



národní
úložiště
šedé
literatury

Metodika fenotypizace rezistence broskvoní k viru šarky švestky

Salava, Jaroslav; Polák, Jaroslav
2014

Dostupný z <http://www.nusl.cz/ntk/nusl-181085>

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

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

Datum stažení: 21.06.2021

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní [nusl.cz](http://www.nusl.cz) .



Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i

METODIKA FENOTYPIZACE REZISTENCE BROSKVONÍ K VIRU ŠARKY ŠVESTKY

Jaroslav Salava & Jaroslav Polák



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

2014

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.



Metodika fenotypizace rezistence broskvoní k viru šarky švestky

Doc. Dr. Ing. Jaroslav Salava & Doc. Ing. Jaroslav Polák, DrSc.

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Kontakt na vedoucího autorského kolektivu: salava@vurv.cz

Metodika vznikla za finanční podpory Ministerstva zemědělství České republiky a je výstupem řešení výzkumného záměru MZE0002700604 “Udržitelné systémy pěstování zemědělských plodin pro produkci kvalitních a bezpečných potravin, krmiv a surovin“.

Metodika je určena pro Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, šlechtitele broskvoní, ovocné školkaře, výzkumné pracovníky a další zájemce o pěstování broskvoní. O uplatnění metodiky byla 10. listopadu 2014 podle ustanovení § 269 zákona 3313/1991 Sb., obchodního zákoníku uzavřena smlouva s Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským.

Oponenti:

Ing. Michal Hnízdil - Ministerstvo zemědělství ČR, Úsek komodit, výzkumu a poradenství
Prof. Dr. Ing. Boris Krška - Mendelova univerzita v Brně, Zahradnická fakulta v Lednici

Jazyková úprava: Vydáno bez jazykové úpravy.

Autor fotografií: Jaroslav Polák

Fotografie na úvodní straně: Pascal Gentit, Jaroslav Polák

Metodika byla schválena Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským pod č.j. UKZUZ 086823/2014.

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2014

ISBN 978-80-7427-164-9

Abstrakt:**Metodika fenotypizace rezistence broskvoní k viru šarky švestky**

Šarka švestky, jejímž původcem je virus šarky švestky (*Plum pox virus*, PPV) je ekonomicky nejvýznamnějším virovým onemocněním ovocných dřevin. Vzhledem k tomu že v České republice není možná úplná eradikace PPV, je nutné najít jiný způsob regulace tohoto patogena. Jako nejperspektivnější se jeví šlechtění nových odrůd na rezistenci. Metodika poskytuje přesný pracovní postup pro testování rezistence broskvoní k PPV. Metodický postup je založen na vizuálním hodnocení příznaků choroby na listech a plodech, stanovení přítomnosti viru v rostlinách pomocí technik ELISA a RT-PCR a biologickém testu na indikátorové rostlině.

Abstract:**Methodology for the phenotyping resistance to *Plum pox virus* in peach**

Sharka disease, which is caused by the *Plum pox virus* (PPV), is the most economically important virus disease in fruit trees worldwide. Since it is not possible to completely eradicate PPV in the Czech Republic, it is necessary to find another way to control this pathogen. The most promising seems to be the breeding of new cultivars for resistance. This methodology provides a comprehensive protocol for testing PPV resistance in peach. It is based on visual assessment of disease symptoms on leaves and fruits, and determining the presence of the virus in plants using ELISA and RT-PCR techniques.

Klíčová slova: *Prunus persica*; *Plum pox virus*; PPV; symptomy, ELISA, IC-RT-PCR; GF-305; biologický test

Keywords: *Prunus persica*; PPV; sharka; symptoms; ELISA; IC-RT-PCR; GF-305; biological test

OBSAH

Abstrakt, abstract	i
Obsah	ii
Seznam použitých zkratk	5
1. Cíl metodiky	6
2. Úvod	7
3. Vlastní popis metodiky	9
3.1. Vizuální hodnocení příznaků	9
Umělá infekce testovaného rostlinného materiálu	9
Hodnocení příznaků na listech a plodech	9
Stupnice pro hodnocení intenzity a typu příznaků	10
3.2. Stanovení přítomnosti viru v testovaných rostlinách	12
3.2.1. ELISA test pro zachycení specifických antigenů PPV	12
Princip testu	12
Odběr a skladování vzorků	12
Pracovní postup ELISA testu	12
Interpretace výsledků ELISA testu	13
3.2.2. IC- RT-PCR test pro amplifikaci specifických sekvencí PPV	13
Princip testu	13
Odběr a skladování vzorků	13
Příprava vzorků pro testování	14
Imunopoutání	14
Reverzní transkripce a polymerázová řetězová reakce	14
Analýza produktů RT-PCR	15
Interpretace výsledků RT-PCR testu	15
Purifikace celkové RNA pomocí RNeasy Plant Mini Kit	16
3.3. Biologický test na indikátorové rostlině ‘GF305’	17
3.4. Pravidla rozhodování	17
3.5. Vybavení laboratoře	19
3.5.1. Přístroje	19
3.5.2. Materiál	19
3.5.3. Chemikálie a roztoky	20
4. Srovnání “novosti“ postupů	23
5. Popis uplatnění metodiky	25
6. Ekonomické aspekty	26
7. Seznam použité související literatury	27
8. Seznam publikací, které předcházely metodice	29

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BSA	Bovine serum albumin
cDNA	Complementary DNA
ddH ₂ O	double distilled water
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate
DIECA	Sodium diethyldithiocarbamate
DNA	Deoxyribonucleic acid
DAS-ELISA	Double Antibody Sandwich-ELISA
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EtBr	Ethidium bromide
FLD	Ficoll loading dye
IC-RT-PCR	Immunocapture-RT-PCR
MAS	Marker-assisted selection
MENDELU	Mendelova univerzita
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
pNPP	p-nitrofenylfosfát (p-nitrophenyl phosphate)
PPV	<i>Plum pox virus</i>
PVP	Polyvinylpyrrolidone
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuclease
RT-PCR	Reverse transcription-PCR
TAE	TRIS-acetate-EDTA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
VŠÚO	Výzkumný a šlechtitelský ústav ovockářský
VÚRV, v.v.i.	Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
ZF	Zahradnická fakulta

1) CÍL METODIKY

Metodika si klade za cíl vypracovat komplexní metodický postup fenotypizace rezistence odrůd, klonů, novošlechtění a hybridů broskvoně k viru šarky švestky (*Plum pox virus*, PPV). Metodický postup fenotypizace rezistence k PPV zahrnuje přípravu testovaných rostlin, jejich umělou infekci konkrétním kmenem PPV, sledování symptomů infekce na listech a plodech, objektivní stanovení přítomnosti viru pomocí sérologického testu (DAS-ELISA), potvrzení přítomnosti viru v rostlinách pomocí molekulárního testu (IC-RT-PCR), případně pomocí biologického indikátoru 'GF-305' a konečné stanovení stupně rezistence k PPV testovaných genotypů broskvoní.

2) ÚVOD

Šarka peckovin je celosvětově ekonomicky nejvýznamnější virovou chorobou peckovin (NÉMETH 1994; KÖLBER 2001). Ztráty působí nejen snížením výnosu plodů, jejich velikosti a kvality, ale také zhoršením kondice a předčasným odumíráním napadených stromů. Při pokusech o její regulaci byly zlikvidovány tisíce hektarů sadů. Celosvětové náklady na zvládnutí šarky v posledních 30 letech byly odhadnuty na více než 10 miliard EUR (CAMBRA *et al.* 2006).

Choroba šarka, jejímž původcem je virus šarky švestky (*Plum pox virus*, PPV), byla poprvé pozorována na švestkách v Bulharsku v době první světové války (ATANASSOFF 1932). Následně byla tato choroba popsána v Bulharsku i na meruňkách (ATANASSOFF 1935). Později se šarka rozšířila do téměř celé Evropy, severní Afriky, Indie a Čile. V nedávné době byl virus PPV detekován v USA a Kanadě (KÖLBER 2001).

Výskyt této virové choroby byl v Československu poprvé prokázán v roce 1952 (SMOLÁK & NOVÁK 1956), šarka se však v Čechách a na Moravě vyskytovala dávno předtím (POLÁK *et al.* 2010).

Na stromech broskvoní pozorujeme prosvětlení a žloutnutí žilek starších listů, dubolistovou mozaiku (Obr. 2 až 5) někdy doprovázenou kroucením a tloustnutím listových čepelí. Na plodech broskvoní vznikají difuzní skvrny, kroužky nebo mapovité kresby (Obr. 6), které jsou nejvíce patrné před plnou zralostí a mohou být někdy zeslabeny v době plné zralosti.

PPV je přenášen neperzistentním způsobem s různou účinností na stiletech více než 20 druhů mšic (KUNZE & KRCZAL 1971). Může být přenášen také mechanicky, ale není přenosný pylem ani semeny (POLÁK *et al.* 2010).

Šíření viru může být omezeno pouze eradikací zdrojů infekce a používáním viruprostých množitelských materiálů (NÉMETH 1994; POLÁK *et al.* 2005). Finančně náročná eradikace probíhá v mnoha zemích. Ačkoli byla v několika případech úspěšná, obvykle jen zpomalila šíření PPV, ale nezastavila ho. Používání insekticidů udržující populace mšic, které jsou přenašeči PPV, na nízké úrovni, může pomoci zpomalit šíření PPV v oblastech, kde je výskyt PPV ojedinělý. Opakované aplikace insekticidů vedou k selekci populací mšic, které jsou k nim rezistentní, což následně ztěžuje udržitelné obhospodařování sadů ovocných dřevin. Šlechtění a pěstování rezistentních odrůd se jeví jako jediné dlouhodobé řešení problému s PPV (KEGLER *et al.* 1996, MARTÍNEZ-GÓMEZ *et al.* 2004).

V současné době existují dvě strategie získávání rezistentních odrůd: (1) identifikace přirozené rezistence přítomné v genofondu rodu *Prunus* a její přenesení do komerčních odrůd standardními šlechtitelskými postupy a (2) vytvoření rezistence prostřednictvím transgenních technologií.

Přenesení rezistence k PPV z jejích donorů za použití konvenčního křížení je strategie doposud používaná ve všech šlechtitelských programech broskvoní. Dlouhé juvenilní období a prostorové požadavky stromů avšak mají za následek finančně a časově náročný proces hodnocení, který omezuje konvenční šlechtění. Navíc dalším faktorem ovlivňujícím účinnost šlechtění je fenotypizace rezistence k šarce. Nejspolehlivější způsob fenotypizace rezistence k PPV je založen na biologickém testu. Tento test používá jako dřevinný indikátor broskvoňové semenáče 'GF-305' společně s inokulací virem prováděnou očkováním (MOUSTAFA *et al.* 2001). Protokol fenotypizace vyžaduje několik opakování každého genotypu a vizuální prohlídky v průběhu dvou až čtyř vegetačních období následované ELISA a RT-PCR testem (LOMMEL *et al.* 1982; WETZEL *et al.* 1991b). Standardizace testů rezistence se ukázala být obtížnou, jelikož existuje řada faktorů ovlivňujících tento proces, například reakce na inokulaci závisí na genotypu hostitele, kmenu viru, ročním období, kdy je

inokulace uskutečněna, fyziologickém stavu hostitelské rostliny a metodě inokulace (LLÁCER *et al.* 2007).

Hodnocení rezistence rostlin broskvoní k PPV je metodicky a časově náročný proces, který kombinuje objektivní imunochemické a molekulárně biologické postupy stanovení přítomnosti a koncentrace viru se subjektivním hodnocením intenzity a rozsahu příznaků na listech a plodech. S ohledem na vliv ročníkových faktorů a na různé mechanismy rezistence je nutné nejméně tříleté hodnocení uměle infikovaného rostlinného materiálu.

3) VLASTNÍ POPIS METODIKY

3.1. Vizuální hodnocení příznaků

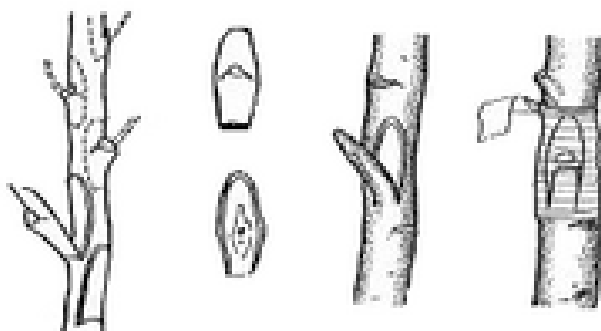
Umělá infekce testovaného rostlinného materiálu

Pro hodnocení rezistence broskvoní k PPV použijeme umělou infekci rostlin broskvoně očkovaním na podnož infikovanou silně patogenním kmenem, nejlépe originálním kmenem PPV-M. Pro hodnocení rezistence je třeba použít nejsilněji patogenní kmen viru, při použití slabě patogenního kmenu může dojít k překonání rezistence silněji patogenním kmenem viru a výsledky hodnocení tak ztrácí spolehlivost. Očkovaním na virem infikovanou náchylnou podnož nebo odrůdu docílíme stálý a rovnoměrný infekční tlak viru na testovanou rostlinu.

Podle druhu testovaného materiálu volíme infikovanou podnož, přičemž nevhodnější je stejný druh, tzn. broskvoň. Hodnotíme-li jednotlivé rostliny potomstva křížení broskvoní, použijeme jako podnož broskvoň ‘GF-305’, která je náchylná k PPV a na infekci PPV reaguje zřetelnými difúzními skvrnami na listech.

Semena ‘GF-305’, stratifikujeme 3 měsíce při 6°C. Potom je vysejeme do květináčů. Roční rostliny podnože ‘GF-305’ infikujeme kmenem PPV-M metodou “chip-budding“ (Obr. 1) použitím virem infikovaných oček infekčního zdroje ‘GF-305’ vykazujícího silné příznaky šarky. Během dalšího vegetačního období ověříme přítomnost viru v rostlinách (účinnost inokulace) hodnocením příznaků na listech a sérologicky pomocí ELISA testu. Na šarkou infikované rostliny broskvoně ‘GF-305’ naočkujeme jednotlivé rostliny z hybridního potomstva broskvoní ve třech opakováních, tzn., že od každého jedince máme tři rostliny. Dvě oka testovaného genotypu očkujeme na každou podnož. Rostliny hodnotíme po tři vegetační cykly.

Pro hodnocení rezistence odrůd, klonů a hybridů broskvoní je vhodnější jejich roubování ve třech až pěti opakováních na dvou až tříleté stromy odrůdy broskvoně náchylné k PPV (‘Redhaven’, ‘Harken’), uměle infikované virem. Během čtyř vegetačních cyklů pak spolehlivě vyhodnotíme nejen příznaky na listech (4 vegetační cykly hodnocení), ale i příznaky na plodech a peckách (2 vegetační cykly) (viz POLÁK *et al.*, 1997).



Obrázek 1: “Chip-budding“ (Forkertovo očkování) (zleva seřezávání oček, detaily seříznutého oka, naříznutá podnož a zavázané očko)

Hodnocení příznaků na listech a plodech

Rostliny broskvoní naočkované na podnoži ‘GF-305’ infikované PPV pěstujeme a hodnotíme v hmyzuprostém skleníku nebo síťovniku. V průběhu každého vegetačního cyklu pozorujeme příznaky a stanovujeme přítomnost viru v listech (Tab. 1). Sledování příznaků na listech testovaného genotypu a podnože provádíme dvakrát během vegetačního cyklu.

Poprvé hodnotíme příznaky viru na listech v době, kdy se na náchylné podnoži nebo odrůdě objeví zřetelné příznaky šarky, podruhé za čtyři týdny po prvním hodnocení. Hodnocení příznaků na listech provádíme minimálně po tři vegetační období nebo cykly.

V případě hodnocení rezistence odrůd, klonů nebo hybridů broskvoní provádíme také hodnocení příznaků PPV na plodech (Tab. 2) v době začínajícího zrání plodů. Hodnocení příznaků na plodech provádíme po dvě vegetační období.

Výskyt příznaků by měl být porovnáván s pozitivní a negativní rostlinnou kontrolou.

Stupnice hodnocení intenzity a typu příznaků

Pro hodnocení příznaků šarky na listech a plodech broskvoní používáme pětibodovou stupnici.

Tabulka 1: Stupnice hodnocení příznaků infekce PPV na listech

Fenotypová třída	Typ, intenzita a rozsah příznaků
0	Žádné příznaky
1	Velmi slabé prosvětlení žilek nebo drobné difúzní skvrny (1 – 2 listy na výhonu) (Obr. 2)
2	Mírné difúzní skvrny podél postranních žilek nebo mírná mozaika (první 3 – 4 listy na výhonu, pozorovatelné do konce června) (Obr. 3)
3	Žloutnutí žilek nebo středně silná dubolistová mozaika (prvních 5-6 listů na výhonu, přítomné i v červenci) (Obr. 4)
4	Silné žloutnutí žilek, silné žlutozelené dubolistové kroužky a kresby anebo kroucení a tloušťnutí čepelí listů (prvních 7 nebo více listů na výhonu, přítomné celou vegetaci) (Obr. 5)

Tabulka 2: Stupnice hodnocení příznaků infekce PPV na plodech

Fenotypová třída	Typ, intenzita a rozsah příznaků
0	Žádné příznaky
1	Velmi slabé difúzní skvrny na malém počtu plodů (do 15%), 1 – 2 na jednom plodu
2	Slabé difúzní skvrny nebo kroužky na menším počtu plodů
3	Středně silné difúzní skvrny a kroužky na větším počtu plodů (25 – 50%)
4	Silné difúzní skvrny a kroužky na většině, nebo všech plodech, malformace plodů



Obrázek 2: Velmi slabé příznaky infekce PPV na listech broskvoně, drobné difuzní skvrny velikosti 1-2 mm.



Obrázek 3: Mírné příznaky infekce PPV na listech broskvoně, difuzní skvrny podél postranních žilek.



Obrázek 4: Středně silné příznaky infekce PPV na listech broskvoně, dubolistová mozaika.



Obrázek 5: Silné příznaky infekce PPV na listech broskvoně, žlutozelené difuzní kroužky a kresby.



Obrázek 6: Plody odrůdy broskvoně 'Catherina' s typickými kroužky a difuzními skvrnami vyvolanými infekcí PPV.

3.2. Stanovení přítomnosti viru v testovaných rostlinách

3.2.1. ELISA test pro zachycení specifických antigenů PPV

Princip testu

Double Antibody Sandwich-Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (DAS-ELISA) používá protilátky, které jsou navázány na povrchu mikrotitrační destičky, aby zachytily antigeny. Přítomnost antigenu je detekována pomocí specifických protilátek konjugovaných s enzymem alkalická fosfatáza. Přidání substrátu tohoto enzymu (p-nitrofenylfosfát, pNPP) na závěr vyvolává, když je přítomen antigen, tvorbu žlutého produktu detekovatelného při vlnové délce 405 nm.

ELISA test se může lišit od zde popsaného postupu, záleží na doporučení dodavatele soupravy. Princip je však stejný.

Odběr a skladování vzorků

Správný odběr reprezentativních vzorků má zásadní význam pro spolehlivou detekci viru šarky švestky sérologickými technikami. Jestliže jsou přítomny listy s typickými příznaky, tak by měly být odebrány. U rostlin bez příznaků odebereme jako standardní vzorek pět výhonů nebo deset plně rozvinutých listů z celé koruny každého stromu, ze střední části každé odebrané větve. Vzorky odebíráme během měsíce června, později klesá obsah viru v listech. Rostlinný materiál přednostně vybíráme z vnitřní části koruny stromů. Vzorky listů by měly být před zpracováním skladovány při teplotě 4°C a analýza musí být provedena nejpozději do 7 dnů.

Pracovní postup ELISA testu

Potahení povrchu jamek mikrotitrační destičky specifickými protilátkami

1. Rozpusťme jednu tabletu potahovacího pufru ve 100 ml deionizované vody. Naředíme zásobní roztok potahovací protilátky podle návodu potahovacím pufrem (nejčastěji 1000x, tj. 10 µl v 10 ml pufru) a pipetujeme po 200 µl do jednotlivých jamek.
2. Zakryjeme mikrotitrační destičku samolepicí krycí fólií.
3. Inkubujeme destičku při 35°C po 4 hodiny (nebo při 4-6°C přes noc).
4. Promývání: Rozpusťme obsah jednoho sáčku promývacího pufru v 5 000 ml deionizované vody. Provádíme-li promývání manuálně, vyprázdníme jamky do výlevky nebo odpadního kontejneru obrácením destičky a promyjeme destičku 3-4x promývacím pufrem pomocí stříčky (nebo Pasteurovy pipety). Aby došlo k promytí, necháme pufr v jamce v každém promývacím cyklu působit alespoň 30 vteřin. Odstraníme zbytky kapaliny vyklepáním na papírový ručník. Pokud máme větší počet destiček, promytí v automatické promývačce zajistí dokonalé odstranění všech látek, které nejsou vázány na stěně mikrotitrační destičky.

Inkubace rostlinného extraktu

1. Naředíme 10x koncentrovaný extrakční pufr deionizovanou vodou. Navážeme 1 g rostlinného materiálu jako průměrný vzorek ze šesti listů. Listy nařežeme na malé kousky a rozdrtíme je ručním homogenizátorem v extrakčních sáčcích obsahujících extrakční pufr (ředění 5-20x podle použitého extrakčního pufru a rostlinného vzorku, viz informace o výrobku). Pipetujeme po 200 µl každého vzorku do jednotlivých jamek, včetně kontrol, ve dvou opakováních.
2. Nezapomeneme kromě vzorků na kontroly: pozitivní kontrolu, negativní kontrolu a slepý vzorek (blank; do jamky pipetujeme 200 µl extrakčního pufru).

3. Zakryjeme mikrotitrační destičku samolepící krycí fólií a inkubujeme jí při +4°C přes noc (16 hodin).
4. Mikrotitrační destičku 3-4x promyjeme promývacím pufrem (viz bod 4).

Detekce zachyceného antigenu konjugátem protilátka-alkalická fosfatáza

1. Naředíme 10x koncentrovaný konjugátový pufr deionizovanou vodou a pak v něm naředíme zásobní roztok konjugátu protilátka-alkalická fosfatáza podle návodu (nejčastěji 1000x, tj. 10 µl v 10 ml pufru) a pipetujete po 200 µl do jednotlivých jamek.
2. Zakryjeme mikrotitrační destičku samolepící krycí fólií a inkubujeme jí při 35°C po 4 hodiny.
3. Mikrotitrační destičku 3-4x promyjeme promývacím pufrem (viz bod 4).

Přidání chromogenního substrátu p-nitrofenylfosfát (pNPP)

1. Naředíme 5x substrátový pufr deionizovanou vodou a rozpustíme v 1 ml substrátového pufru 1 mg substrátu pNPP (1 mg/ml).
2. Pipetujeme po 200 µl do jednotlivých jamek.
3. Inkubujeme mikrotitrační destičku v pokojové teplotě (20-25°C) ve tmě.
4. Sledujeme barevnou reakci alkalická fosfatáza-substrát a po 60-120 minutách inkubace (zřetelné žluté zbarvení pozitivních kontrol) jí vyhodnotíme fotometricky (ELISA reader) při vlnové délce 405 nm. Výsledky mohou být odečítány tak dlouho, dokud jamky negativní kontroly zůstávají čiré.

Interpretace výsledků ELISA testu

Jamky, ve kterých se vytvoří zbarvení, představují pozitivní výsledky. Jamky, ve kterých se nevytvoří výrazné zbarvení, označují negativní výsledky.

Vzorek považujeme za pozitivní, resp. danou rostlinu, z níž vzorek pochází, považujeme za infikovaný PPV, když průměrná hodnota absorbancí obou jeho jamek je nejméně třikrát vyšší než průměrná hodnota absorbancí negativní kontroly. Pokud je však hodnota absorbance vzorku nízká a pohybuje se v rozmezí tří až šestinásobku průměrné hodnoty zdravé kontroly, imunoenzymatický test opakujeme s nově odebraným vzorkem.

Výsledky testu jsou správné pouze v případě, když jamky pozitivní kontroly dávají pozitivní výsledek a jamky pufru zůstávají čiré.

3.2.2. IC-RT-PCR pro amplifikaci specifických sekvencí PPV (Wetzel *et al.* 1992)

Princip testu

PPV je detekován v listech broskvoní. Virové částice PPV jsou nejprve zachyceny na protilátku (immunocapture, IC, imunopoutání, imunovázání), pak je virová RNA zpětně přepsána (reverzní transkripce, RT) do komplementární DNA (cDNA) a nakonec jsou fragmenty DNA specifické pro PPV namnoženy pomocí PCR. Produkty RT-PCR jsou detekovány agarózovou elektroforézou a barvením ethidium bromidem.

Tato technika odstranila problém spojený s přechodem inhibitorů PCR z rostlinných extraktů do reakční směsi.

Odběr a skladování vzorků

Viz kapitola "Odběr a skladování listů" pro ELISA test (str. 12). Správný odběr reprezentativních vzorků má zásadní význam pro spolehlivou detekci viru šarky švestky molekulárními technikami. Otrhané listy co nejrychleji umístíme do -20°C. Po delší dobu je lépe vzorky skladovat při -70°C. Pro izolaci RNA použijeme stejně velkou (poměrnou) část každého listu.

Příprava vzorků pro testování

1. Navážíme 1 g rostlinného materiálu jako průměrný vzorek ze šesti listů, listy nařežeme na malé kousky a vložíme je do vhodných plastových sáčků.
2. Přidáme 20 objemů extrakčního pufru (Cambra *et al.*, 1994) (viz. Chemikálie a roztoky) a vzorek rozdrtíme pomocí ručního homogenizátoru Homex 6 (Bioreba) nebo malým ručním válečkem, gumovou paličkou nebo jiným nástrojem.

Imunopoutání (immunocapture, IC) (Wetzel *et al.*, 1992)

1. Naředíme (1 $\mu\text{g/ml}$) polyklonální nebo monoklonální protilátky (např. Bioreba) specifických pro PPV v karbonátovém pufru s pH 9,6 (viz. Chemikálie a roztoky).
2. Naředěné protilátky rozdělíme po 100 μl do tenkostěnných PCR zkumavek.
3. Inkubujeme 3 hodiny při 37°C a potom zkumavky dvakrát vypláchneme 150 μl sterilního promývacího pufru (viz. Chemikálie a roztoky).
4. Odstředíme (5 min při 13 000 ot. min^{-1}) 100 μl dříve získaného rostlinného extraktu (viz. Příprava vzorků pro testování str. 14).
5. Supernatant použijeme k imunopoutání v potažených PCR zkumavkách (2 hodiny při 37°C).
6. Na závěr třikrát vypláchneme PCR zkumavky jako v předchozím kroku.

Reverzní transkripce a polymerázové řetězové reakce

- 1 Před použitím necháme roztát všechny zmražené reagenty (voda pro PCR, 10x PCR pufr, MgCl_2 , P1, P2 a směs dNTP), v průběhu přípravy reakcí reagenty uchováváme na ledu. Před začátkem přípravy master mixu šetrně promícháme všechny reagenty (krátké vortexování nebo poklepání prstem na zkumavky) a krátce je odstředíme v centrifuze.
- 2 Podle tabulky 3 připravíme ve sterilní 1,5 ml zkumavce prosté nukleáz (na ledu) master mix. Master mix obsahuje všechny komponenty nutné pro RT-PCR. Každý experiment musí zahrnovat dvě negativní kontroly (extrakční pufr a homogenát ze zdravé hostitelské rostliny) a pozitivní kontrolu (homogenát z rostliny infikované PPV). Připravujeme o 10% větší objem master mixu než je potřebný pro celkový počet reakcí. Když manipulujeme s RNA, vždy používáme rukavice.

Tabulka 3: Složení reakční směsi pro RT-PCR

Reagenty	Výsledná koncentrace	$\mu\text{l}/1$ reakci
H_2O pro PCR		16,55
10x PCR pufr (10x)	1x	2,50
MgCl_2 (25 mM)	1,5 mM	1,50
Triton X-100	0,3%	2,00
Inhibitor RNáz (5 U μl^{-1})	5 U/reakce	1,0
Primer P1 (25 μM)	1,0 μM	1,00
Primer P2 (25 μM)	1,0 μM	1,00
AMV reverzní transkriptáza (10 U μl^{-1})	1 U/reakce	0,10
Směs dNTP (25 mM)	0,25 mM	0,25
<i>Taq</i> DNA polymeráza (5U μl^{-1})	0,5 U/reakce	0,10
Celkový objem reakce		25,00

- 3 Důkladně promícháme master mix (např. vortexováním), krátce ho odstředíme v centrifuze a rozdělíme příslušný objem do potažených PCR zkumavek (na ledu).
- 4 Na teplotním cykleru nastavíme program uvedený v tabulce 4 na straně 17. Program zahrnuje kroky pro reverzní transkripci i PCR.
- 5 Spustíme RT-PCR program, zatímco PCR zkumavky jsou stále umístěny na ledu. Počkáme až teplota cykleru dosáhne 50°C. Potom přeneseme PCR zkumavky do cykleru a hned zpustíme PCR program. Po amplifikaci skladujeme vzorky přes noc při teplotě 2-8°C nebo po delší dobu při teplotě - 20°C.

Tabulka 4: Teplotní profil RT-PCR...: Tabulka Podmínky amplifikace RNA PPV pomocí RT-PCR

Cykly	Teplota	Čas
Reverzní transkripce 1	50°C	30 minut
Počáteční aktivace 1	95°C	15 minut
Amplifikace 40	Denaturace	94°C
	Nasedání primerů	60°C
	Prodlužování primerů	72°C
Závěrečné prodlužování primerů 1	72°C	10 minut

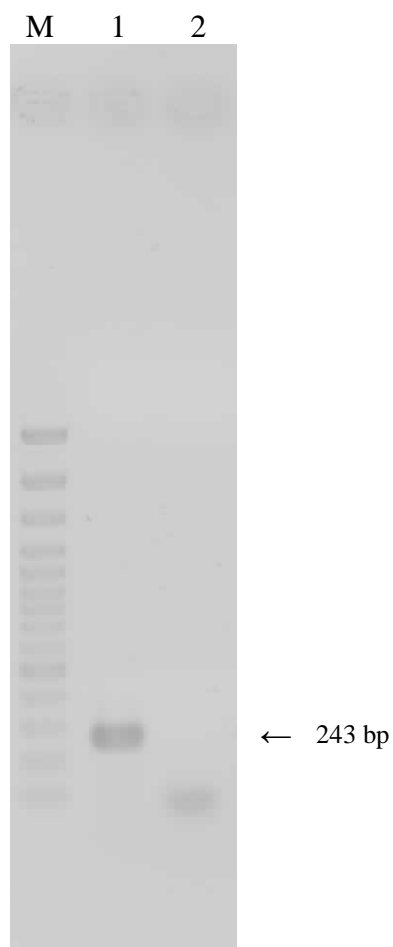
Analýza produktů IC-RT-PCR

3. Připravíme 2% agarózový gel v 0,5x TAE pufru (viz. Chemikálie a roztoky str. 22).
4. Na parafilmu vytvoříme kapky nanášecího pufru (viz. Chemikálie a roztoky str. 22) o objemu přibližně 3 µl, přidáme 20 µl produktů PCR a před nanášením pomalu promícháme pipetou.
5. Produkty včetně pozitivní a negativní kontroly nanese do jamek v gelu. Do první jamky na gelu zařadíme 100 bp DNA marker (Fermentas Life Sciences, Litva).
6. Elektroforézu provádíme 20 minut při 120 V (střední vanička na gel: 15x10 cm) nebo 40 minut při 160 V (velká vanička: 15x25 cm) v 0,5x TAE pufru.
7. Pak gel ponoříme na 20 minut do roztoku ethidium bromidu (0,5 µg ml⁻¹).
8. Amplifikované DNA produkty zviditelníme na UV transiluminátoru, kde pozorujeme specifický ampikon dlouhý 243 bp (Obr. 7).

Interpretace výsledků IC-RT-PCR testu

Pozitivním výsledkem je fluoreskující proužek („band“) odpovídající velikosti 243 bp (Obr. 7). Proužky porovnáme s velikostním standardem a pozitivní kontrolou. Negativní kontrola 1 (extrakční pufr) nesmí obsahovat žádný z výše uvedených proužků. Negativní kontrola 2 (homogenát ze zdravé hostitelské rostliny) nesmí obsahovat proužek specifický pro testovaný virus. Pozitivní kontrola (homogenát z rostliny infikované PPV) musí obsahovat proužek 243 bp. Jestliže tomu tak není, opakujeme test.

Obrázek 7: Ukázka výsledků detekce PPV pomocí RT-PCR s primery P1 a P2. Dráhy: 1- pozitivní kontrola, 2-negativní kontrola 1 (RNA hostitelské rostliny), 3-negativní kontrola 2 (voda) a M-velikostní standard GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas Life Sciences, Vilnius, Litva).



Purifikace RNA pomocí RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)

1. Jako vzorek použijeme 200 μ l rostlinného extraktu (viz Příprava vzorků pro testování, str. 14), smícháme ho s pufrem RLT (350 μ l), vydatně vortexujeme a lyzát ihned pipetujeme do centrifugační kolonky QIA shredder (fialová).
2. Kolonku umístíme do 2-ml jímací zkumavky a centrifugujeme 2 minuty při maximálních otáčkách. Opatrně bez porušení sedimentu tvořeného zbytky buněk v jímací zkumavce přeneseme supernatant do nové mikrocentrifugační zkumavky. V následujících krocích použijeme pouze tento supernatant.
3. K čirému lyzátu přidáme polovinu objemu ethanolu (96–100%) a ihned promícháme pipetou. Neodstředujeme. Bez prodlení pokračujeme následujícím krokem.
4. Vzorek včetně sraženin, které se mohou vytvořit, pipetujeme do RNeasy minikolonky (růžové) umístěné ve 2-ml jímací zkumavce. Opatrně zavřeme zkumavku a centrifugujeme 15 vteřin při ≥ 8000 g. Vylijeme obsah jímací zkumavky.
5. Do minikolonky RNeasy přidáme 700 μ l pufru RW1. Opatrně zavřeme zkumavku a centrifugujeme 15 vteřin při ≥ 8000 g, abychom kolonku promyli. Vylijeme obsah jímací zkumavky.

6. Minikolonku RNeasy přeneseme do nové 2 ml jímací zkumavky. Do minikolonky pipetujeme 500 µl pufru RPE. Opatrně zavřeme kolonku a centrifugujeme 15 vteřin při ≥ 8000 g, abychom kolonku promyli. Vylijeme obsah jímací zkumavky.
7. Přidáme dalších 500 µl pufru RPE do minikolonky RNeasy. Minikolonku opatrně zavřeme a centrifugujeme 2 minuty při ≥ 8000 g, abychom vysušili silikagelovou membránu kolonky.
8. Ihned pokračujeme následujícím krokem, abychom zabránili jakékoliv možnosti vzájemné kontaminace pufru RPE. Minikolonku RNeasy umístíme do nové 2 ml jímací zkumavky a obsah staré jímací zkumavky vylijeme. Centrifugujeme v mikrocentrifuze při maximálních otáčkách 1 minutu.
9. Minikolonku RNeasy přeneseme do nové 1,5 ml jímací zkumavky. Ihned pipetujeme 50 µl vody bez RNáz přímo na silikagelovou membránu minikolonky RNeasy. Opatrně zavřeme zkumavku a centrifugujeme 1 minutu při ≥ 8000 g, abychom vymyli RNA. RNA uchováváme při -20°C .

3.3. Biologický test na indikátorové rostlině ‘GF-305’

Po třetím vegetačním cyklu podrobíme rostliny bez symptomů a s negativním ELISA a RT-PCR testem biologickému testu. Očka ze zdravé indikátorové rostliny ‘GF-305’ očkujeme na výhon testovaného genotypu metodou chip-budding. Jedno očko umístíme v bazální části výhonu blízko podnože, zatímco druhé očko umístíme v jeho horní části. Tento krok umožňuje prokázat pohyb PPV na krátké vzdálenosti (z buňky do buňky) anebo dlouhé vzdálenosti (cévami) v testovaném výhonu.

Metoda hodnocení fenotypu je stejná:

- Přítomnost nebo nepřítomnost symptomů sledujeme na indikátoru ‘GF-305’ a testovaném genotypu broskvoně podle stupnice hodnocení uvedené výše (str. 10);
- Také DAS-ELISA test provádíme na indexované ‘GF-305’ a testovaném genotypu broskvoně.

Nepřítomnost symptomů a negativní ELISA test potvrzují, že se PPV nemnoží v daném genotypu broskvoní.

3.4. Pravidla pro rozhodování

Při charakterizování testovaných genotypů používáme následující pravidla:

- 1) Musíme získat výsledky pozorování symptomů a detekce viru v každém testovaném genotypu ze 3 po sobě jdoucích vegetačních cyklů;
- 2) Souhrnná analýza:
 - a. v případě **kvalitativního** hodnocení náchylnosti bereme v úvahu výskyt příznaků a výsledky ELISA a RT-PCR testů v posledních dvou vegetačních cyklech (Tab. 5),
 - b. v případě **kvantitativního** hodnocení náchylnosti vypočítáme průměr pozorovaných hodnot všech opakování v jednotlivých vegetačních cyklech (Tab. 6).
- 3) Tabulka pozorovaných výsledků:

Tabulka 5: Roztřídění genotypů podle výskytu symptomů infekce PPV na listech a výsledků ELISA a RT-PCR testů v posledních dvou vegetačních cyklech

Metoda	Symptomy	ELISA	RT-PCR	Závěr
Výsledek	+	+	+	Náchylný
	-	+/-	+	Rezistentní/tolerantní
	-	-	-	Rezistentní/imunní

Za **rezistentní/imunní** považujeme rostliny, pokud nevykazovaly symptomy a pozitivní ELISA nebo RT-PCR reakci v posledních dvou hodnocených vegetačních obdobích.

Za **rezistentní/tolerantní** pokládáme rostliny, pokud nevykazovaly symptomy a měly pozitivní ELISA a RT-PCR reakci v posledních dvou hodnocených vegetačních obdobích.

Mezi **náchylné** jsou zařazeny rostliny, které měly symptomy na listech a pozitivní výsledek ELISA a RT-PCR testu v posledních dvou hodnocených vegetačních obdobích.

Tabulka 6: Roztřídění genotypů podle intenzity a rozsahu symptomů na listech a výsledků ELISA a RT-PCR testů

Třída rezistence	Symptomy*	ELISA	RT-PCR
Vysoce rezistentní	$\leq 0,5$	Negativní	Negativní
Středně rezistentní	$> 0,5$ a ≤ 1	Převážně negativní	Pozitivní
Středně náchylný	> 1 a ≤ 2	Pozitivní	Pozitivní
Náchylný	> 2 a ≤ 3	Pozitivní	Pozitivní
Vysoce náchylný	> 3	Pozitivní	Pozitivní

*Průměrná intenzita a rozsah symptomů infekce PPV za celou dobu hodnocení

3.5. Vybavení laboratoře a chemikálie

Přístroje (mohou být nahrazeny rovnocennými zařízeními)

ELISA

- Sada digitálních mikropipet (0,5-10 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl)
- Osmikanálová pipeta (20-200 µl)
- Vanička pro nabírání kapalin vícekanálovými pipetami
- pH metr
- Váhy (0,01 g)
- Termostat (37°C)
- Chladnička (4°C)
- Promývačka mikrodestiček (ELISA washer)
- Spektrofotometr (ELISA reader)

PCR

- Centrifuga na zkumavky Eppendorf (1,5/2,0 ml, 20 000 g)
- Mikrocentrifuga (PCR zkumavky)
- Výrobník ledové tříště
- pH metr
- Váhy (0,0001 g)
- Nádoba na tekutý dusík
- Vodní lázeň nebo teplotní blok
- Cykler pro PCR s vyhříváním víkem
- UV transiluminátor
- Chladnička (4°C)
- Mraznička (- 20°C) (případně hlubokomrazicí box - 70°C)
- Sada digitálních mikropipet (0,5-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl a 200-1000 µl)
- **Dvě samostatné sady mikropipet: jedna pro izolaci RNA a pro pipetování produktů PCR, druhá pro pipetování reakčních směsí a pro pipetování vzorků RNA**
- Horizontální elektroforéza + zdroj elektrického proudu
- Elektromagnetická vyhřívaná míchačka
- Mikrovlnná trouba
- Vortex (mikrotřepačka)
- Fotodokumentační zařízení
- Autokláv

Materiál

ELISA

- Laboratorní sklo (kádinky, odměrné válce, reagenční láhve s uzávěrem)
- Mikrotitrační destičky
- Samolepící krycí fólie na mikrotitrační destičky (např. kat. č. LW2697, Alpha Laboratories, Eastleigh, Hampshire, Velká Británie)
- Ruční homogenizátor (kat. č. 400010, Bioreba AG, AG, Reinach, Švýcarsko)
- Extrakční sáčky (např. kat. č. 430100, Bioreba AG, AG, Reinach, Švýcarsko)
- Špičky k mikropipetám
- Stříčka (nebo Pasteurova pipeta)
- Papírové ručníky
- Váženky
- Vyšetřovací rukavice

- Permanentní popisovač

PCR

- Třecí misky a tloučky (průměr misek cca 7 cm)
- Tekutý dusík
- 1,5 ml a 2,0 ml mikrozkušavky Eppendorf
- Stojánky na mikrozkušavky
- Tenkostěnné PCR mikrozkušavky (podle typu cykleru pro PCR)
- Váženky
- Magnetická míchadla
- Špičky k mikropipetám + krabičky (sterilní, prosté RNáz)
- Špičky s filtrem k mikropipetám (sterilní, prosté RNáz)
- Laboratorní sklo (kádinky, odměrné válce, Erlenmayerovy baňky, autoklávovatelné reagenční láhve s uzávěrem)
- Jednorázové laboratorní rukavice
- Permanentní popisovač na plast

Chemikálie a roztoky

ELISA

- Kit (testovací sada) pro detekci PPV (včetně pozitivní a negativní kontroly) (např. kat. č. 150575, Bioreba AG, Reinach, Švýcarsko)
- p- nitrofenylfosfát, (např. kat. č. 71768, Sigma-Aldrich, Inc., St. Luis, MO, USA; Loewe <http://www.loewe-info.com> ho prodává jako "substrate tablets")
- Diethanolamin (např. kat. č. D8885, Sigma-Aldrich, Inc., St. Luis, MO, USA)
- Bovine serum albumin (např. kat. č. 11946.01, Serva GmbH, Heidelberg, Germany)
- Tween[®] 20 (např. kat. č. 39796.01, Serva GmbH, Heidelberg, Germany)
- Sodium diethyldithiocarbamate (např. kat. č. 228680-5g, Sigma-Aldrich, Inc., St. Luis, MO, USA)
- Zásobní roztok potahovací protilátky + potahovací pufr
- PBS pufr
- PBS-Tween pufr (promývací pufr)
- Extrakční pufr pro přípravu vzorků
- Zásobní roztok konjugát protilátka-alkalická fosfatáza + konjugační pufr
- Substrátový pufr
- dH₂O (deionizovaná voda)

Potahovací pufr

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g
Deionizovaná voda	doplnit do 1000 ml
Upravit pH na 9,6 HCl nebo NaOH.	

Fyziologický roztok pufrovaný fosfátem (Phosphate-Buffered Saline, PBS)

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ × 12H ₂ O	2,9 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
deionizovaná voda	doplnit do 1000 ml
Upravit pH na 7,4.	

Promývací pufr (PBS s 0,05% Tween 20)

Tween 20	0,5 ml
PBS pufr	doplnit do 1000 ml

Extrakční pufr (CAMBRA *et al.*, 1994):

polyvinylpyrolidon (PVP-10)	20,0 g
diethyldithiokarbamát sodný (DIECA)	2,0 ml
PBS pufr	doplnit do 1000 ml

Konjugační pufr

hovězí sérový albumin (BSA)	2,0 g
Tween 20	0,5 ml
polyvinylpyrolidon K-25	20,0 g (můžeme vynechat)
PBS pufr	doplnit do 1000 ml.

Substrátový pufr

Diethanolamin	97 ml
destilovaná voda	doplnit do 1 000 ml
Upravit pH na 9,8 koncentrovanou HCl.	

PCR

- dH₂O (deionizovaná voda)
- H₂O pro PCR (např. kat. č. P 042, PCR H₂O-speciálně upravená prostá RNáz a DNáz, Top-Bio, s.r.o., Praha, Česká republika)
- RNeasy Plant Mini Kit (kat. č. 74104, QIAGEN, Hilden, SRN)
- Polyvinylpyrrolidone (PVP-10) (např. kat. č. P2307, Sigma-Aldrich, Inc., St. Luis, MO, USA)
- Sodium dimethyldithiocarbamate (např. kat. č. 71513-1L, Sigma-Aldrich, Inc., St. Luis, MO, USA)
- Absolutní ethanol (např. kat. č. Set001, Analytika, s.r.o., Praha, Česká republika) (Nepoužívat denaturovaný ethanol.)
- Teplotně stabilní DNA polymeráza včetně pufru a MgCl₂ (např. kat. č. M1241, Promega, Madison, WI, USA)
- Inhibitor RNáz (např. kat. č. N2511, Promega, Madison, WI, USA)
- Reverzní transkriptáza (např. kat. č. M5101, Promega, Madison, WI, USA)
- Triton X-100 (např. kat. č. T8787, Sigma-Aldrich, Inc., St. Luis, MO, USA)
- Směs dNTP (např. kat. č. U1420, Promega, Madison, WI, USA)
- Primery (syntetizované oligonukleotidy) (např. od Sigma-Genosys Ltd., Pampisford, Cambridgeshire, UK):

Cílový druh	Název primeru	Sekvence primeru (5' - 3')	Délka ampliconu
<i>Plum pox virus</i>	P1	ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC	243 bp
	P2	CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA	

- Agaróza pro elektroforézu DNA (např. kat. č. 50000, Cambrex, Charles City, IA, USA)
- TRIS (např. kat. č. 37190, Serva, Heidelberg, SRN)
- EDTA (např. kat. č. E5134, Sigma-Aldrich, Inc., St. Luis, MO, USA)
- Ledová kyselina octová (např. p.a., PENTA, Chrudim, Česká republika)

- Hydroxid sodný (např. kat. č. 0583, Amresco, Solon, Ohio, USA)
- Ethidium bromid (např. kat. č. E1510, Sigma-Aldrich, Inc., St. Luis, MO, USA)
- Ficoll 400 (např. kat. č. 17-0400-02, Pharmacia, Uppsala, Švédsko)
- Orange G (např. kat. č. O-3756, Sigma-Aldrich, Inc., St. Luis, MO, USA)
- Xylene cyanol (např. kat. č. 95600, Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- EtBr destaining bags (např. kat. č. 5459.25, Genesee Scientific Corporation, CA, USA)
- Savo (Bochemie, a.s., Bohumín, Česká republika)
- 70%-ní ethanol (denaturovaný)

EDTA (0,5 M, 200 ml)

EDTA	37,22 g
sdH ₂ O	doplnit do 200 ml
Upravit pH na 8,0 pomocí NaOH (cca 4 g).	

TAE pufr (50x, 150 ml)

TRIS	36,3 g
Ledová kyselina octová	8,6 ml
EDTA (0,5 M)	15 ml
sdH ₂ O	doplnit do 150 ml

Ethidium bromid

Zásobní roztok:	10 mg/ml dH ₂ O
Pracovní roztok:	0,5 µg/ml dH ₂ O

Ethidium bromid je látka, která se váže na šroubovici nukleových kyselin, kde pak pod UV-lampou (312 nm) intenzívně růžově fluoreskuje.

Ethidium bromid je silný mutagen, proto se veškeré manipulace s ním provádějí v jednorázových rukavicích v digestoři. Agarózové gely, vyšetřovací rukavice a plasty kontaminované ethidium bromidem se skladují odděleně v silných PE pytlích a likvidaci provádějí speciální firmy zabezpečující likvidaci nebezpečného odpadu. Roztoky a pufrы dekontaminujeme přímo v laboratoři pomocí specifických adsorpčních kolon nebo sáčků.

Barva pro nanášení vzorků (produktů PCR) do gelů

0,1% xylencyánová modř a 0,2% oranž G ve 20% Ficollu 400, nebo např. Blue/Orange Loading Dye, 6x (kat. č. G1881, Promega, Madison, WI, USA)

Nanášecí pufr (Ficoll Loading Dye, FLD) 10x

Ficoll 400	2 g
0,5 M EDTA (pH 8,0)	1,25 ml
Xylene cyanol FF (0,1%)	10 mg
Orange G (0,2%)	20 mg
sdH ₂ O	doplnit do 10 ml

Standard molekulové hmotnosti pro elektroforézu

např. GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (kat. č. SM0241, Fermentas Life Sciences, Vilnius, Litva) nebo Lambda DNA/HindIII Marker (kat. č. SM0101, Fermentas Life Sciences, Vilnius, Litva)

4) SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Virus šarky švestky (*Plum pox virus*, PPV) způsobuje hospodářsky nejvýznamnější virovou chorobu broskvoní (*Prunus persica*). Krátkodobá ochranná opatření proti tomuto viru zahrnují odstranění nemocných stromů a pěstování certifikovaného PPV prostého výsadbového materiálu. Chemická ochrana vůči hmyzím přenašečům je z důvodu neperzistentního přenosu PPV neúčinná. Proto je jediným účinným řešením šlechtění a pěstování nových rezistentních odrůd.

V současné době nejsou k dispozici vhodné zdroje rezistence k PPV pro broskvoně a neexistují komerční odrůdy broskvoní rezistentní k PPV. Šlechtitelé mají k dispozici jen několik zdrojů rezistence. BALAN *et al.* (1995), GABOVA (1994), POLÁK *et al.* (1997), MAINOU & SYRGIANNIDIS (1992), SYRGIANNIDIS & MAINOU (1985), TOBIAS *et al.* (1992) popsali odrůdy mírně náchylné k PPV. V několika středně rezistentních odrůdách bylo zjištěno snížené množení viru (POLÁK 1998, TOMA *et al.* 1998, POLÁK & PÍVALOVÁ 1997). A tak by identifikace a začlenění genů rezistence k PPV do *P. persica* mělo významný ekonomický a environmentální přínos. Ostatní druhy rodu *Prunus* jsou známé tím, že vykazují různou úroveň rezistence k PPV. Rezistence k PPV byla popsána u několika odrůd mandloní (DICENTA *et al.* 2002, PASCAL *et al.* 2002, RUBIO *et al.* 2003) a *P. davidiana* (EPPO 1974, KERVELLA *et al.* 1998, PASCAL *et al.* 1998). Hledání nových zdrojů rezistence k PPV a šlechtění nových rezistentních genotypů druhů rodu *Prunus* jsou dva nejdůležitější cíle šlechtitelských programů v Evropě (RUBIO *et al.* 2003).

Odrůdy broskvoní mírně náchylné k PPV byly doporučovány k pěstování v zemích se silným výskytem PPV, jako je Řecko. Nyní však v souvislosti se situací v sadech v řadě evropských zemí se tato strategie zdá nedostatečnou. Řešení může být nalezeno v používání planých druhů blízké příbuzných k broskvoním rezistentních k PPV jako je mandloň (DICENTA *et al.* 2002, PASCAL *et al.* 2002, RUBIO *et al.* 2003.) a *P. davidiana* a (EPPO 1974).

Virologický program zahrnující hodnocení rezistence meruněk a broskvoní k viru šarky švestky začal v České republice v roce 1991 (POLÁK *et al.*, 1995). U patnáctiletých stromů 18 odrůd broskvoní přirozeně infikovaných PPV v sadu byly hodnoceny symptomy na listech. V dalších letech byly hodnoceny příznaky PPV i na plodech a byla opakovaně stanovena relativní koncentrace viru v listech a plodech pomocí semikvantitativního ELISA testu. Tři odrůdy broskvoní byly roubovány na dvouleté broskvoňové podnože 'Siberian C' náchylné k PPV uměle infikované izolátem PPV-M. V následujících 4 letech byly hodnoceny příznaky na listech odrůd broskvoní a PPV byl detekován v listech a květech pomocí ELISA testu. Žádná odrůda broskvoní nevykazovala vysokou rezistenci k PPV. Nízká relativní koncentrace PPV byla stanovena ELISA testem v květech odrůd broskvoní 'Envoy', 'Favorita Morettini 3', 'Harmony' a 'NJC 102'. Tyto odrůdy měly také velmi slabé příznaky infekce na listech (POLÁK *et al.*, 1997).

V dalších letech pokračovalo hodnocení rezistence mezidruhových hybridů z rodu *Prunus* ve VÚRV, v.v.i. v Praze a na ZF MENDELU v Lednici. U hybridu 'GF-677' (*Prunus amygdalus* x *P. persica*) byla potvrzena vysoká rezistence k PPV. Hybridy 'Cadaman' (*P. davidiana* x *P. persica*) a 'Fire' (*P. amygdalus* x *P. persica*) byly charakterizovány jako rezistentní k PPV (Polák *et al.* 2010).

Byla zkoumána dědičnost rezistence broskvoní k PPV. Byly hodnoceny jednotlivé rostliny potomstev křížení k PPV náchylné odrůdy broskvoní a rezistentních odrůd druhů rodu *Prunus* (SALAVA *et al.* 2013). Testovaný materiál byl v těchto pokusech infikován PPV očkováním jednoletých semenáčů dvěma očky meruňky infikované kmenem PPV-D. Malý počet rezistentních hybridů selektovaných z křížení 'Cresthaven' x 'GF 677' a 'Cresthaven' x 'Cadaman' nasvědčuje tomu, že dědičnost k PPV je pravděpodobně polygenní. Šlechtění

na rezistenci k PPV proto bude vyžadovat selekci ve velkých potomstvech a používání časných selekčních testů.

Hodnocení rezistence broskvoní meruněk k PPV probíhá i v zahraničí, např. v Řecku (MAINOU & SYRGIANNIDIS 1992, SYRGIANNIDIS & MAINOU 1985), Maďarsku (TOBIAS *et al.* 1992), Bulharsku (GABOVA 1994), Rumunsku (BALAN *et al.* 1995, TOMA *et al.* 1998), Francii (ESCALETTES *et al.* 1998, PASCAL *et al.* 2002) a v Itálii (BAZZONI, osobní sdělení).

DECROOCQ *et al.* (2005) provedli analýzu quantitative trait loci (QTL) rezistence k PPV v F₁ mezidruhové populaci získané po křížení mezi náchylnou odrůdou nektarinek ‘Summergrand’ a klonem *P. davidiana* P 1908 rezistentním k PPV (KERVELLA *et al.* 1998, PASCAL *et al.* 1998). Pomocí analýzy variance a neparametrických testů detekovali šest úseků genomu vázaných s rezistencí k PPV. V blízkosti těchto úseků byly identifikovány tři geny řídící rezistenci k rostlinným virům. Používání vhodných postupů genetického mapování a molekulárních markerů (marker-assisted selection, MAS) může usnadnit šlechtění nových odrůd.

Metody fenotypizace rezistence k viru šarky švestky jsou neustále zdokonalovány a výsledky dosažené na různých pracovištích a v různých státech jsou porovnávány. Při hodnocení rezistence k PPV musí být brána v úvahu řada faktorů: izolát viru, zdroj inokula, podnož, metoda inokulace, doba hodnocení, podmínky ve skleníku, počet testovaných rostlin každého genotypu a počet hodnocených vegetačních cyklů (LLÁCER *et al.* 2008). Navíc je požadována správná identifikace rostlinného materiálu a použitého kmenu viru. Odrůdy v současné době pěstované i nové odrůdy introdukované ze zahraničí včetně novošlechtění je třeba charakterizovat z hlediska náchylnosti nebo rezistence k PPV. Dosud však nebyl v České republice ani v zahraničí vypracován a publikován žádný konsensuální metodický postup fenotypizace rezistence broskvoní k PPV, podle kterého by bylo možno na různých pracovištích testovat rezistenci jednotně a dosažené výsledky porovnat. Proto je potřeba vypracovat standardní postupy fenotypizace rezistence. V rámci řešení výzkumného záměru Výzkumného ústavu rostlinné, v.v.i. MZE0002700604 “Udržitelné systémy pěstování zemědělských plodin pro produkci kvalitních a bezpečných potravin, krmiv a surovin“, jehož součástí byl výzkum problematiky rezistence broskvoní k PPV, předkládáme standardní metodický postup hodnocení rezistence broskvoní k viru šarky švestky.

5) POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Metodika fenotypizace rezistence broskvoní k viru šarky švestky (PPV) je určena pro Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, šlechtitele broskvoní, ovocné školkaře a další zájemce o pěstování broskvoní jako konkrétní metodický postup pro charakterizaci českých i zahraničních odrůd a klonů broskvoní, pro charakterizaci nových novošlechtění a hybridů, pro výběr zdrojů rezistence pro šlechtění odolných odrůd. Vypracovaný metodický postup bude rovněž uplatněn ve výzkumu dědičnosti rezistence broskvoní k PPV a při vývoji DNA markerů rezistence broskvoní k PPV.

Tuto metodiku vydává příjemce, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., který metodiku zveřejní na své webové stránce (www.vurv.cz).

6) EKONOMICKÉ ASPEKTY

Šarka švestky, kterou způsobuje virus šarky švestky (PPV), je jedním z hlavních faktorů který omezuje pěstování druhů rodu *Prunus*, mezi které patří i broskvoně. Šlechtění na rezistenci k PPV je nejúčinnější metodou ochrany broskvoní před šarkou. Nejen pro úspěšné šlechtění broskvoní na rezistenci, ale například i pro certifikaci zdravotního stavu rozmnožovacího materiálu, je nezbytný standardní metodický postup testování rezistence k PPV, podle kterého by bylo možno na různých pracovištích jednotně testovat rezistenci a dosažené výsledky porovnat. Tento postup nebyl doposud v České republice ani v zahraničí vypracován a publikován.

Zavedení metodického postupu diagnostiky PPV nepředpokládá žádné další náklady. Uživatelé, tj. diagnostické laboratoře Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského, Zahradnická fakulta Mendelovy univerzity v Lednici, VŠÚO Holovousy, s.r.o. a VÚRV, v.v.i., mají diagnostické laboratoře, které provádějí detekci a identifikaci PPV.

Předkládané diagnostické protokoly vzniklé experimentální činností ve VÚRV, v.v.i. v Praze-Ruzyni uvádějí vhodné pracovní postupy, pletiva a optimální dobu odběru vzorků pro spolehlivou diagnostiku PPV. Metodika na základě výsledků pokusů upozorňuje na problémy, které se mohou v průběhu diagnostiky PPV vyskytnout, a předkládá konkrétní řešení těchto problémů. Využívání metodiky povede ke zvýšení spolehlivosti praktické diagnostiky PPV v České republice.

Přínosy spolehlivé diagnostiky PPV se projeví u pěstitelů broskvoní a cílových spotřebitelů. Ekonomické přínosy je možné vyjádřit hodnotou zvýšené produkce broskví. Broskvoně byly v roce 2012 pěstovány v ČR na ploše 641 ha, plocha intenzivních sadů broskvoní u nás od roku 1989, kdy činila 2 059 ha, neustále klesá. Je to způsobeno především infekcí broskvoní PPV. Průměrný výnos broskví se u nás pohybuje okolo 8 t/ha a průměrná cena konzumních broskví dosáhla u producentů v posledních letech 18 000 Kč/t.

Při uvedené realizační ceně broskví a pěstební výměře jako v roce 1989 dosáhne roční přínos používání odrůd broskvoní rezistentních k PPV 204 192 000 Kč, nehledě na příznivý dopad konzumace broskví na zdraví spotřebitelů.

Z uvedeného výpočtu jsou zřejmé velké rezervy, které existují v oblasti ochrany broskvoní před PPV, resp. naléhavá potřeba vyšlechtění a pěstování odrůd broskvoní rezistentních k PPV.

7) SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- ATANASOFF D. (1932): Plum pox. A new virus disease. Yearbook University of Sofia, Faculty of Agriculture, 11: 49-69.
- BALAN V., IVASCU A., TOMA S. (1995): Susceptibility of apricot, nectarine and peach cultivars and hybrids to plum pox virus. Acta Horticulturae, 386: 299-305.
- CAMBRA M., CAPOTE N., CAMBRA M.A., LLÁCER G., BOTELLA P., LÓPEZ-QUÍLEZ A. (2006): Epidemiology of sharka disease in Spain. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 36: 271-275.
- CAMBRA M, ASENSIO M, GORRIS MT, PÉREZ E, CAMARASA E, GARCÍA JA, MOYA JJ, LÓPEZ-ABELLA D, VELA C & SANZ A (1994): Detection of plum pox potyvirus using monoclonal antibodies to structural and non-structural proteins. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 24: 569–577.
- DICENTA F., RUBIO M., GAMBIN M., MARTÍNEZ-GÓMEZ P. (2002): Resistance of almonds cultivars to sharka (plum pox virus). Acta Horticulturae, 501: 577-579.
- EPPO (1974): Sensibilite des especes fruitieres. EPPO/OEPP Bulletin, 4 (1): 77-97.
- ESCALETTES V., DOSBA V., LANSAC M., & EYGUARD J.P. (1998): Genetic resistance to plum pox potyvirus in peaches. Acta Horticulturae, 465 (2): 689-697.
- GABOVA R. (1994): Evaluation of peach and nectarine cultivars in Bulgaria for their resistance to plum pox virus. OEPP/EPPO bulletin, 24: 755-759.
- LLÁCER G., BADENES M.L. AND ROMERO C. (2007): Problems in the determination of inheritance of *Plum pox virus* resistance in apricot. Acta Horticulturae, 781: 263-267.
- LOMMEL S.A., MCCAIN A.H., MORRIS T.J. (1982): Evaluation of indirect-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Phytopathology, 72: 1018-1022.
- KEGLER M., FUCHS E., GRÜNTZIG, KRCZAL G. & WEGENER B. (1996): Susceptibility of genotypes of the genus *Prunus* to *Plum pox virus*. Journal of Plant Disease and Protection, 103: 255-261.
- KERVELLA J., PASCAL T., PFEIFFER F. & DIRLEWANGER E. (1998): Breeding for multiresistance in peach tree. Acta Horticulturae, 465 (1): 177-184.
- KÖLBER M. (2001): Workshop on Plum pox. Acta Horticulturae, 550: 249-255.
- KUNZE L., KRCZAL H. (1971): Transmission of sharka virus by aphids. In: Proceedings of the 8th European Symposium on Fruit Tree Virus Diseases, INRA, Paris, France, pp. 255-260.
- MAINOU A.C. & SYRGIANNIDIS G.D. (1992): Evaluation of peach and nectarine varieties according to resistance to sharka (plum pox virus). Acta Horticulturae, 309: 221-227.
- MARTÍNEZ-GÓMEZ P., RUBIO M., DICENTA F. (2004): Resistance to Plum pox virus (Dideron isolate RB3.30) in a group of California almonds and transfer of resistance to peach. Journal of American Society of Horticultural Sciences, 129 (4): 544-548.
- MOUSTAFA T.A., BADENES M.L., MARTÍNEZ-CALVO J., LLÁCER G. (2001): Determination of resistance to sharka (plum pox) virus in apricot. Scientia Horticulturae, 91: 59-70.
- NÉMETH M. (1994): History and importance of plum pox in stone-fruit production. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 24: 525-537.
- PASCAL T., PFEIFFER F. & KERVELLA J. (2002): Preliminary observations on the resistance to sharka in peach and related species. Acta Horticulturae, 592: 699-706.
- PASCAL T., KERVELLA J., PFEIFFER F.G., SAUGE M.H. ESMENJAUD D. (1998): Evaluation of the interspecific progeny *Prunus persica* cv. Summergrand x *Prunus davidiana* for disease resistance and some agronomic features. Acta Horticulturae, 465: 185-191.
- POLÁK J. (1998): Symptomatological and serological evaluation of peach cultivars for resistance to plum pox virus. Acta Horticulturae, 472: 433-439.

- POLÁK J., BOLELOUCKÝ P., GLASA M., HNÍZDIL M., JAROŠOVÁ J., KOMÍNEK P., KRŠKA B., KUMAR J.K., KURKA M., LUDVÍK M., NEČAS T., PNDRÁŠEK I., SALAVA J. (2010): Šarka švestky-historie choroby v ČR a Evropě, virus šarky švestky, jeho vlastnosti, hostitelský okruh, přenos, šíření, epidemiologie, škodlivost a metody ochrany, mezinárodní projekt 7. RP EU SharCo. In: Sborník referátů z workshopu "Šarka peckovin-současný stav problematiky v České republice a v Evropě", Polák J. (ed.), ZF MENDELU, Lednice, 28.-29.6.2010, s. 11-21.
- POLÁK J., CHOD J. & OUKROPEC I. (1995): The production of sharka-free propagating material of apricots and peaches in the Czech Republic. *Acta Horticulturae*, 309, 139-143.
- POLÁK J.; KRŠKA B.; PÍVALOVÁ J.; SVOBODA J. (2005): Apricot cultivars 'Harlayne' and 'Betinka' were proved to be highly resistant to the six different strains and isolates of Plum pox virus (PPV). *Phytopathologia polonica* 36: 53-59.
- POLÁK J. & OUKROPEC I. (2010): Identification of interspecific peach and *Prunus* sp. hybrids resistant to *Plum pox virus* infection. *Plant Protection Science*, 46 (4): 139-144.
- POLÁK J., OUKROPEC I., KOMÍNEK P., KRŠKA B., BITTÓOVÁ M.: (1997): Detection and evaluation of resistance of apricots and peaches to plum pox virus. *Journal of Plant Disease and Protection*, 104: 466-473.
- POLÁK J. & PÍVALOVÁ J. (1997): Symptomatological and serological evaluation of resistance of peach cultivars to plum pox virus. 17th International Symposium on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops, Bethesda, MD. USA, June 23-27.
- RUBIO M., MARTÍNEZ-GÓMEZ P. & DICENTA F. (2003): Resistance of almonds cultivars to Plum pox virus (sharka). *Plant Breeding*, 122: 462-464.
- SMOLÁK J., NOVÁK J.B. (1956): Příspěvky k virologii ovocných stromů. *Acta Universitatis Agriculturae*: 99-118.
- SYRGIANNIDIS G.D. & MAINOU A.C. (1985) Etude de la sensibilité á la maladie de la sharka de 33 variétés de pécher et de nectarines. *Georgike Ereune*, 9: 207-214.
- TOBIAS I., GYÖZO K., BARBASI I & SZABŐ Z. (1992): Szilva-hiliövirus kimutatása öszibarabon és a fajtak érékkesysége. *Kertgazdasag*, 24 (2): 69-77 (English abstract).
- TOMA S., IVASCU A., & BALAN V. (1998): Analysis of level of PPV in peach and nectarine trees in Southern Romania. *Acta Horticulturae*, 472: 450-462.
- WETZEL T., CANDRESSE T., RAVELONANDRO M., DUNEZ J. (1991b): A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox virus detection. *Journal of Virological Methods*, 33: 355-365.

8) SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- ABERNATHY D., ZHEBENTYAYEVA T., ABBOTT A.G., VILANOVA S., BADENES M.L., SALAVA J., POLÁK J., KRŠKA B., DAMSTEEGT V. (2004): Molecular genetic mapping of the *Plum pox virus* resistance genes in apricot. *Acta Horticulturae*, 657: 283-288.
- LALLI D.A., ABBOTT A.G., ZHEBENTYAYEVA T.N., BADENES M.L., DAMSTEEGT V., POLÁK J.; KRŠKA B., SALAVA J. (2008): A genetic linkage map for an apricot (*Prunus armeniaca* L.) BC₁ population mapping plum pox virus resistance. *Tree Genetics and Genomes*, 4: 481-493.
- MARANDEL G., SALAVA J., ABBOTT A., CANDRESSE T., DECROOCQ V. (2009): Quantitative trait loci meta-analysis of *Plum pox virus* resistance in apricot (*Prunus armeniaca* L.): new insights on the organization and the identification of genomic resistance factors. *Molecular Plant Pathology* 10 (3): 347-360.
- PILAŘOVÁ P., MARANDEL G., DECROOCQ V., SALAVA J., KRŠKA B., ABBOTT A.G. (2010): Quantitative trait analysis of resistance to plum pox virus in the apricot F1 progeny 'Harlayne' x 'Vestar'. *Tree Genetics and Genomes*, 6 (3): 467-475.
- POLÁK J. (1995): Reliability of detection and relative concentration of plum pox virus determined by ELISA in an infected peach tree during the vegetation period. *Journal of Plant Disease and Protection*, 102: 16-22.
- POLÁK J., OUKROPEC I. (2010): Identification of interspecific peach and *Prunus* sp. hybrids resistant to *Plum pox virus* infection. *Plant Protection Science*, 46 (4): 139 - 144.
- POLÁK J., OUKROPEC I., KOMÍNEK P., KRŠKA B., BITTÓOVÁ M. (1997): Detection and evaluation of resistance of apricots and peaches to plum pox virus. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 104: 466-473.
- POLÁK J., KOMÍNEK P., SALAVA J., KRŠKA B., SASKOVÁ H. (2002): Preliminary studies on the inheritance of resistance to *Plum pox virus* (PPV) in apricots. *Plant's Health*, 6:28-30.
- POLÁK J.; KRŠKA B.; PÍVALOVÁ J.; SVOBODA J. (2005): Apricot cultivars 'Harlayne' and 'Betinka' were proved to be highly resistant to the six different strains and isolates of Plum pox virus (PPV). *Phytopathologia polonica*, 36: 53-59.
- POLÁK J., KOMÍNEK P., KRŠKA B., PÍVALOVÁ J. (2008): Durable resistance of apricot cultivars Harlayne and Betinka to six different strains of Plum pox virus. *Journal of Plant Pathology*, 90 (1, Supplement): 37-40.
- SALAVA J., WANG Y., KRŠKA B., POLÁK J., KOMÍNEK P., MILLER W. R., DOWLER L. W., REIGHARD L. G., ABBOTT G. A. (2002): Identification of molecular markers linked to resistance of apricot (*Prunus armeniaca* L.) to *Plum pox virus*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 109: 64-67.
- SALAVA J., ABERNATHY D., KRŠKA B., POLÁK J., ABBOTT A. (2004): Mapping of resistance genes to Plum pox virus. In: *Proceedings of International Symposium "Advances in Molecular Biology: Methods for Genotype Identification, Plant Breeding and Product Control"*, Prague, November 3, 2004: 39-42.
- SALAVA, J.; POLÁK, J.; KRŠKA, B. (2005a): Oligogenic inheritance of resistance to Plum Pox Virus in apricots. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 41 (4): 167-170.
- SALAVA, J.; ABERNATHY, D.; POLÁK, J.; KRŠKA, B., ABBOTT A.G. (2005b): Identifikace DNA markerů rezistence meruněk k viru šarky švestky a jejich využití ve šlechtění. In: *Seminář "Nové metody ve studiu a šlechtění ovocných dřevin"*, Lednice, 25. 02. 2005, s. 10-14.
- SALAVA J., POLÁK J., KRŠKA B., LALLI D.A., AND ABBOTT A.G. (2007):: Construction of a genetic map for apricot with molecular markers and identification of markers associated with *Plum pox virus* resistance. *Acta Horticulturae*, 738: 657-661

- SALAVA J., POLÁK J., KRŠKA B. (2008a): Preliminary results on inheritance of resistance to *Plum pox virus* in apricot cv. Harlayne. *Journal of Plant Pathology*, 90 (1, Supplement): S1.79-1.80.
- SALAVA J., POLÁK J., KRŠKA B. (2008b): Two-gene resistance to *Plum pox virus* in apricot. *Acta Horticulturae*, 781: 303-307.
- SALAVA J., POLÁK J. AND OUKROPEC I. (2013): Evaluation of the *Prunus* interspecific progenies for resistance to *Plum pox virus*. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 49 (2): 65-69.

POZNÁMKY:

Název: Metodika fenotypizace rezistence broskvoní k viru šarky švestky

Autoři: Salava J. & Polák J.

Vydal: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Drnovská 507/73, 16106 Praha 6–Ruzyně

Tisk: CD

Počet stran: 34

Vydání: první

Rok vydání: 2014

ISBN: 978-80-7427-164-9



© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2014