrem nedetekovatelná.

Komerční kit MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit firmy Epicentre Biotechnologies nepoužívá kolonkový systém izolace DNA jako kity výrobců Qiagen a Sigma, ale nukleové kyseliny se získávají precipitací a následným vytvořením pelety DNA (Shanke a Watson, 2009). Tento kit dále umožňuje izolaci jak DNA tak i RNA (i obojí). Izolaci provádíme podle návodu výrobce. Na obr 7 je znázorněno přehledné schéma izolace DNA tímto kitem.

Protokol izolace DNA komerční soupravou MasterPure™ DNA and RNA Purification Kit (Epicentre)

A. Lýza

1. Lýzi buněk jsme částečně provedli v průběhu homogenizace vzorku pomocí minishakeru v lyzačním roztoku
2. dále inkubujeme homogenizované vzorky ve vodní lázni při 65 ° C 15 minut (vortexujeme každých 5 minut)

B. Přečištění

3. ochladíme vzorek na 37 °C a přidáme **1 µl** (5 µg / µl) **Rnase A** ke vzorku a dobře promícháme
4. inkubujeme při 37 ° C po dobu 30 minut
5. umístíme vzorky na led na 3 – 5 minut
6. přidáme **150 µl MPC Protein Precipitation Reagent** k lyzovanému vzorku a důkladně vortexujeme po dobu 10 sekund
7. centrifugujeme vzorek 10 min. při 14 000 rpm (tímto vznikne peleta nečistot - pokud je výsledná peleta čistá, malá nebo není, přidáme dalších **25 µl MPC Protein Precipitation Reagent**, promícháme a centrifugací znovu vytvoříme peletu nečistot).
8. přeneseme supernatant do čisté mikrocentrifugační zkumavky a vyhodíme peletu

C. Precipitace DNA

9. pridáme **500 µl isopropanolu*** do odebraného supernatantu a několikrát (asi 30-40 x) převrátíme zkumavky, aby došlo k řádnému promíchání (nevortexujeme)
10. peletu obsahující DNA centrifugujeme při 4 ° C 10 minut v centrifuze při 14 000 rpm
11. opatrně odlijeme isopropanol bez porušení pelety

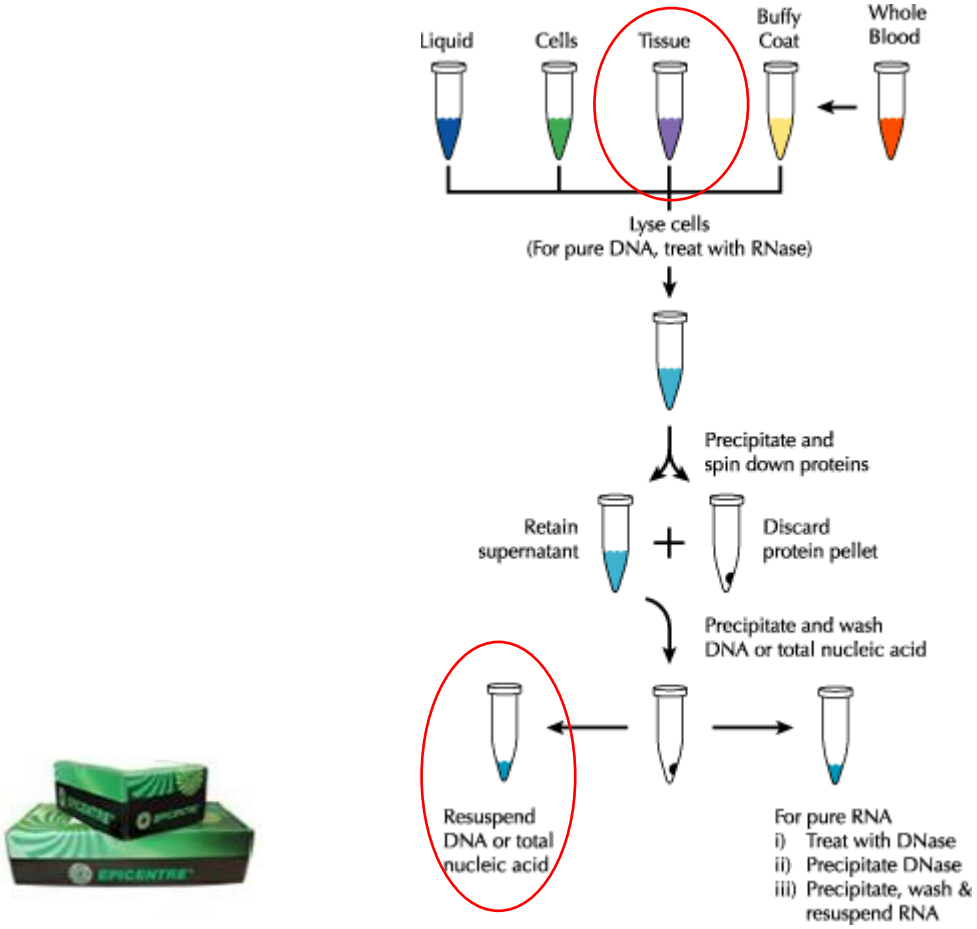
D. Promytí DNA

12. přidáme **500 µl 75 % ethanolu*** - opatrně, aby se neporušila peleta a krátce centrifugujeme pokud není peleta usazená.
13. opatrně odlijeme ethanol bez porušení pelety
14. následuje druhé promytí (tj. opakujeme krok 12 a 13)
15. pipetou opatrně odstraníme všechen reziduální ethanol a vysušíme peletu v exikatoru nebo otevřené zkumavky obrátíme dnem vzhůru a vysušíme na čisté buničině při pokojové teplotě

E. Rozpuštění DNA

16. vysušenou peletu DNA rozpustíme v **35 µl TE pufru** (TE Buffer) pomocí pipety nebo na třepačce při nižších otáčkách

* není součástí extrakční soupravy



Obr 7 Schema izolace DNA pomocí sady MasterPure™ DNA and RNA Purification Kit.

zdroj:Epicentre Biotechnologies

Kvalitu izolované DNA měříme spektrofotometricky. Vzorek nejdříve naředíme v TE pufru, obvykle 1 : 9 (DNA:TE pufr). Absorbanci měříme při 260 nm a při této vlnové délce absorbance (A_{260}) o hodnotě 1,0 odpovídá 33 µg jednovláknové DNA na ml. Čistotu vzorku lze posoudit z poměru absorbancí při 260 nm a 280 nm. Čistota vzorku nukleových kyselin, vyjádřená poměrem A260/A280 by se měla pohybovat mezi 1,8 a 2,0.

2.6.1.4 Vhodné primery pro PCR

Na základě analýzy sekvence WDV z genové banky NCBI byly navrženy primery v konzervativním úseku genomu WDV. Tyto primery amplifikují PCR fragment o velikosti 802 bp společný pro oba kmeny WDV, neboť mají homologii sekvence v daném úseku, ve kterém je primer navržen.

Dále byly navrženy primery pro amplifikaci 257 bp dlouhého úseku DNA kříska polního. Tento úsek bude sloužit jako tzv. vnitřní kontrola a informuje nás o správně provedené izolaci DNA a PCR.

Tab. 1 Primery použité k amplifikaci duplex PCR.

Primer	Sekvence	**Pozice**	Tm (°C)	GC (%)
V1Fr	5´-CGGCTTTTCGTGTGAGTGCGC-3´	30 – 48*	65,8	61
V2Rev2	5´-GGCATCGTAAAGATGTCAGTGG-3´	810 – 831*	60,4	50
PS1F	5´-AAAGCATTTGCCAAGTATGTCCTCG-3´	1037-1061**	64	44
PS2R	5´-TGTTGAGTCAAATTAAGCCGCAGG-3´	1271-1294**	64	45,8
* Pozice odpovídá sekvenci FJ546181.1 genové banky NCBI.				
**Pozice odpovídá sekvenci GI:532983 genové banky NCBI.				

2.6.1.5 Duplex PCR

Při duplex PCR jsou v reakci současně syntetizovány kopie dvou odlišně dlouhých úseků DNA najednou. Výhodou duplex PCR oproti „obyčejné“ PCR je snížení časové náročnosti a finančních nákladů na jednu reakci.

Při PCR použijeme v mastermixu 0.6 µl každého primeru (viz **tab. 1**) o koncentraci 10 µM (při konečném objemu jedné reakce 25 µl) a 1 µl cDNA.

PCR podmínky se mohou lišit podle používané polymerázy, proto zde jen pro ilustraci uvedeme protokol za použití Go Taq polymerázy s 5X Green GoTaq™ reakčním pufrem (Promega).

Mastermix 25 µl se v tomto případě skládá z

5x Green Go Taq pufru (1.5mM MgCl2)

10mM dNTPs

0.6 µl každého primeru (viz tabulka č.1) o koncentraci 10 µM

0.15 µl GO Taq polymerázy

a doplníme RNase-free H_2O do celkového množství 24 µl.

Rozpipetujeme a přidáme 1 µl DNA.

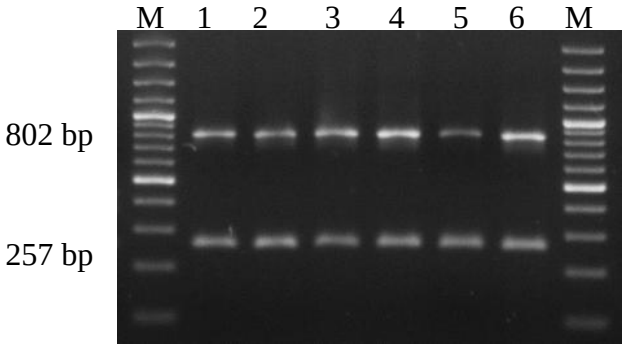
Podmínky reakce jsou následující:

KROKY PCR	teplota	čas	počet cyklů
Iniciální denaturace	95°C	2 min	1
denaturace	95°C	20 s	34
dosedání primerů	60 ° C	30 s	
polymerizace	72°C	1 min.	
konečná polymerizace	72°C	10 min.	1
chlazení	4°C	∞	

2.6.1.6 Vizualizace a hodnocení PCR produktů

Vizualizace PCR produktů probíhá za pomoci eletroforetického rozdělení fragmentů v agarózovém gelu (je doporučeno použití 2,0 - 2,5 % gelu) s předchozím označením DNA za použití etidium bromidu (0,5 µg/ml) nebo Syber Greenu (0,1 µl Syber Green/ 10 ml gel). Agarózový gel se připravuje v TAE (40 mM Trisacetát, 1 mM EDTA, pH 8) nebo TBE pufru (89 mM Tris base, 89 mM kyselina trihydrogenboritá, 1 mM EDTA, pH 8). Etidium bromid nebo Syber Green se může přidávat buď přímo do gelu, nebo namíchat do PCR produktu. Z hlediska bezpečnosti práce však doporučujeme používat Sybr Green, u kterého nebyl prokázán negativní dopad na lidský organismus. 5 µl produktu obarveného barvivem (1 µl 6x DNA Loading Dye) je nanášeno na gel a podstoupeno 3-9 V/cm po dobu 60 - 90 minut dle velikosti gelu.

PCR fragment 257 bp je interní kontrola, která informuje o správnosti izolace DNA z křisku polního a o provedení PCR (vždy musí vzniknout produkt velikosti 257 bp). Fragment 802 bp je pro specifický pro detekci WDV (viz. Obr 8). Pokud nevyjde 257 bp, je nutno zopakovat PCR nebo i izolaci (chybná izolace, inhibice PCR, atd.).



Obr 8 PCR produkty WDV pozitivních vzorků. Amplifikovaný produkt WDV má délku 802 bp. Produkt délky 257 bp je vnitřní kontrola. M je DNA marker – rozlišení 100 bp (Fermentas).

2.6.2 Délkový polymorfizmus restrikčních fragmentů (Restriction fragment length polymorphism-RFLP)

Délkový polymorfizmus restrikčních fragmentů (Restriction fragment length polymorphism-RFLP) je metodou charakterizace DNA pomocí jejího štěpení restrikčními endonukleasami na fragmenty. Identifikace a analýza produktů štěpení se provádí elektroforetickým dělením. Je známo velké množství komerčně dodávaných bakteriálních restrikčních endonukleas, které se liší od sebe tím, že rozpoznávají různé krátké sekvence nukleotidů - 4, 6, 8 a že štěpí DNA na různě dlouhé fragmenty podle individuálního pořadí bazí a podle rozpoznané sekvence. Za daných podmínek vzniká reprodukovatelný počet restrikčních fragmentů o určité opět reprodukovatelné délce (= počtu bazí). Počet i délka fragmentů je pro daný úsek specifická.

Následující protokol umožňuje za pomoci restrikční endonukleasy *Xho*I rozštěpit amplikon (802 bp) získaný duplexním PCR (viz protokol duplex PCR) na definovaný počet fragmentů specifický pro pšeničný resp. ječný kmen WDV (Kundu et al., 2009), přičemž interní kontrola (band o velikosti 257 bp), zůstává u obou kmenů nerozštěpena. Amplikon ječného kmene je enzymem *Xho* I rozštěpen na dva fragmenty o délkách 431bp a 371bp, a proto se po restrikčním štěpení na gelu objeví tři fragmenty (431bp, 371 bp a 257 bp, Obr 9 A). U pšeničného kmene ke štěpení amplikonu nedochází, proto jsou na gelu patrné stále dva bandy (802bp a 257 bp).(Obr 9 B).

2.6.2.1 Protokol RFLP

Mastermix 20 µl je složen z

12.5 µl sterilní H_2O

2 µl pufru

5 U (0.5 µl) enzymu *Xho* I (New England Biolabs)

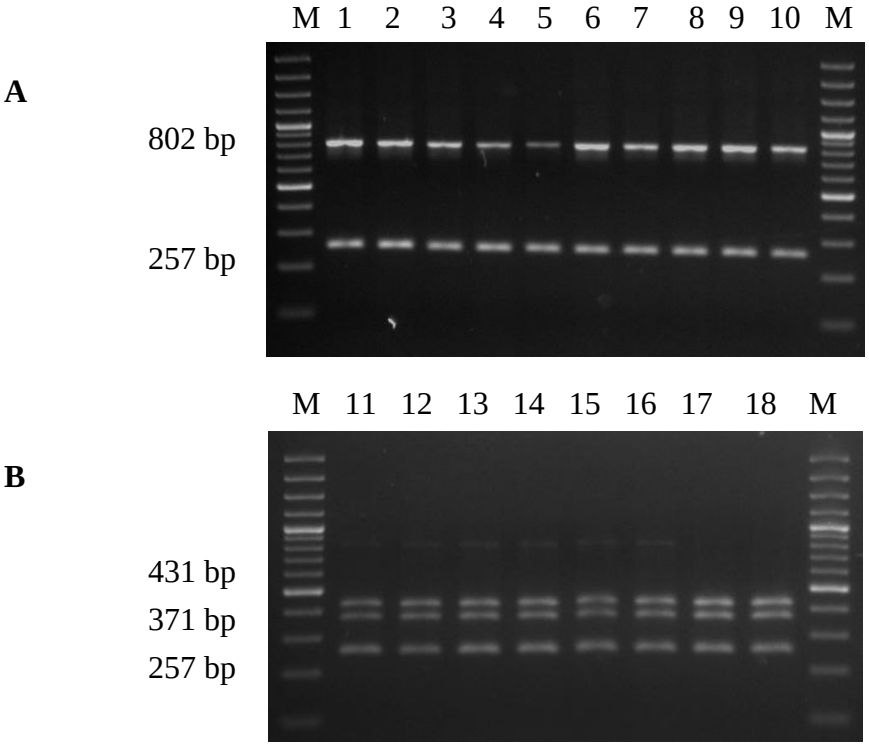
Mastermix rozpipetujeme a přidáme 5 µl PCR produktu.

Podmínky reakce jsou: 37°C po dobu 3 hod (štěpení).

Po proběhnutí štěpení okamžitě nanášíme produkt na gel nebo jej uchováváme na -20°C.

2.6.2.2 Vizualizace RFLP produktů

Na 2.5% agarózový gel nanášíme minimálně 5 µl barvivem (ethidium bromid, SYBR Green – stejný systém jako u PCR) označeného produktu - pokud se do jamek vejde větší množství produktu, je z hlediska kvalitnější vizualizace výhodné nanášet produktu více. Podstoupíme 3-9 V/cm po dobu 60 - 90 min dle velikosti gelu Opět je výhodnější delší doba, neboť se jednotlivé fragmenty od sebe více oddělí.



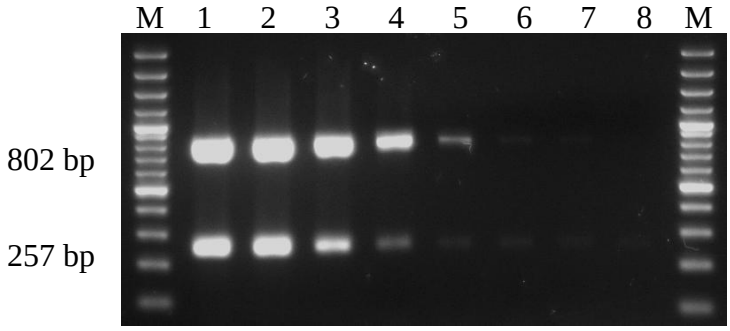
Obr 9 Fragmenty vzniklé RFLP amplikonů PCR za použití restrikční endonukleázy *Xho* I. Vzorky 1 až 10 jsou infikovány pšeničným kmenem (**A**) a vzorky 11 až 18 jsou infikovány ječným kmenem WDV (**B**). M je DNA marker – rozlišení 100 bp (Fermentas).

2.6.3 Hodnocení diagnostické citlivosti a specifity

Specifita a citlivost této eseje byla porovnána s metodou DAS – ELISA (Double antibody sandwich - enzyme linked immunosorbent assay), běžně používanou variantou ELISA testu v rostlinné virologii, kde antigen nejdříve reaguje se specifickými protilátkami navázanými na povrch pevného nosiče a je pak detekován specifickými protilátkami značenými enzymem, který v případě pozitivního vzorku zviditelní reakci rozkladem vhodného chromogenního substrátu (Albertson, 2006).

Jelikož bylo ke zjištění přítomnosti viru v křísku polním spotřebováno vždy celé tělo tohoto hmyzu, a to v případě provádění obou metod, tedy PCR a ELISA, nebylo možné provést porovnání těchto metod v totožných vzorcích. K porovnání byly tedy použity vzorky jedinců kříska polního odebrané ze stejných infekčních rostlin. Metodou PCR bylo zpracováno 20 vzorků kříska polního, přičemž WDV byl detekován ve všech vzorcích (tj. 100 % vzorků bylo pozitivních). Testem ELISA byl zpracován stejný počet vzorků a taktéž 100 % vzorků bylo pozitivních.

Dále byla citlivost PCR ověřena pomocí ředění templátové DNA. Virus byl detekován ještě při 100 000 násobném ředění DNA (**Obr 10**). ELISA testem bylo možné virus spolehlivě detekovat jen do čtyřnásobného ředění. Z těchto výsledků vyplývá, že metoda PCR je pro detekci WDV daleko citlivější než ELISA test, a to řádově 100 000krát.



Obr 10 Citlivost PCR - Detekce ředěné templátové DNA v PCR. Vzorek 1 až 8 přestavuji tentýž vzorek vždy v desetinásobném ředění oproti předchozímu ($1x10^{-1}$ až $1x10^{-8}$). M je DNA marker – rozlišení 100 bp (Fermentas).

Dále nebylo možné provést ověření správnosti determinace kmenů tohoto viru metodou ELISA, protože tímto testem lze virus detekovat, ale nelze rozlišit jednotlivé kmeny WDV. Potvrzení správnosti a citlivosti determinace kmenů metodou RFLP - PCR bylo proto dosaženo odebráním jedinců křísk a polního z rostlin infikovaných pšeničným a ječným kmenem WDV. Metodou RFLP – PCR byl detekován pšeničný kmen viru v křísku odebraném z rostliny infikované pšeničným kmenem a ječný kmen v křísku, který byl odebrán z rostliny inokulované ječným kmenem. Spolehlivost metody PCR - RFLP byla tedy tímto potvrzena.

2.7 Závěr

Zakrslost pšenice patří mezi nejdůležitější virové choroby v ČR. Systém ochranných opatření by měl zahrnovat regulaci viru zakrslosti pšenice a jeho vektora. Křísek polní je doposud jediným známým vektorem WDV, který přenáší ve stádiu dospělce a nymfy. Výskyt epidemie WDV z velké míry závisí na počtu, fenologii a chování vektorů na poli. Procento infekčních jedinců se v různých období liší. Nejvyšší výskyt virózu přenášejících křísků se objevuje začátkem léta a klesá od července do září.

Cílem této metodiky bylo vyvinutí rutinní diagnostické metody, která umožní spolehlivě detekovat virus v přenašeči. Včasná detekce viru v tomto vektoru může přispět k rozhodnutí o oprávněnosti zásahu proti infekčnímu přenašeči.

3 Srovnání „novosti“ postupů

V České republice nebylo doposud sledováno procentuální zastoupení jedinců křísk a polního přenášející WDV. Zjišťování přítomnosti viru v přenašeči umožní předpovědět potenciální epidemii WDV a v případě vyššího počtu neinfekčních křísků, který jinak porost výrazně nepoškozuje, omezit zbytečné náklady na regulaci tohoto vektora.

4 Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika je určena pro diagnostickou laboratoř statní rostlinolékařské správy a umožňuje detekci viru zakrslosti pšenice (*Wheat dwarf virus*-WDV) na úrovni kmenů v jejich vektoru křísku polním. Jsou zde uvedeny metody detekce WDV pomoci PCR, kde je možné kromě stanovení viru také určit správnost detekce využitím vnitřní kontroly

specifické pro křiska polního. Metoda RFLP a její využití umožňuji rovněž specifickou identifikace pšeničného a ječného kmenu WDV v křísku polním.

Metodiku je možné uplatnit při monitoringu výskytu virunosných křísků polních v dané populaci tohoto vektora a k signalizaci viróz zakrslosti pšenice, což umožní aplikaci včasných ochranných opatření vůči výskytu a šíření této hospodářsky nejvýznamnější choroby obilnin.

5 Seznam související literatury

Albertson S.E. 2006: Testing Methods for seed – transmitted viruses: Principles and protocols. *CABI*. 268s.

Busch T. 2008: Schadinsekten im Getreide. In Vietinghoff J. (ed.): Ergebnisse und Empfehlungen zum Integrierten Pflanzenschutz im Ackerbau 2008. 39–43.

Guglielmino A., Virla E.G., 1997: Postembryonic development and biology of *Psammotettix alienus* (Dahlbom) (*Homoptera, Cicadellidae*) under laboratory conditions. Boll. Zool. Agr. Bachic. 29: 65–80.

Javorek V. 1978: Kapesní atlas ploštic a křísů. *SPN Praha*. 397 pp.

Lindblad M. Arenö P. 2002: Temporal and spatial population dynamics of *Psammotettix alienus*, a vector of *Wheat dwarf virus*. Int. J. Pest Man. 48: 233–238.

Lindsten K. Vacke J. 1991: A possible barley adapted strain of *Wheat dwarf virus* (WDV). Acta Phytopathol. Entomol. Hungarica, 26:175-180.

Malenovský I. 2006: Křísi (*Auchenorrhyncha, Hemiptera)* CHKO Kokořínsko. In: Beran, L. (ed.), Bezobratlí Kokořínska. Bohemia centralis 27: 295-322.

Manurung B. 2002: Untersuchungen zur Biologie und Ökologie der Zwergzikade Psammotettix alienus Dahlb. (Auchenorrhyncha) und zu ihrer Bedeutung als Vektor des *Wheat dwarf virus* (Weizenverzwergungs-Virus, WDV). Martin–Luther-Universität Halle-Wittenberg, Diss., 112 s.

Manurung B., Witsack W., Mehner S., Grünzig M., Fuchs E. 2000: Vorläufige Ergebnisse zur Populationsdynamik der Zikade Psammotettix alienus (DAHLBOM,1851) (*Homoptera, Auchenorrhyncha*), einem Vektor für *Wheat dwarf virus* (WDV). (Provisional results on the populationsdynamics of the leafhopper *Psammotettix alienus* (DAHLBOM,1851) (*Homoptera, Auchenorrhyncha)*, vektor of *Wheat dwarf virus* (WDV). 52. Deutsche Pflanzenschutztagung Freising-Weihenstephan, Poster Nr. 697.

Manurung B., Witsack W., Mehner S., Grüntzig M., Fuchs E. 2005: Studies on biology and population dynamics of the leafhopper *Psammotettix alienus* Dahlb. (*Homoptera: Auchenorrhyncha*) as vector of *Wheat dwarf virus* (WDV) in Saxony-Anhalt, Germany. J. Plant Dis. Protect. 112 (5): 497–507.

Mehner S, Manurung B, Gruntzig M, Habekuss A, Witsack W, Fuchs E. 2003: Investigations into the ecology of the *Wheat dwarf virus* (WDV) in Saxony-Anhalt, Germany. J. Plant Dis. Protect. 110: 313-323.

Schalk H.J., Matzeit V., Schiller B., Schell J., Gronenborn B. 1989: Wheat dwarf virus, a geminivirus of graminaceous plants needs splicing for replication. EMBO J. 8: 359-364.

Shanke J.T., Watson J. 2009: The MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit: A Flexible System for Rapid Isolation of DNA and RNA from a Wide Variety of Sources. Epicentre Technologies.Dostupné na http://www.epibio.com/f5_2/f5_2mp.asp

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

Stanley J., Bisaro D.M., Briddon R.W., Brown J.K., Fauquet C.M., Harrison B.D., Rybicki E.P., Stenger D.C.: Geminiviridae. In Virus Taxonomy (VIIIth Report of the ICTV). Edited by: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. Elsevier/Academic Press, London; 2005:301-306.

Vacke J 1961: *Wheat dwarf virus* disease. Biol. Plantar. Praha 3: 228–33.

Vacke J. 1971: Zakrslost pšenice. [Závěrečná zpráva.] Praha – Ruzyně, VÚRV. 73 pp.

Vacke J. 1972: Host plant range and symptoms of *Wheat dwarf virus.* Věd. Práce VÚRV, Praha-Ruzzně, 17: 151-162.

Vacke J. Cibulka R. 1999**:** Silky bent grass (*Apera spica-venti* [L.] Beauv.) – a new host and reservoir of *Wheat dwarf virus*. Plant Protect. Sci. 35: 47–50.

Vacke J., Kvarnheden A., Lindblad M., Lindsten K. 2004: Wheat dwarf. In Lapierre H., Signoret P. A. eds. Viruses and Virus Diseases of Poaceae (*Gramineae*). INRA, Paris, France. pp: 478, 590-593.

6 Seznam publikací, které předcházely metodice

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

Ripl J., Holý K., Kocourek F., Kumar J. 2008: Metodika ochrany obilnin proti viru zakrslosti pšenice a jeho vektoru křísku polnímu. Praha – Ruzyně, VÚRV v.v.i., pp.26.

Název: **Metodika molekulární detekce pšeničného a ječného kmene viru zakrslosti pšenice v jejich vektoru křísku polním pomocí PCR - RFLP**

Autoři: Jaňourová B., Ripl J., Kumar J.

Vydal: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

Tisk: CD

Počet stran: 25

Vydání: první

Rok vydání: 2009

ISBN: 978-80-7427-027-7

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2009