národní
úložiště
šedé
literatury

Detekce pěti virů česneku kuchyňského metodou SYBR Green real- time PCR

Mitrová, Katarína; Svobodová, Leona; Ovesná, Jaroslava
2017

Dostupný z http://www.nusl.cz/ntk/nusl-384990

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

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

Datum stažení: 08.05.2024

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní nusl.cz .

Katarína Mitrová, Leona Svobodová, Jaroslava Ovesná

Detekce pěti virů česneku kuchyňského metodou SYBR Green real-time PCR

METODIKA PRO PRAXI

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2017

Metodika byla vypracována pracovníky týmu Molekulární genetiky VÚRV, v.v.i. Vznikla za finanční podpory Mze ČR a je výstupem řešení projektu: MZE/QJ1210158 - Bezpečná a kvalitní zelenina r. *Allium* se zaměřením na česnek z domácích zdrojů (2012-2016, MZE/QJ) a výzkumného záměru MZE RO0416

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2017

ISBN: 978-80-7427-236-3

Autoři: Ing. Katarína Mitrová, RNDr. Leona Svobodová,
Doc. RNDr. Jaroslava Ovesná, CSc.

Název: Detekce pěti virů česneku kuchyňského metodou SYBER Green real- time PCR

Vydal: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně

Náklad: 20 ks

Vyšlo v roce: 2017

Vydáno bez jazykové úpravy

Kontakt na autory: mitrova@vurv.cz

ovesna@vurv.cz

leisova@vurv.cz

Autor fotografií: Katarína Mitrová

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2017

ISBN: 978-80-7427-236-3

Katarína Mitrová, Leona Svobodová, Jaroslava Ovesná

DETEKCE PĚTI VIRŮ ČESNEKU KUCHYŇSKÉHO METODOU SYBR GREEN REAL- TIME PCR

METODIKA PRO PRAXI

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2017

ISBN: 978-80-7427-236-3

Detekce pěti virů u česneku kuchyňského

Předmětem metodiky je postup pro detekci pěti virů u česneku kuchyňského, pomocí analýzy real- time PCR laboratořemi v praxi. Tato metoda umožní identifikovat pět zástupců virů u česneku a to: *Onion yellow dwarf virus* (OYDV), *Leek yellow stripe virus* (LYSV), *Garlic common latent virus* (GCLV), *Shallot latent virus* (SLV) a *Garlic mite-borne filamentous virus* (GMbFV) na základě detekce sekvencí genu pro plášťový protein metodou SYBR Green real-time PCR. Tato metoda se osvědčila jako vhodný nástroj pro detekci vysoce variabilních patogenů jako jsou viry česneku. Metodika nově přináší postup detekce těchto virů.

Detection of five garlic viruses

The objective of the assay is detection of five viruses in garlic using real- time PCR analysis. . This assay allows to identify five of the viruses in the varieties of garlic - *Onion yellow dwarf virus* (OYDV), *Leek yellow stripe virus* (LYSV), *Garlic common latent virus* (GCLV), *Shallot latent virus* (SLV) and *Garlic mite-borne filamentous virus* (GMbFV) based on the detection of gene sequences for the coat protein by SYBR Green real-time PCR. This method was shown in our work to be a suitable tool for the detection of highly variable pathogens, such as garlic viruses. The method brings a new procedure for detection of these viruses.

Oponenti: Doc. Ing. Tomáš Vyhnánek, Ph.D.

Mgr. Šárka Linhartová

Metodika byla schválena odborem výzkumu MZe pod č.j. xxxx ze dne xxxx

Ministerstvo zemědělství doporučuje tuto metodiku pro využití v praxi.

Obsah:

	strana
1. Úvod a cíl metodiky	3
2. Vlastní popis metodiky	4
2.1 Podstata metody	4
2.2 Potřebné technické vybavení	4
2.3 Pracovní postup a vyhodnocení experimentálních dat	5
3. Novost, přednosti metody a možnosti rutinního využití	8
4. Popis uplatnění Certifikované metodiky	9
5. Ekonomické aspekty	9
6. Seznam použité související literatury	10
7. Seznam publikací, které předcházely metodice a byly publikovány	11

1. Úvod a cíl metodiky

Česnek se v našich podmínkách používá jako zelenina, koření, ale ve velké míře i jako léčivá rostlina. Má celkově velmi pozitivní vliv na lidský organismus. V minulosti, kdy ještě nebyly známy léky antibiotického účinku, byl česnek využíván jako přírodní antibiotikum (Konvička 1998, Kóňa, Kóňová 2005).

Česnek snižuje vysoký krevní tlak, cholesterol, je antioxidant, má protinádorové účinky a působí proti trombóze (Li 2000). Mimořádně ceněnou vlastností jsou jeho antibakteriální a protiplísňové účinky (Janča, Zentrich 1994).

Viry představují heterogenní skupinu mikroorganismů. Jsou to nebuněčné živé organismy, které se mohou rozmnožovat pouze v hostitelských buňkách. Viry jsou složeny z nukleové kyseliny (DNA nebo RNA, nikdy ne z obou) a bílkovinného obalu (kapsid) (Navrátil 2010, Rosypal a kol. 2003, Rosypal 2012).

Česnek kuchyňský napadá celý komplex virů. Nejčastějším virem napadajícím česnek je Virus žluté zakrslosti cibule – *Onion yellow dwarf virus* (OYDV), který společně s *Leek yellow stripe virus* (LYSV) patří do rodu *Potyvirus*. Dalšími významnými viry jsou *Garlic common latent virus* (GCLV) či *Shallot latent virus* (SLV), které patří do rodu *Carlavirus*. Identifikovány byly také viry rodu *Allexvirus*. Na listech viry napadených rostlin se objevují žluté ohraničené pruhy. U některých odrůd česneku se může vyskytovat symptomová latence.

Pěstování a výnos česneku jsou negativně ovlivňovány viry. Viry negativně působí na kvalitu i kvantitu produkce česneku, což vede k vysokým ekonomickým ztrátám. Virová onemocnění mohou snižovat výnosy o 20–60 % (Conchi 2005, Šutič 1999). U citlivých odrůd můžou být viry velmi škodlivé speciálně tam, kde se neprovádí ochranná fytosanační opatření (Šutič 1999, Diekmann 1997). Z toho důvodu se v posledních desetiletích zvyšuje snaha detekovat tyto viry a ozdravovat česnek od těchto virů.

Cílem metodiky bylo extrahovat virovou RNA z napadených listových pletiv či a optimalizovat metodu detekce jednotlivých virů na základě detekce sekvencí genu pro plášťový protein metodou SYBR Green real-time PCR. Metodika vychází také ze znalostí, které již byly publikovány (Leišová – Svobodová a Karlová- Smékalová 2011).

2. Vlastní popis metodiky

2.1 Podstata metody

Pro izolaci nukleových kyselin všeobecně je k dispozici škála metod, kde je prvním krokem lýza buněk. Pro lýzu rostlinných buněk česneku s buněčnou stěnou musí být použita nějaká forma mechanické síly, např. drcení tkáně zmrazené tekutým dusíkem v třecí misce.

Celková RNA byla extrahována z napadených listových pletiv či pomocí komerční soupravy High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Mannheim, Germany) dle protokolu od výrobce „Protocol for isolation of viral nucleic acids for PCR or RT-PCR“.

Detekce viru je založená na detekci sekvencí genu pro plášťový protein metodou SYBR Green real-time PCR, která se osvědčila jako vhodný nástroj pro detekci vysoce variabilních patogenů jako jsou viry česneku.

2.2 Potřebné technické vybavení

1,5 a 2 ml sterilní zkumavky
Analytická váha
Termoblok
Centrifuga s otáčkami min. 8000 otáček/min
Chladnička
Mikropipety
Mrazicí box (-20°C, -80°C)
Ochranné gumové rukavice bez pudru
PCR destičky vč. víček či folie
Stolní minicentrifuga
Špičky s filtrem na automatické pipety
Spektrofotometr
Váženky
Vortex
Třecí misky a tloučky
Přístroj na RT-PCR: Step One (Applied Biosystems, Foster City, USA)

Pro izolaci RNA a RT-PCR reakce jsou potřebné následující *roztoky a chemikálie*:

- tekutý dusík
- komerční souprava High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Mannheim, Německo)
- Syntetické oligonukleotidy - primery specifické pro daný druh rostliny (Tabulka 1)
- Ultra Pure H2O pro PCR
- *Power* SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, USA, Cat.No 4367659)
- MultiScribe™ Reverse Transcriptase (Applied Biosystems, Foster City, USA)
- RNase Inhibitor (Applied Biosystems, Foster City, USA)
- Proteináza K (součást kitu High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Mannheim, Německo)

2.3 Pracovní postup a vyhodnocení experimentálních dat

Izolace RNA

Protokol- doporučená opatření

-Při práci je nutno používat rukavice aby nedošlo ke kontaminaci vzorků RNázami

-Je nutné používat sterilní zkumavky a automatické pipety, určené výhradně pro práci s RNA

-Pro snížení rizika degradace RNA a kontaminace mezi jednotlivými vzorky otevírat jednotlivé mikrozkumavky pouze na nezbytně nutnou dobu

-Při pipetování vzorků do mikrozkumavek pro každý vzorek použit novou špičku

-Pro pipetování používat špičky s filtrem

Protokol- pracovní postup

- Podle počtu vzorků nachystat a popsat mikrozkumavky o objemu 1,5 µl, zapnout termoblok a nastavit teplotu na 72 °C
- Do třecí misky s tloučkem nalít tekutý dusík a přidat 200 mg rostlinného pletiva

- Obsah misky rozdrtit tloučkem až vznikne homogenní kaše a obsah přemístit do připravené plastové mikrozkumavky o objemu 1,5 µl ve které je předem napipetováno 200 µl Binding Buffer a 50 µl Proteinázy K (jsou součástí kitu)
- Mikrozkumavky zavíčkovat, ihned přemíchat pomocí vortexu a přemístit do termobloku předehřátého na 72°C a inkubovat po dobu 10 minut
- Přidat 100 µl Binding Buffer a promíchat pomocí vortexu
- Obsah mikrozkumavek přepipetovat do High Pure filter tube (zkumavka s filtrem, která je součástí kitu)
- Zkumavky s filtrem přemístit do centrifugy a odstředit po dobu 1 minuty při 8 000 *x* g
- Po centrifugaci vylít vodnou fázi a filtr umístit do nové zkumavky , která je součástí kitu
- Přidat 500 µl Inhibitor Removal Buffer
- Zkumavky s filtrem přemístit do centrifugy a odstředit po dobu 1 minuty při 8 000 *x* g
- Po centrifugaci vylít vodnou fázi a filtr umístit do nové zkumavky
- Přidat 450 µl Wash Buffer
- Zkumavky s filtrem přemístit do centrifugy a odstředit po dobu 1 minuty při 8 000 *x* g
- Po centrifugaci vylít vodnou fázi a filtr umístit do nové zkumavky a znovu přidat 450 µl Wash Buffer
- Zkumavky s filtrem přemístit do centrifugy a odstředit po dobu 1 minuty při 8 000 *x* g
- Po centrifugaci vylít vodnou fázi a filtr umístit zpátky do té samé zkumavky
- Zkumavky s filtrem přemístit zpátky do centrifugy a odstředit po dobu 10 sekund při rychlosti 13 000 *x* g
- Po centrifugaci vylít zbytkovou vodní fázi a filtr umístit do nové sterilní 1,5 µl mikrozkumavky
- Přidat 50 µl Elution Buffer a odstředit po dobu 1 minuty při 8 000 *x* g
- Po centrifugaci zlikvidovat filtr a mikrozkumavku zavíčkovat. Mikrozkumavka obsahuje rozpuštěnou virovou RNA. Takto připravené vzorky uchováváme v -80 °C

Kvalita a koncentrace RNA byla určena spektrofotometricky pomocí spektrofotometru Gene Quant (Amersham Pharmacia, Upsala, Sweden) a to odečtem z přístroje.

Spektrofotometrické měření koncentrace extrahované RNA

- absorbancí při vlnových délkách 260 a 280 nm (A260/A280), při které mají absorpční maximum bílkoviny. Hodnota tohoto poměru je optimální, pokud se pohybuje v rozmezí 1,9-2,0. V případě špatné kvality RNA, izolaci opakujeme.

Vzorky RNA jsou naředěny Rnase free vodou na pracovní koncentraci 60ng/µl.

SYBR Green real-time RT PCR reakce

RNA vzorků byla přepsána na cDNA jako první krok RT-PCR.
Real-time PCR byly prováděny v reakčním objemu 25 µl obsahujícím *Power* SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, USA) v objemu 12.5µl, 1.5µl každého z primerů specifických pro daný druh viru(mix forvard a reverse primeru o koncentraci 10 µM) (Leišová-Svobodová a Karlova- Smékalová 2011), 0.125 µl Transcriprázy, 0.5 µl Inhibítoru a 8.375 µl RNA free vody. Real-time kvantitativní PCR byly prováděny v StepOne cykléru v MicroAmp optických 96- jamkových destičkách (Applied Biosystems, Foster City, USA). Reakční podmínky byly následující: 30min při 48°C, 10 min při 95 °C, 40 cyklů: 15 sec. při 95 °C a 1 min. při 60 °C a ze závěrečné disociační fáze: 15 sec. při 95 °C, 1min.. při 60 °C a 95 °C. Součástí každé analýzy byly pozitivní plasmidové kontroly (Leišová-Svobodová a Karlova-Smékalová 2011) a negativní kontroly. Každý vzorek byl analyzován ve třech opakováních.

Tabulka 1: Sekvence primerů pěti virů česneku kuchyňského SYBR Green real- time-PCR detekci (Dovas et. al 2001)

Druh	Sekvence primeru	Délka amplikonu
Onion yellow dwarf virus	F 5´-TTTAGCACGTTACGCATTCGA-3´ R 5´-TTACCATCCAGGCCAAACAA-3´	132 bp
Leek yellow stripe virus	F 5´-AAGAACACCAGTTAGAGCGCG-3´ R 5´-TGCCTCTCCGTGTCCTCATC-3´	126 bp
Shallot latent virus	F 5´-AACAAAGCAGCGATTCAACC-3´ R 5´-ACATCCGAAGAAACCTCCAGT-3´	160 bp
Garlic common latent virus	F 5´-CGACCACCTGCTGGTTGG-3´ R 5´-TCAAGTGGCTGCACACAAGC-3´	106 bp
Garlic mite-borne filamentous virus	F 5´-CYGCTAAGCTATATGCTGAARGG-3´ R 5´-TGTTRCAARGTAAGTTTAGYAATATCAACA-3	191 bp

Vyhodnocení dat

Data byla vyhodnocována pomocí programu Sequence Detection Software (Applied Biosystems, Foster City, USA) s automatickým nastavením parametrů programu. Byly odečteny hodnoty Ct a byla hodnocena disociační křivka pro každý vzorek. Jestliže hodnoty Ct dosahovaly hodnoty větší než 39, byl vzorek považován za negativní na přítomnost stanovovaného druhu viru. Když byl vzorek pozitivní, tzn. Ct menší než 39, byla hodnocena specificita PCR produktu z analýzy disociační křivky.

Nejprve byla sestrojena kalibrační křivka závislosti Ct hodnot na počtu kopií sériově ředěného plasmidového standardu. Poté byly z kalibrační křivky odečítany hodnoty počtu kopií cílové sekvence viru pro každý vzorek.

3. Novost, přednosti metody a možnosti rutinního využití

Předností metody detekce virů česneku OYDV, LYSV, GCLV, SLV a GMbFV je, že je dobře aplikovatelná pro rutinní využití. Specifické primery sekvencí genu pro plášťový protein metodou SYBR Green real-time PCR se již osvědčily u testování přítomnosti virů pro praktické účely, což potvrzuji i některé publikace (Leišová-Svobodová, Karlová-Smékalová 2011).

Díky zařazení standardů lze jednoznačně identifikovat konkrétní druh virů a správně vyhodnotit analýzy. Správná detekce virů může následně sloužit i pro řešitele problematiky ozdravování česneku. V posledních desetiletích se zvyšuje snaha ozdravovat česnek od těchto virů což potvrzuje hodně publikací (Sidaros 2004, Senula 2000, Conchi 1991).

Předložená metodika přináší validovaný postup upravený pro detekci virů u různých genotypů česneku a. Bylo provedeno u genetických zdrojů a šlechtitelských materiálů česneku a u materiálu po provedeném ozdravování (Leišová-Svobodová, Karlová-Smékalová 2011).

Je možné ji využívat v běžných laboratořích a to jak v akreditovaném systému tak pro výzkumné a vývojové účely.

4. Popis uplatnění metodiky

Metodika představuje soubor optimalizovaných metod a postupů, na jejichž základě lze provádět rutinní analýzy detekce virů česneku OYDV, LYSV, GCLV, SLV a GMbFV. Výstupem analýzy je přítomnost či nepřítomnost amplifikovaného fragmentu se specifickou křivkou tání u analyzovaných vzorků a standardů, které se použijí pro charakterizaci napadení rostlinného materiálu česneku danými viry.

Uživateli metodiky mohou být orgány státní správy (ÚKZÚZ, SZPI), kontrolní a soukromé laboratoře v ČR.

5. Ekonomické aspekty

Analýza zahrnuje extrakci RNA, real- time PCR reakce a následnou detekci produktů. Časově a pracovně méně náročná je extrakce RNA použitím kitu High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Mannheim, Německo), než fenol-chloroformová extrakce TRIzolem (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) . Kit pro izolaci 100 ks vzorků stojí cca 10 000 Kč.

MultiScribe™ Reverse Transcriptase (100µl) a RNase Inhibitor (2 000U) potřebné pro RT PCR reakce stojí každá cca 2 800 -3000Kč. *Power* SYBR Green PCR master mix 1x5mL stojí cca 13 000-15 000 Kč v závislosti od velikosti pořizovaného balení.

Zpracování 96 PCR vzorků (počet pozic v PCR destičce), trvá cca 3 a půl hodiny PCR cyklu. Cena jedné reakce (pozice v platě) je 32 Kč. Odborně náročnější část analýz představuje vyhodnocení výsledků, které zahrnuje identifikaci a vyhodnocení přítomnosti produktů programem Sequence Detection Software. To si vyžaduje zkušeného pracovníka. Ceny analýz závisejí na kurzu US dolaru a aktuálních cenách chemikálií a počtu analýz na jednom platu.

Pro zavedení metodiky do praxe je třeba počítat s náklady na verifikaci metody na daném pracovišti. Je třeba do analýz zahrnout 5 standardních vzorků (standardů). Náklady na izolaci RNA 100 vzorků 10 000 Kč, náklady na pořízení specifických primerů 2 700 Kč, Standardy a primery jsou materiály, které se na verifikaci nezužitkují všechny a mohou být použity v následných analýzách. Jejich množství závisí na nutnosti opakování některých analýz při zavádění metody. Další přínosy jsou dány možností kontroly ozdravení sadby a šlechtitelských materiálů česneku, protože viry způsobují ekonomické ztráty. Při výnosu česneku 6-7 t/ha a ceně 100-190 Kč za 1kg česneku se úspory mohou pohybovat v řádu několika desítek tisíc korun.

5. Seznam použité související literatury

Conchi V. C., Nome S. F. (1991): Virus free garlic (Allium sativum L.) plants obtained by thermothetapy and meristem tip culture. Journal of Phytopathology, 132(3): 186-192.

Conchi V. C., Perotto M. C., Carfune E., Lunello P. (2005): Program for intensit production for Virus-free Garlic plants . Acta Horticulturae, 677:195–200.

Diekmann M. (1997): Allium spp. FAO/IPGRI, no.18, 59p. ISBN 92-9043-346-9.

Dovas C. I., Hatziloukas E., Salomon R., Barg E., Shiboleth Y., Katis N. I. (2001): Comparison of methods for virus detection in *Allium* spp. J. Phytopathol 149: 731-737.

Janča J., Zentrich J.A (1994): Herbář léčivých rostlin, 1. díl, EMINENT Praha, 1. vydání, ISBN: 80-7182-159-4.

Kóňa J., Kóňová E. (2005): Cibuľové zeleniny, Garmond Nitra, 1. vydání, ISBN: 80-89148-21-2.

Konvička O. (1998): Česnek (*Allium sativum*), Olomouc, ISBN: 80-238-1928-3.

Leišová- Svobodová L., Karlová- Smekalová K. (2011): Detection of garlic viruses using SYBR Green Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. Journal of Phytophatology, 159: 429-434.

Li T. S. C. (2000): Medicinal plants: culture, utilization, and phytopharmacology. Technomic Pub.Co. ISBN: 1-56676-903-5.

Novák F. J. (1990) : Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin. Academia Praha, ISBN: 80-200-0344-4.

Rosypal S. a kolektív autorů (2003): Nový přehled biologie. Scienta Praha, 1.vydání, ISBN: 80-7183-268-5.

Rosypal S. (2002): Úvod do molekulární biologie. Díl třetí, 3. vydání, ISBN: 80-902562-2-8.

Senula A., Keller E. R. J., Lesemand D. E. (2000). Elimination of viruses through meristem culture and thermotherapy for establishment of an in vitrocollection of garlic (*Allium sativum*). Acta Horticulturae, 530: 121-128.

Sidaros S. A., Omar R. A., El-Kewey S. A., El-Khalik S. A. (2004): Virus elimination from infected garlic plants using different techniques. Egyptian J. Virol. 1, 333-341.

Šutič D. D., Ford R. E., Tošič M. T. (1999): Handbook of plant viruses diseases. CRP Press LLC, ISBN: 0-8493-2302-2.

7. Seznam publikací, které předcházely metodice a byly publikovány

Leišová- Svobodová L., Karlová- Smekalová K. (2011): Detection of garlic viruses using SYBR Green Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. Journal of Phytophatology, 159: 429-434.