

**Metodika**  
stanovení odolnosti  
košťálových zelenin vůči  
viru mozaiky vodnice  
(*Turnip mosaic virus*)

Milan Navrátil / Dana Šafářová



Univerzita Palackého v Olomouci  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra buněčné biologie a genetiky



# Metodika

stanovení odolnosti  
košťálových zelenin vůči  
viru mozaiky vodnice  
(*Turnip mosaic virus*)

Certifikovaná metodika

Milan Navrátil / Dana Šafářová

Olomouc 2023

Certifikovaná metodika vznikla za podpory MZe jako součást řešení NAZV QK1910070 „Využití biotechnologických metod a netradičních genetických zdrojů k charakterizaci a tvorbě uniformních linií brukvovité zeleniny se specifickými parametry kvality, výnosu a rezistence k významným chorobám“.

Metodika byla schválena MZe ČR, osvědčením o certifikaci č. UKZUZ 108742/2023

Autorský kolektiv

prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc., Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.

Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc

Oponenti

prof. Ing. Radovan Pokorný, Ph.D.

Vranovská 27, 614 00 Brno

Mgr. Šárka Linhartová, Ph.D.

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Odbor diagnostiky škodlivých organismů rostlin, Šlechtitelů 773/23, 779 00 Olomouc.

Odpovědná redaktorka Tereza Vintrová

Design a sazba Jiřina Vaclová

Vydala a vytiskla

Univerzita Palackého v Olomouci

Křížkovského 8, 771 47 Olomouc

[www.vydavatelství.upol.cz](http://www.vydavatelství.upol.cz)

Olomouc 2023

1. vydání

© Milan Navrátil, Dana Šafářová, 2023

© Univerzita Palackého v Olomouci, 2023

Neoprávněné užití tohoto díla je porušením autorských práv a může zakládat občanskoprávní, správněprávní, popř. trestněprávní odpovědnost.

ISBN 978-80-244-6266-0 (tisk)

ISBN 978-80-244-6267-7 (ipdf)

2023/0039 (tisk)

2023/0040 (ipdf)

Neprodejná publikace

# Obsah

<b>1</b>	<b>Cíl metodiky</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Vlastní popis metodiky</b>	<b>8</b>
2.1	Úvod do problematiky	8
2.2	Postup stanovení odolnosti košťálových zelenin vůči TuMV	10
2.2.2	Biologický materiál – izoláty virů, příprava a pěstování experimentálních rostlin	11
2.2.3	Technické vybavení a materiál	11
2.2.4	Pracovní postup – inokulace rostlin	12
2.2.5	Hodnocení odolnosti rostlin – vizuální hodnocení příznaků	13
2.3	Detekce TuMV pomocí RT-qPCR	16
2.3.2	Technické vybavení, materiál a použité chemikálie	16
2.3.3	Pracovní postup – izolace RNA a příprava cDNA (reverzní transkripce)	18
2.3.4	Pracovní postup – reverzní transkripce s následnou kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí (RT-qPCR)	21
2.3.5	Validace RT-qPCR metody	24
2.4	Detekce TuMV pomocí DAS-ELISA testu	26
2.4.1	Technické vybavení, materiál a použité chemikálie	27
2.4.2	Provedení a vyhodnocení DAS-ELISA testu	28
<b>3</b>	<b>Srovnání novosti postupů</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>Popis uplatnění metodiky</b>	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>Ekonomické aspekty</b>	<b>32</b>
<b>6</b>	<b>Literatura</b>	<b>34</b>
	Seznam použité související literatury	34
	Seznam publikací, které předcházejí metodice	35

<b>7</b>	<b>Přílohy</b>	<b>36</b>
	Tabule I	37
	Tabule II	38
	Tabule III	39
	Tabule IV	40
	Tabule V	41
	Tabule VI	42
	Tabule VII	43



# 1

# Cíl metodiky

Cílem předkládané metodiky je etablovat postup skríníngu rezistence košťálových zelenin vůči viru mozaiky vodnice (*Turnip mosaic virus*, TuMV) v tuzemských šlechtitelských programech a poskytnout spolehlivý diagnostický RT-qPCR anebo ELISA test využitelný jak pro hodnocení rezistence košťálových zelenin vůči TuMV, tak monitoring zdrojů šíření TuMV.



## 2 Vlastní popis metodiky

Vlastní metodika je rozdělena do tří částí. V první části jsou popsány biologické testy rezistence košťálových zelenin vůči TuMV, ve druhé RT-qPCR detekce TuMV a ve třetí DAS-ELISA detekce TuMV.

### 2.1 Úvod do problematiky

K nejvýznamnějším patogenům košťálových zelenin patří bakterie *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, původce hnědé bakteriózy košťálovin, a hlenka kapustová (*Plasmodiophora brassicae*) vyvolávající nádorovitost kořenů košťálovin. Mezi významné patogeny patří i viry. Původci virových žloutenek mohou být čtyři druhy: virus mozaiky květáku (*Cauliflower mosaic virus*), virus mozaiky vodnice (*Turnip mosaic virus*), virus žluté mozaiky vodnice (*Turnip yellow mosaic virus*) a virus žloutenky vodnice (*Turnip yellows virus*). Tyto viry se vyskytují nejen jednotlivě, ale často i ve směsných infekcích a negativně ovlivňují zemědělskou produkci. Infekce rostlin vede průměrně až k 30% snížení výnosů a také negativně ovlivňuje kvalitu skladovaných zelenin (Walsh a Jenner 2002).

Přestože bylo v posledních letech, a to nejen u nás, pozorováno šíření viru žloutenky vodnice (TuYV), které s vysokou pravděpodobností souvisí s rozšířením pěstování řepky olejky, a to i v blízkosti pěstitelských ploch košťálových zelenin, je celosvětově za nejvýznamnější a nejrozšířenější virus infikující košťálové zeleniny považován virus mozaiky vodnice (TuMV) (Nellist a kol. 2022).

Virus mozaiky vodnice (TuMV) je taxonomicky řazen do rodu *Potyvirus* – nejpočetnějšího rodu rostlinných jednolákových RNA virů. Onemocnění „mozaika brukvovitých“, způsobené virem mozaiky vodnice, bylo



poprvé popsáno v USA v roce 1921 na brukvi (*Brassica rapa* L.), čínském zelí (*B. pekinensis* Rupr.) a japonské hořčici (*B. japonica* Thunb.) (Gardner a Kendrick 1921; Schultz 1921).

TuMV patří mezi nejrozšířenější viry rostlin, má široký okruh hostitelů zahrnující 318 druhů rostlin patřících do 43 různých čeledí, mezi které patří převážně kulturní, ale i plevelné nebo planě rostoucí rostliny (Nellist a kol. 2022).

Uvádí se, že virus mozaiky vodnice je přenášen neperzistentním způsobem více než 50 druhy mšic. V České republice jsou nejčastěji jako vektory uváděny běžně se vyskytující, monitorované, druhy mšic, a to mšice zelná (*Brevicoryne brassicae* L.) a mšice broskvoňová (*Myzus persicae* Sulzer) (Rychlý a kol. 2022).

Virus se vyskytuje prakticky po celém světě. Je velice variabilní, do současné doby bylo popsáno více než 900 izolátů původem z různých zemí a hostitelských rostlin (NCBI 2023). Na základě biologických vlastností a podle symptomů, které vyvolávají na diferenčních liniích zástupců *Brassica napus*, jsou izoláty TuMV rozdělovány do 12 patotypů. V současnosti se však častěji používá rozdělení podle hostitelských typů nebo do šesti fylogenetických skupin (tzv. basal-B, basal-BR, Asian-BR, world-B, Iranian 1 a 2), které dobře korelují s jejich rozdíly v patogenitě a odrážejí i jejich geografický původ (Yasaka a kol. 2017). Nejrozšířenější z nich je fylogenetická skupina world-B, která se vyskytuje celosvětově a preferuje domestikované formy r. *Brassica*. Do této skupiny patří i většina doposud analyzovaných českých izolátů s výjimkou dvou rekombinantních izolátů spadajících do skupiny basal-B (Ohshima a kol. 2002, Tomimura a kol. 2004, Kawakubo a kol. 2021).

V České republice byl výskyt TuMV poprvé zaznamenán v polovině 80. let minulého století na rostlinách máku (*Papaver somniferum*) (Špak a Kubelková 1990). V roce 1991 byl publikován jeho výskyt na rostlinách špenátu (*Spinacia oleracea*), u kterých je choroba zodpovědná za snížení kvality a výnosu čerstvé listové hmoty (Chod a Jokeš 1991). TuMV byl rovněž izolován z rostlin zelí (*B. oleracea* var. *capitata*), křenu (*Armoracia rusticana*), pekingského zelí (*B. pekinensis*), řepky olejky (*B. rapa*), kadeřávku (*B. oleracea* var. *acephala*), květáku (*B. oleracea*

var. *botrytis*) a také česnáčku lékařského (*Alliaria officinalis*) (Kawakubo a kol. 2021).

Kontrola šíření viru mozaiky vodnice je v běžné praxi obtížná. Doporučuje se prostorová izolace od možných zdrojů infekce, likvidace plevelů–hostitelů v okolí, monitoring výskytu příznaků infekce a pěstování odolných/tolerantních odrůd. Monitoring vektorů a jejich následná regulace pomocí insekticidů je problematická, a to jak z důvodu jejich často nízké účinnosti, tak z důvodu chemické kontaminace produkce a zvýšené ekologické zátěže životního prostředí.

V současné době neexistuje jednoznačně účinná chemická ochrana k omezení škodlivosti virů. V tomto kontextu se jeví jako vysoce žádoucí výběr genotypů se zvýšenou odolností, případně tolerancí k onemocnění a jejich širší využití jak pro přímé pěstování, tak pro zařazení do šlechtitelských programů.

## 2.2 Postup stanovení odolnosti košťálových zelenin vůči TuMV

### 2.2.1 Bezpečnostní doporučení při provádění biologických testů

V kulturačních prostorách, ve kterých připravujeme rostliny a provádíme vlastní biologické testy odolnosti, je potřeba zabezpečit základní hygienická opatření zamezující kontaminaci rostlin a virových izolátů jinými patogeny nebo viry, které mohou zkreslit výsledky testů:

- Zabezpečit prostorovou nebo fyzickou izolaci testovaných rostlin od zdrojů inokula a dalších virů.
- Zamezit přístupu potenciálních virových vektorů a škůdců.
- Omezit přístup neproškoleným pracovníkům.
- Odstranit a bezpečně likvidovat infikovaný materiál po ukončení testu.
- Čistit a dezinfikovat pěstební stoly a jiné potenciálně kontaminované povrchy a materiály na konci testu.

## 2.2.2 Biologický materiál – izoláty virů, příprava a pěstování experimentálních rostlin

K biologickým testům rezistence košťálových zelenin byly použity izoláty viru mozaiky vodnice TGZ42, TGZ43 (hostitelský typ B, fylogenetická skupina world-B, viz Příloha – Obrázek 1).

Virulentní izoláty TuMV udržujeme a množíme např. na rostlinách zelí *B. oleracea* var. *capitata*: cvs. Pourovo polopozdní, Zora, nebo kedlubnu (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*) cv. Violet. Dlouhodobě (cca do 12 měsíců) je můžeme uchovávat hluboce zmrazené v PVC sáčcích při minimální teplotě  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Poté je ale nutné virový izolát oživit na doporučených hostitelských rostlinách a po namnožení listy opětovně zamrazit (a opětovně uchovávat maximálně po dobu 12 měsíců).

Výsev semen testovaných rostlin provést do perlitu (Profi-Grow, Česká republika); naklíčené rostlinky ve stadiu 1. pravého listu pikýrovat do kontejnerů 9×9 cm a substrátu TS 3 medium s jílem (Klasmann-Deilmann GmbH, Německo) a pěstovat ve skleníku. Vhodné podmínky kultivace v pěstební kóji jsou: fotoperioda 16 h den / 8 h noc a teplota  $20\text{--}22\text{ }^{\circ}\text{C}$  /  $16\text{--}18\text{ }^{\circ}\text{C}$  s větráním pomocí otevření vrchlíku. V období nízké světelné intenzity (např. v zimních měsících) je možné prodloužení fotoperiody dne řešit přisvětlováním (např. zářivkovými svítidly Trevos Prima 236 [Trevos, Česká republika] se zářivkami Osram Lumilux Cool White [Osram, Německo, 36 W, 3 350 lm, 4000 K]). Výživu rostlin zabezpečovat přihnojováním jednou týdně Kristalonem Start (AGRO CS, Česká republika) v koncentraci  $1\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  vody. Rostliny dopěstovat do fáze dvou až čtyř pravých listů a následně použít k inokulaci.

## 2.2.3 Technické vybavení a materiál

- Autokláv, horkovzdušný sterilizátor, analytické váhy, pH-metr, míchačka, chladnička, hlubokomrazicí box  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , výrobek šupinkového ledu.

- 0,01 M fosfátový pufr (pH 7,4), křemelina ‚Celite‘, etanol denaturovaný, pěstební substrát (TS 3 medium s jílem, Klasmann-Deilmann GmbH, Německo).
- Automatické mikropipety, špičky, vyšetřovací rukavice, pinzety, láhve se šroubovacím uzávěrem, alobal, papír na vyšetřovací lůžko, lihový kahan, termoizolační vanička, porcelánová miska a tlouček, lihový fix (popisovač), korkovrt, jmenovky, UH pěstební kontejnery.

## 2.2.4 Pracovní postup – inokulace rostlin

Princip mechanické inokulace virů spočívá v potírání povrchu listu tak, aby byly narušeny povrchové buňky a virus byl vnesen do buněk inokulovaného listu, aniž by došlo k jejich přílišnému mechanickému poškození a následnému odumření. K mechanické inokulaci se obvykle používá vylisovaná šťáva nebo homogenizované pletivo s pufrem a přídavkem abraziva, které rozetřeme na horní povrch jednoho nebo více listů testované rostliny. Testované rostliny by měly být mladé (s měkkými listy); listy na stárnoucích rostlinách jsou pro tuto techniku méně vnímavé, tedy nevhodné.

Před vlastní manipulací je nezbytné si pečlivě umýt ruce mýdlem nebo desinfekčním prostředkem, a zamezit tak nechtěným kontaminacím lehce přenosnými viry, jako jsou např. tobamoviry nebo potexviry. Při přípravě inokula a manipulaci s ním používat vyšetřovací rukavice.

Vybrat a jmenovkou označit testované rostliny. Na jmenovce uvést základní informační údaje: genotyp/kultivar, označení rostliny, datum inokulace, izolát viru.

Biologický test provést mechanickou inokulací prvních dvou pravých listů homogenátem pletiva listů rostlin infikovaných TuMV.

Inokulum viru připravit rozetřením 1 g infikovaného listu v 9 ml 10 mM fosfátového pufru (pH 7,4), s 1% přídavkem křemeliny ‚Celite‘. Po celou dobu přípravy a použití inokulum chladit v třecí misce umístěné v šupinkovém ledu. Inokulaci provést molitanovou houbičkou uchycenou v pinzetě, inokulum nanášet jemně na svrchní stranu listu.

Připravené inokulum postačí k inokulaci cca 50 rostlin. Nedoporučuje se ho používat déle než 20 min.

Cca 5 min po inokulaci je nezbytné, ještě před jeho zaschnutím, listy opatrně opláchnout vodou např. pomocí postřikovače. Není vhodné rostliny den před a den po inokulaci vystavit přímému slunci – při silném slunečním záření je nutné stínění rostlin. Inokulované listy označit vyseknutím malého terčíku pomocí korkovrtu (náplně do propisky).

Každá testová varianta se skládá minimálně z 10 rostlin testované odrůdy, dvou rostlin téže odrůdy, které představují negativní kontrolu a dvou rostlin hořčice (*Sinapis alba*), odrůda Polárka, inokulovaných na závěr stejným inokulem, které slouží jako pozitivní kontrola pro ověření jeho infekčnosti. Průběh infekce monitorovat v týdenních intervalech po dobu tří týdnů, v jejich průběhu zaznamenávat vývoj příznaků a přítomnost viru pak zjišťovat tři týdny po inokulaci pomocí DAS-ELISA testu anebo RT-qPCR.

Hlavním problémem se může stát, že mechanické poškození listu je příliš silné; což může vést k tomu, že buňky odumírají dříve, než se virus pomnoží a začne šířit, a virus tak neinfikuje testovanou rostlinu. Příznaky nadměrného poškození pletiva jsou hnědé, mrtvé oblasti, které se objevují na povrchu naočkovaných listů během jednoho nebo dvou dnů po inokulaci.

## 2.2.5 Hodnocení odolnosti rostlin – vizuální hodnocení příznaků

Na sledovaných rostlinách hodnotíme typ a vývoj příznaků infekce. Soustředíme se na následující příznaky:

- Lokální léze na inokulovaných listech: velikost, chlorotické léze, světle zelené léze, nekrotické léze, kroužkovitost, mozaika. Zaznamenáváme dobu objevení po inokulaci.
- Systémové příznaky: léze a kroužkovitost; mozaiky a skvrnitosti; projevy asociované s žilkami – prosvětlení žilek (vein clearing), lemování žilek (vein banding); deformace listů; odumírání vrcholů nebo zakrslost.

Příklady hodnocení odolnosti košťálových zelenin jsou uvedeny v Tabulce 1 a v Příloze – Tabule I až VII.

Stupnice odolnosti (příp. tolerance) košťálových zelenin vůči TuMV sestavená na základě vizuálního hodnocení příznaků a ověření přítomnosti TuMV ELISA testem (případně RT-qPCR):

- Rostliny imunní, vysoce odolné: příznaky infekce TuMV nejsou pozorovány na inokulovaných listech ani v systému rostliny; nepřítomnost TuMV je potvrzena laboratorním testem.
- Rostliny vnímavé, potenciálně tolerantní: příznaky infekce TuMV nejsou pozorovány na inokulovaných listech ani v systému rostliny nebo jsou velmi mírné; přítomnost TuMV je potvrzena laboratorním testem. V případě tolerantních genotypů není ve výnosových zkouškách snížen výnos a kvalita produktu.
- Rostliny rezistentní, odolné (hypersenzitivní): příznaky infekce TuMV jsou pozorovány jen na inokulovaných listech, nejsou pozorovány v systému rostliny; přítomnost TuMV je potvrzena v inokulovaných listech (při hypersenzitivní reakci tomu tak být nemusí), ale nikoliv v systému rostliny.
- Rostliny vnímavé: příznaky infekce jsou pozorovány jak na inokulovaných listech, tak v systému rostliny; přítomnost TuMV je potvrzena laboratorním testem.

**Tabulka 1** ■ Příklady hodnocení biologických testů na odolnost vůči TuMV

Kultivar	Druh	ELISA	symptomy IL/S	Hodnocení odrůdy
APOLENA F1	brokolice	++	ChM/ChM*	VNÍMAVÁ
LEONORA	brokolice	++	ChM/ChL	VNÍMAVÁ
SYMPATIC	kadeřávek	++	ChM/ChM**	VNÍMAVÁ
TINTORETO	kadeřávek	++	ChM/ChM*	VNÍMAVÁ
SCARLET	kadeřávek	++	ChM-NL/ChMN	VNÍMAVÁ
ROSSIGNOL	kadeřávek	--	-/-	VYSOCE ODOLNÁ

<b>Kultivar</b>	<b>Druh</b>	<b>ELISA</b>	<b>symptomy IL/S</b>	<b>Hodnocení odrůdy</b>
BLISTRA F1	kapusta hlávková	++	ChM/ChM*	VNÍMAVÁ
PŘEDZVĚŠT	kapusta hlávková	++	NL/NL	VNÍMAVÁ
RANÁ ŽLUTÁ	kapusta hlávková	--	NL/-	ODOLNÁ
VERITA F1	kapusta hlávková	++	ChN-NL/-	VNÍMAVÁ
CASIOPEA	kapusta růžičková	++	ChM/ChM*	VNÍMAVÁ
DOLORES F1	kapusta růžičková	--	-/-	VYSOCE ODOLNÁ
GIGANT	kedluben	++	NL/NL	VNÍMAVÁ
GASTON F1	kedluben bílý	++	ChM/ChM*	VNÍMAVÁ
KARTÁGO F1	kedluben bílý	++	ChM/ChM**	VNÍMAVÁ
KORFU F1	kedluben bílý	++	NL/ChNN	VNÍMAVÁ
LUNA	kedluben bílý	++	ChNN/ChNN	VNÍMAVÁ
TROJA F1	kedluben bílý	++	ChM/ChM**	VNÍMAVÁ
AMETYST F1	kedluben modrý	++	NL/ChNN	VNÍMAVÁ
BETA	květák	++	ChM/ChM**	VNÍMAVÁ
DELTA	květák	++	NL/NL	VNÍMAVÁ
OCTAVIAN	květák	--	ChL/-	ODOLNÁ
ACORD	ředkev	++	ChM/ChM**	VNÍMAVÁ
ALABASTER F1	ředkev bílá	--	-/-	VYSOCE ODOLNÁ
SLOVANA	ředkev červená	--	-/-	VYSOCE ODOLNÁ
CAPITOL F1	zelí čínské	--	-/-	VYSOCE ODOLNÁ
PAKET	zelí čínské	--	ChL/-	ODOLNÁ
HORNET	zelí hlávkové bílé	++	ChM/ChM**	VNÍMAVÁ
ATILA F1	zelí hlávkové bílé	++	ChM*	TOLERANTNÍ
AVAK F1	zelí hlávkové bílé	--	-/-	VYSOCE ODOLNÁ
PYLON F1	zelí hlávkové bílé	++	ChM/ChM**	VNÍMAVÁ
STATUS F1	zelí hlávkové bílé	++	ChM/ChM*	VNÍMAVÁ
TARGET F1	zelí hlávkové bílé	++	ChM/ChM*	VNÍMAVÁ
ZORA	zelí hlávkové bílé	++	ChM/ChM**	VNÍMAVÁ

Kultivar	Druh	ELISA	symptomy IL/S	Hodnocení odrůdy
MARS	zelí hlávkové červené	++	ChM/ChM**	VNÍMAVÁ
CAPITOL F1	zelí pekingské	--	-/-	VYSOCE ODOLNÁ
FORCO F1	zelí pekingské	++	ChM/ChM**	VNÍMAVÁ

ChM - chlorotická mozaika, ChM\* - slabá chlorotická mozaika, ChM\*\* - silná chlorotická mozaika, ChMN - chlorotická-nekrotizující mozaika, ChL - ojediněle chlorotické léze, ChL\* - chlorotické léze, NL - nekrotické nebo nekrotizující léze, ++ pozitivní výsledek ELISA testu, -- negativní výsledek ELISA testu, - bez příznaků, IL - infikovaný list, S - systém.

## 2.3 Detekce TuMV pomocí RT-qPCR

### 2.3.1 Biologický materiál – odběr vzorků

Vzorky je nutné odebírat z inokulovaných listů a z nově narostlých listů (systém rostliny), přednostně z jejich příznakových částí. Krátkodobě je lze uchovávat v mikrotenovém (PVC) sáčku v chladničce. Odumírající nebo nekrotické části listů nejsou pro diagnostiku vhodné.

V případě testování přítomnosti TuMV ve volně rostoucích rostlinách je nutné odebrané, nejlépe příznakové části rostlin vložit do mikroténového sáčku a vzorek v co nejkratším čase dopravit do laboratoře. Po celou dobu převozu vzorek uchovávat v chladu, v období teplých dní lze pro převoz vzorků použít předchlazené termoadoby. Vzorky krátkodobě uchovááme v chladničce, dlouhodobě v hlubokomrazícím boxu při minimálně -70 °C. Odumírající nebo nekrotické části listů nejsou pro diagnostiku vhodné.

### 2.3.2 Technické vybavení, materiál a použité chemikálie

Uspořádání a vybavení laboratoří pro izolaci nukleové kyseliny, přípravu PCR reakční směsi, provedení a vyhodnocení PCR reakce, musí zamezit kontaminaci vzorků, izolované nukleové kyseliny anebo reakční směsi izolovanou nukleovou kyselinou anebo amplifikačním produktem.



- Termocykler pro real-time PCR (Roche LightCycler 480), stolní centrifuga (min. 11 000 g), spektrofotometr (např. NanoDrop), homogénizátor (např. FastPrep), suchá lázeň, analytické váhy, vortex, minicentrifuga.
- dNTP Mix 10 mmol·l<sup>-1</sup> (Fermentas, kat.č. R0192), Random primers 500 ng·μl<sup>-1</sup> (Promega, kat. č. C1181), RNasin ribonuclease inhibitor 40 U·μl<sup>-1</sup> (Promega, kat. č. N2111), dEPC voda, Tetro™ Reverse Transcriptase (Bioline – Meridian, kat. č. BIO-65050), NucleoSpin RNA Plant kit (Macherey-Nagel, kat. č. 740949), qPCR 2× Blue Master Mix\_BLUE (Top-Bio, s.r.o., kat. č. B623xl).
- Syntetický TuMV standard – interní standard: pGem-T plazmid s inzertem sekvence plášťového proteinu [TuF 8705-8726 (5' CAAG CAATCTTTGAGGATTATG 3') / TuR 9690-9669 (5' TATTTCCCATAAGC GAGAATAC 3')].
- Pro detekci viru TuMV použít následující primery a sondu:  
 Forward primer: TuMV9290F 5' CCCATTTTCAGTGACGTMG 3'  
 Reverse primer: TuMV9390R 5' GCTCATGTTCGGTTAAATTG 3'  
 Sonda: TuMV\_2 6-FAM AAGCGTAACCAAGACCGACCATA  
 BHQ-1
- Pro kontrolu kvality izolace RNA a přípravy cDNA se využívá mitochondriální gen *Nad5* (interní kontrola). Pro jeho detekci použijeme následující primery a sondu (Menzel a kol. 2002; Valentová a kol. 2021):  
 Forward primer: NAD5R 5' GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGT 3'  
 Reverse primer: NAD5F 5' ACATAAATCGAGGGCTATGCG 3'  
 Sonda: IPC\_1 6-FAM CCACAATTAACATCACTACGGTC  
 GGGCTA BHQ-1
- Automatické pipety, špičky s filtrem, porcelánová třecí miska s tloučkem.

### 2.3.3 Pracovní postup – izolace RNA a příprava cDNA (reverzní transkripce)

Vlastní izolace RNA provádíme pomocí komerčně dodávaného izolačního NucleoSpin RNA Plant kitu na bázi kolonek (Tabulka 2). Postupujeme podle návodu výrobce.

Poměr absorbancí A260/A280 izolované RNA by měl mít hodnotu ~2,0. V případě kolonkové izolace využívající princip vazby RNA na silikátovou membránu poměr A260/A280 bývá vyšší, a to 2,1–2,2.

Odborníkovi v oboru jsou známy další postupy homogenizace vzorků a izolace RNA, je nezbytná jejich validace v kombinaci s PCR testem uvedeným v této metodice. Purifikovanou RNA je možné pro další analýzy (např. příprava cDNA) krátkodobě uchovat při 4 °C nebo dlouhodobě skladovat při –70 °C.

**Tabulka 2** ■ Specifikace NucleoSpin RNA Plant kitu

Typ izolace	kolonková, využívá principu adsorpce RNA na silikátovou membránu
Maximální množství výchozího vzorku	100 mg rostlinného pletiva (optimálně 50–70 mg)
Maximální objem kolonky	700 µl
Minimální eluční objem	40 µl (40–60 µl)
Maximální vazebná kapacita	200 µg
Udávané výtěžky RNA (100 mg pletiva)	3–70 µg

#### Izolace celkové RNA

■ Homogenizace vzorku:

- Rozdrtit max. 100 mg vzorku pletiva v tekutém dusíku na jemný prášek. Vzorky nesmí během homogenizace rozmrznout, prášek okamžitě přenést do alikvóty RA1 pufru obsahujícího β-merkaptetoetanol a okamžitě promíchat.
- Max. 100 mg vzorku pletiva homogenizovat po přidání RA1 pufru + β-merkaptetoetanolu pomocí rotor-stator homogenizéru.

Podmínky pro FastPrep® homogenizátor jsou: 4 m·s<sup>-1</sup>, 40 s, homogenizace ve 2ml zkumavce s 1/4" keramickou homogenizační kuličkou).

- Lýze buněk – přidat 350μl RA1 a 3,5μl β-merkaptoetanolu k homogenizovanému pletivu a prudce vortexovat.
- Filtrace lyzátu – filtrační kolonku (NucleoSpin Filtr, fialový proužek) umístit do 2ml sběrné zkumavky, napipetovat do ní homogenát a centrifugovat 60 s při 11 000 g. Filtrát přemístit (pipetováním nebo dekantací) do nové zkumavky (2ml). Při manipulaci nepoškodit pelet na dně sběrné zkumavky.
- Úprava podmínek vázání RNA – k získanému filtrátu přidat stejný objem 70% etanolu a promíchat vortexováním.
- Vázání RNA – do RNA vazebné kolonky (NucleoSpin RNA Plant Column, světle modrá) přenést filtrát s přídatkem 70% etanolu včetně možného precipitátu. Centrifugovat 60 s při 11 000 g, poté umístit kolonku do nové 2ml sběrné zkumavky.
- Vysušení silikátové membrány – do vazebné kolonky přidat 350μl MDB (Membrane Desalting Buffer) a centrifugovat 60 s při 11 000 g pro nezbytné vysušení membrány.
- Ve sterilní zkumavce připravit DNase I reakční směs: pro každou reakci smíchat 10 μl připravené DNase I a 90 μl DNase reakčního pufru a promíchat překlápěním zkumavky. DNase I je náchylná na fyzické poškození, proto s ní nemanipulovat příliš prudce a nikdy ji nevortexovat.
- Štípání DNA – aplikovat 95 μl DNase I reakční směsi přímo na střed silikátové membrány kolonky. Inkubovat v pokojové teplotě 15 min.
- Promytí a vysušení silikátové membrány
  - Promytí I: Přidat 200 μl RA2 na vazebnou kolonku a centrifugovat 60 s při 11 000 g. Umístit kolonku do nové zkumavky (pufr RA2 inaktivuje DNase I).
  - Promytí II: Přidat 600 μl RA3 na vazebnou kolonku. Centrifugovat 60 s při 11 000 g. Odstranit filtrát a umístit kolonku zpátky do sběrné zkumavky.

- Promytí III: Přidat 250  $\mu$ l RA3 na kolonku. Centrifugovat 2 min při 11 000 g. Umístit vazebnou kolonku do nové nuklease-free 1,5ml mikrozkušavky.
- Pozn.: Pokud se tekutina po centrifugaci jakkoli dotkne kolonky, je nutné odstranit filtrát a opakovat centrifugaci.
- Vymytí vysoce čisté RNA – vymýt RNA z vazebné kolonky 60  $\mu$ l RNase-free vody a centrifugovat 60 s při 11 000 g. S cílem získat RNA o vyšší koncentraci může být vymytí provedeno objemem nižším než 60  $\mu$ l (minimálně 40  $\mu$ l).
- Čistotu a koncentraci izolované RNA stanovit pomocí spektrofotometru (Tabulka 3).

**Tabulka 3** ■ Vlastní laboratorní výsledky izolace RNA z listů košťálových zelenin

	Výtěžek RNA $\mu$ g/100 mg	A 260/280 nm
Zelí čínské	31,3	2,19
Zelí hlávkové bílé	11,4-71,5	2,17-2,24
Hořčice bílá	69,0	2,19
Kedluben	7,1-39,0	2,14-2,23
Křen	6,1-15,0	2,13-2,25
Květák	13,9	2,29
Zelí pekingské	14,4	2,22
Tuřín	6,8-84,2	2,11-2,2

### Příprava cDNA (reverzní transkripce)

Pro získání cDNA provést dvoukrokovou reverzní transkripci s použitím random primerů a Tetro™ Reverse Transcriptase (Bioline – Meridian, kat. č. BIO-65050). S ohledem na počet analyzovaných vzorků připravit reakční směsi I a II (Tabulka 4). Vzorky izolované RNA naedit pomocí dEPC vody na koncentraci cca 150  $\mu$ g·ml<sup>-1</sup>.

## Pracovní postup

- K 7  $\mu\text{l}$  reakční směsi I přidat 3  $\mu\text{l}$  RNA (tj. 450 ng na reakci).
- Zkumavky s takto připravenou směsí vložit do termocykleru a inkubovat 5 min při 70 °C.
- Bezprostředně po inkubaci vložit 0,2ml PCR zkumavky do šupinkového ledu.
- Do zkumavek přidat 10  $\mu\text{l}$  reakční směsi II a provést vlastní reverzní transkripci: zkumavky inkubovat po dobu 10 min při 25 °C, poté 30 min při 42 °C a 5 min při 85 °C.
- Získanou cDNA uchovávat v -20 °C.

**Tabulka 4** ■ Složení reakční směsi pro reverzní transkripci (20  $\mu\text{l}$ )

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	1 test [ $\mu\text{l}$ ]
<b>Reakční směs I</b>		
Voda		5
dNTP	10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	1
random primer	500 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1
<b>Reakční směs II</b>		
Voda		4
RT-PCR pufr	5 $\times$	4
RNase inhibitor	40 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1
BioScript TM	200 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1

### 2.3.4 Pracovní postup – reverzní transkripce s následnou kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí (RT-qPCR)

Přípravu PCR reakční směsi provádíme v určených prostorách zamezujících kontaminacím, nejlépe v PCR nebo laminárním boxu. K pipetování používáme špičky s filtrem. Pro zajištění validity testu se doporučuje analyzovat v duplikátech a zařadit kontrolu pozadí (blank, tj. rostlinnou cDNA nahradit deionizovanou vodou), negativní kontrolu (rostlinná cDNA bez cílového templátu) a pozitivní kontrolu (vzorek cDNA se 100% jisto-

tou obsahující cDNA cílového patogena – TuMV). Složení reakční směsi a teplotní profil PCR reakce je uveden v Tabulkách 5 a 6.

### Pracovní postup

- Všechny složky PCR reakční směsi před zahájením práce vyjmout z mrazničky, nechat roztát při pokojové teplotě, před použitím promíchat krátkým vortexováním a stočit na minicentrifuze.
- Podle počtu analyzovaných vzorků připravit reakční směs (bez cDNA). Připravený mastermix promíchat krátkým vortexováním, krátce centrifugovat a rozpipetovat do PCR zkumavek po 18  $\mu$ l (Tabulka 5).
- Do příslušných PCR zkumavek s PCR reakční směsí přidat 2  $\mu$ l neředěné cDNA testovaných vzorků a kontrol.
- V PCR cyklieru nastavit teplotní průběh reakce podle Tabulky 6 a spustit reakci.

**Tabulka 5** ■ Složení PCR reakční směsi pro detekci TuMV a interní kontrolu *Nad5*

Položka	Konečná koncentrace	1 test [ $\mu$ l]
qPCR 2 $\times$ Blue Master Mix_Blue	1 $\times$	10
Forward primer (20 $\mu$ M)	0,2 $\mu$ M	0,2
Reverse primer (20 $\mu$ M)	0,2 $\mu$ M	0,2
Sonda (10 $\mu$ M)	0,1 $\mu$ M	0,2
PCR voda	doplnit do 18 $\mu$ l	7,4
Templát cDNA		2

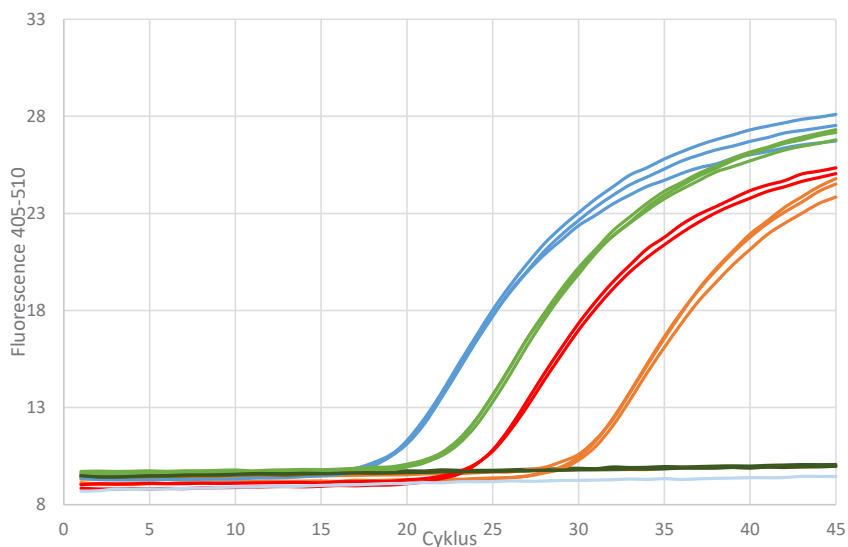
**Tabulka 6** ■ Teplotní podmínky PCR reakce

Predenaturace	95 °C	5 min	
Denaturace	95 °C	15 s	
Nasedání primerů*	58 °C	15 s	45 cyklů
Syntéza DNA	72 °C	15 s	
dosyntetizování řetězců	72 °C	5 min	

\*) analýza fluorescenčního signálu/‘acquiring’

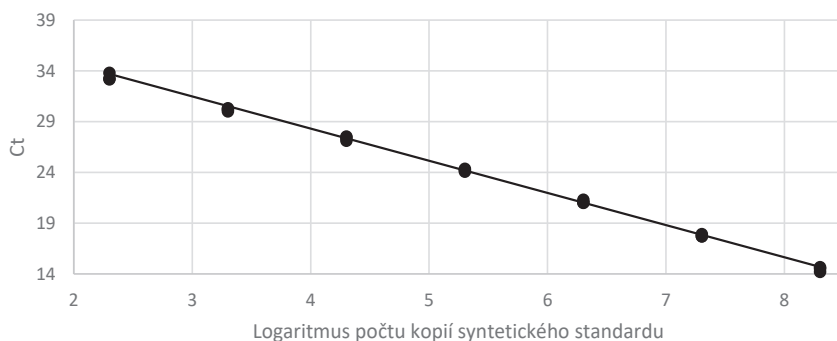
## Vyhodnocení RT-qPCR

RT-qPCR test byl vyhodnocen softwarem real-time cyklieru Roche Light-Cycler 480. Jako pozitivní jsou hodnoceny vzorky s  $Ct \leq 35$ , přičemž reálné  $Ct$  hodnoty pozitivních vzorků při sériovém testování se pohybují od 15 do 35 (Obrázek 1).  $Ct$  hodnoty amplifikace interní kontroly (*Nad5*) se pohybují od 25 do 30. Kontrola pozadí (blank) a negativní kontrola musí být vždy negativní (Obrázek 1, tmavě zelená a černá křivka). Mez analytické citlivosti testu je 200 virových částic v reprodukovatelné reakci.



**Obrázek 1** Příklady amplifikačních křivek vybraných pozitivních vzorků infikovaných košťalových zelenin TuMV v real-time PCR testu: modrá – T10 (kedluben); zelená – TGZ42 (křen); červená – T30 (tuřín); oranžová – PK1 (mák); šedo-zelená – negativní kontrola (zelí); světle modrá – blank (H<sub>2</sub>O).

Na základě sestrojené standardní kalibrační křivky je možná absolutní kvantifikace počtu kopií virové RNA na určitou jednotku (Obrázek 2). K hodnocení je možné využít software real-time cyklieru Roche Light-Cycler 480.



**Obrázek 2** Kalibrační křivka vyhotovená na základě triplikátů zřetovací řady syntetického standardu TuMV (software RocheLightCycler 480). Error: 0,00696 ( $R^2 = 0,999$ ); Účinnost (Efficiency): 2,028; Směrnice (Slope): -3,257.

### 2.3.5 Validace RT-qPCR metody

Validace předkládané metodiky byla provedena podle protokolu EPPO PM 7/98 (4): Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. Validace metody byla provedena podle výše uvedených postupů izolace RNA, přípravy cDNA a real-time PCR s přístrojem ROCHE Light Cyler 480.

**Specifičnost metody** byla ověřena na souboru XX izolátů TuMV (24 českých izolátů TuMV původem ze zelí hlávkového, čínského zelí, kedlubny, křenu, tuřínu a dvou slovenských izolátů původem z máku setého). Jako negativní kontrola byla použita celková RNA izolovaná ze zelí, pekingského zelí kedlubny, květáku a křenu. Všechny izoláty TuMV byly detekovány jako pozitivní ( $C_t = 16,6 - 33,65$ ). Všechny negativní kontroly byly negativní ( $C_t > 38$ ). *In silico* analýza provedená na více než 1 000 sekvencí dostupných v databázi GenBank potvrdila spolehlivost navrženého systému v případě detekce izolátů fylogenetické skupiny world-B, basal-B a basal-BR, které tvoří naprostou většinu popsanych izolátů vyskytujících se v Evropě. Nižší spolehlivost záchytu je (s ohledem na jejich variabilitu) možná u izolátů fylogenetické skupiny Asian-BR a Iranian, které se dosud v Evropě nevyskytují.



Mez **analytické sensitivity** byla stanovena na 200 virových částic v reprodukovatelné reakci (Obrázek 2).

**Tabulka 7** ■ Porovnání citlivosti RT-qPCR a DAS-ELISA testu

Vzorek (ředění)	DAS-ELISA	Q-PCR (Ct hodnota±SD)
10×	pozitivní	pozitivní - 20,18±0,04
20×	pozitivní	netestováno
40×	pozitivní	pozitivní - 23,08±0,07
80×	pozitivní	pozitivní - 24,34±0,14
160×	pozitivní	pozitivní - 26,17±0,13
320×	negativní	pozitivní - 26,73±0,09
640×	negativní	pozitivní - 27,25±0,04
1 000×	negativní	pozitivní - 28,57±0,24
10 000× (cca 2000 kopií virového genomu)	negativní	pozitivní - 32,83±0,19

### Senzitivita a reprodukovatelnost testu

Pro testování spolehlivosti testu byl zvolen vzorek obsahující 2 000 kopií virové RNA (tj.  $10^3$  kopií/ $\mu$ l), testovací vzorek byl připraven naředěním technického standardu (plazmid pGem-T nesoucí definovaný inzert virového CP), za kritickou mez bylo identifikováno 200 kopií. Vzorek byl pipetován ve 24 opakováních nezávisle třemi pracovníky. Přítomnost TuMV standardu (senzitivita) byla prokázána ve 100 % případů, ampikon nebyl detekován v negativní kontrole – ve zdravých rostlinách zelí, květáku, pekingského zelí, kedlubny, ředkve a hořčice.

Průměrná hodnota Ct stanovená jednotlivými pracovníky u pozitivních vzorků (reprodukovatelnost) byla  $32,28\pm 0,278$  –  $31,86\pm 0,336$  –  $32,37\pm 0,359$ , variační koeficient pak byl 0,86 – 1,05 – 1,1 %, tj. celková Ct  $32,17\pm 0,222$  (viz Tabulka 8).

**Tabulka 8** ■ Senzitivita a reprodukovatelnost RT-qPCR testu

	Ct 1	Ct 2	Ct 3	Ct 4	Ct 5	Ct 5	Ct7	Ct 8	∅ Ct	SD	$v_x$
1P	32,34	31,98	32,65	32,18	32,08	32,62	32,46	32,12	32,28	0,278	0,0086
	32,77	32,04	31,78	32,5	32,36	32,25	32,49	32,3			
	31,79	32,31	32,54	32,46	32,44	31,69	32,38	32,12			
2P	31,76	31,76	32,49	32,06	31,33	32,09	32,36	31,88	31,86	0,336	0,0105
	31,55	32,23	32,02	31,95	32,32	31,86	31,87	31,7			
	31,81	31,31	32,13	31,67	31,48	31,58	31,26	32,27			
3P	31,94	32,68	32,54	32,8	32,37	32,17	32,75	32,06	32,37	0,359	0,0111
	32,2	32,49	32,6	32,57	32,47	32,79	32,53	31,56			
	32,11	33,08	31,59	32,52	32,49	32,1	32,35	32,2			
									∅ Ct	SD	$v_x$
									32,17	0,222	0,0690

SD - směrodatná odchylka,  $v_x$  - variační koeficient

## 2.4 Detekce TuMV pomocí DAS-ELISA testu

DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich ELISA) umožňuje detekovat virus. Protože je DAS-ELISA testem stanovován proteinový antigen virionu, hodnota absorbance nás neinformuje přímo o stavu virové částice a o její schopnosti vyvolat infekci. V tomto případě je správně a vhodně využít pro ověřování specifčnosti biologického testu.

Princip DAS-ELISA testu spočívá v reakci antigenu (virového proteinu) se specifickými protilátkami navázanými na povrch pevného nosiče (mikrotitrační destičku). Ten je pak detekován specifickými protilátkami značenými enzymem, který v případě pozitivního vzorku zviditelní reakci rozkladem vhodného chromogenního substrátu (tj. změnou barvy).

Testy byly provedeny pomocí specifických TuMV IgG protilátek a konjugátu IgG-alkalická fosfatáza firmy LOEWE® Biochemica GmbH, Mühlweg

2a, D-82054 Sauerlach, Germany. K dispozici jsou i další komerčně dostupné protilátky, např. firem Bioreba A.G., Agdia EMEA. Před jejich použitím je ale nutné ověřit jejich specifčnost vůči spektru tuzemských TuMV izolátů.

Při provádění DAS-ELISA testu je potřeba dodržovat obecná pravidla:

- Pufrы temperovat před použitím na pokojovou teplotu.
- Pro manipulaci s IgG a IgG-AP konjugátem používat pouze nádoby a materiály z polyetylénu (PE) nebo skla, zabránit jejich kontaktu s kůží.
- Zásobní roztoky IgG a konjugátu ihned po pipetování uložit do 4 °C.
- Mikrotitrační destičky během inkubace uzavřít speciální lepicí folií.

## 2.4.1 Technické vybavení, materiál a použité chemikálie

- ELISA reader, ELISA promývačka, inkubátor/termostat, analytické váhy, výrobnik šupinkového ledu.
- Turnip Mosaic Virus set (LOEWE® Biochemica GmbH, kat. č. 07049S).
- Použité pufrы uchovávat zamražené v -20 °C a vždy před použitím temperovat na pokojovou teplotu.
  - Potahovací pufr (coating buffer): 1,59 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2,93 g NaHCO<sub>3</sub> rozpustit v dH<sub>2</sub>O, pH upravit na 9,6 a doplnit do 1 l.
  - Promývací pufr (washing buffer): 8,0 g NaCl, 2,9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 12 H<sub>2</sub>O, 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 g KCl, 0,5 ml Tween 20 rozpustit v dH<sub>2</sub>O, pH upravit na 7,2–7,4 a doplnit do 1 l.
  - Extrakční a konjugační pufr (sample buffer, conjugation buffer): ke složkám promývacího pufru přidat 20 g polyvinylpyrrolidonu (K10–K40), 2 g hovězího sérového albuminu, rozpustit v dH<sub>2</sub>O, pH upravit na 7,4 a doplnit do 1 l.
  - Substrátový pufr (substrate buffer): 97 ml diethanolaminu, 0,2 g MgCl<sub>2</sub> rozpustit v dH<sub>2</sub>O, pH upravit 1M HCl na 9,8 a doplnit do 1 l.
  - Substrátový roztok (substrate solution): připravovat vždy čerstvý rozpuštěním 1 mg·ml<sup>-1</sup> pNPP.Na<sub>2</sub> (p-nitrophenyl phosphate-di-Na-salt) v 1 ml substrátového pufru.

- Mikrotitrační destičky pro ELISA test, krycí fólie na mikrotitrační destičku (např. Nunc MaxiSorp F96 microtiter plates), automatické pipety, špičky, popisovač, třecí miska s paličkou, ledová lázeň.

## 2.4.2 Provedení a vyhodnocení DAS-ELISA testu

- Vazba specifických protilátek na povrch mikrotitrační destičky – zásobní roztok IgG naředit podle návodu potahovacím pufrem, pipetovat 200  $\mu$ l do jamky a inkubovat 4 h při 37 °C. Po inkubaci destičku 4 $\times$  propláchnout promývacím pufrem.
- Příprava a aplikace vzorků – homogenizovat vzorky listů v extrakčním pufru v poměru 1 : 10 (např. 200 mg : 2 ml) na šupinkovém ledu. Zároveň analogicky připravit negativní a pozitivní kontrolu. Do aktivovaných jamek mikrotitrační destičky pipetovat 200  $\mu$ l homogenátu vzorků, pozitivní a negativní kontrolu, a slepý vzorek (blank, pipetovat jen extrakční pufr). Mikrotitrační destičku inkubovat při 4 °C přes noc. Po inkubaci destičku 4 $\times$  propláchnout promývacím pufrem.
- Aplikace IgG-AP konjugátu – detekce zachyceného antigenu konjugátem IgG-alkalická fosfatáza. Zásobní roztok konjugátu ředit podle návodu konjugačním pufrem a pipetovat 200  $\mu$ l pracovního roztoku konjugátu do jamek mikrotitrační destičky. Inkubovat mikrotitrační destičku 4 h při 37 °C. Po inkubaci destičku 4 $\times$  propláchnout promývacím pufrem.
- Barevná enzymatická reakce indikující pozitivní vzorky – pipetovat do jamek mikrotitrační destičky 200  $\mu$ l roztoku substrátu, inkubovat při pokojové teplotě (20–25 °C) ve tmě 1 až 2 h.
- Vyhodnocení DAS-ELISA testu (Tabulka 9). Barevnou reakci alkalická fosfatáza – substrát měřit spektrofotometricky při 405 nm po 1 a 2 h inkubace. Vyhodnocení naměřené hodnoty bylo provedeno po odečtení průměrné hodnoty blanku. Za pozitivní považovat hodnoty absorbance vyšší než 0,05 naměřené po jedné hodině a zároveň vyšší než 0,1 naměřené po 2 hodinách inkubace; doplňující podmínkou byla skutečnost, že se hodnota absorbance

během této inkubace zvýšila cca 2× (tj. z min 0,05 na 0,1). Pozitivní kontrola musí být hodnocena jako pozitivní vzorek, negativní kontrola jako negativní vzorek.

**Tabulka 9** ■ Příklady hodnocení výsledků DAS-ELISA testu

Vzorek	Pozitivní vzorek		Negativní vzorek
	A <sub>405</sub> - min	A <sub>405</sub> - max	A <sub>405</sub>
Zelí hlávkové bílé	0,081* 0,167**	0,705* 1,402**	
Kedluben	0,089* 0,216**	0,798* 1,270**	
Kapusta hlávková	0,332* 0,715**	0,456* 0,943**	
Zelí pekinské	0,318* 0,660**	0,509* 0,977**	-0,035 až 0,009
Brokolice	0,124* 0,392**	0,639* 1,290**	
Květák	0,415* 0,842**	0,524* 1,260**	
Kadeřávek	0,480* 0,767**	1,120* 1,513**	

\*) hodnota absorbance měřená po 1 hod inkubace; \*\*) hodnota absorbance měřená po dvou hodinách inkubace

Předkládaná „Metodika stanovení odolnosti košťálových zelenin vůči viru mozaiky vodnice (*Turnip mosaic virus*)“ poprvé v česky psaném návodu popisuje rychlý a efektivní postup stanovení odolnosti/tolerance košťálových zelenin vůči TuMV, a to biologickým testem. K testování jsou doporučeny detailně charakterizované virulentní izoláty TuMV českého původu, z hostitelské skupiny B (*Brassica*), fylogenetické skupiny world-B. Tato skupina izolátů je ve střední Evropě jednoznačně dominantní. Metodika byla ověřena na případové studii rezistence košťálovin vůči TuMV. Poznatky o odolnosti/toleranci genotypů košťálových zelenin vůči TuMV uvedené v této metodice dosud chyběly.

Navržený postup RT-qPCR pro kvalitativní (tj. detekci) a kvantitativní stanovení TuMV nebyl v literatuře dosud publikován. *In silico* analýza potvrdila vysokou spolehlivost navrženého systému v případě detekce izolátů fylogenetické skupiny world-B, basal-B a basal-BR, které tvoří naprostou většinu popsanych izolátů vyskytujících se v Evropě. Nižší spolehlivost záchytu je (s ohledem na jejich variabilitu) možná u izolátů fylogenetické skupiny Asian-BR a Iranian, které se dosud v Evropě nevyskytují.

Pro podmínky v ČR se jedná o poznatky nové, které nebyly dosud ve formě metodiky zpracovány, které mohou podpořit rezistentní šlechtění košťálových zelenin a mohou omezit šíření TuMV na pěstebních plochách; snížit jak riziko vzniku lokálních epidemií, tak omezit jeho negativní vliv na produkci košťálových zelenin.

„Metodika stanovení odolnosti košťálových zelenin vůči viru mozaiky vodnice (*Turnip mosaic virus*)“ je primárně určena pro šlechtitele a pěstitele košťálových zelenin.

Biologické testování rezistence košťálových zelenin vůči TuMV může být využito pro:

- testování rezistence šlechtitelských materiálů a linií,
- stanovení anebo ověřování rezistence kultivarů.

Postup RT-qPCR detekce TuMV v biologickém materiálu je určen jak pro šlechtitelská pracoviště zabývající se šlechtěním košťálovin na rezistenci vůči TuMV, tak laboratoře zaměřené na virologický výzkum nebo diagnostiku virů, jako např.:

- laboratoře šlechtitelských organizací,
- laboratoře Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZÚZ, NRL, Odbor diagnostiky škodlivých organismů rostlin),
- laboratoře v akademické sféře a dalších výzkumných institucích.

Dále se uplatní ve středoškolském a vysokoškolském vzdělávání.



## 5 Ekonomické aspekty

Při hodnocení ekonomických aspektů je nutné vycházet ze skutečnosti, že virus mozaiky vodnice sice nepatří mezi karanténny organismy, ale na našem území se dlouhodobě běžně vyskytuje. Přestože jeho výskyt není průběžně monitorován, jeho v současnosti zvýšený výskyt představuje riziko pro pěstování kedlubnu nebo tuřínu (průběžné zprávy projektu QK1910070). Toto riziko hrozí především v ekologickém systému pěstování, kde se nepoužívají insekticidy proti škůdcům, tedy i včetně mšic – vektorů TuMV.

Omezení negativního vlivu TuMV na košťálové plodiny je spojené: (1) s rezistentním šlechtěním a využíváním rezistentních odrůd košťálových zelenin, které prakticky nejsou k dispozici, proto roste význam rezistentního šlechtění; (2) s monitoringem výskytu TuMV a likvidací jeho zdrojů, což má za následek omezení šíření TuMV do porostů košťálových zelenin, a tím spojené snížení škod. V obou případech se bez biologických testů rezistence a spolehlivé diagnostiky neobejdeme. A právě tyto postupy metodika poskytuje.

Konkrétní finanční přínos je však těžko odhadnutelný, bude záležet na aktivitách konkrétních šlechtitelských pracovišť a pěstitelů.

Ekonomickým přínosem je získání informací o úrovni odolnosti stávajících odrůd a šlechtitelských materiálů košťálových zelenin vůči TuMV. Tato znalost umožní používat v komerčních výsadbách vůči TuMV odolné odrůdy snižující riziko vzniku lokálních epidemií, a tím zamezit ekonomickým ztrátám. Postupy předložené v metodice dále umožní efektivní tvorbu nových ekonomicky zajímavých odrůd.

V případě kedlubnů jsou dostupné statistické údaje o osevních plochách, sklizni a průměrné roční ceně poskytnuté zemědělskými výrobci zeleniny v ČR v roce 2020 (Němcová a Buchtová 2022; Hrabalová 2022).



V roce 2020 byly kedlubny pěstovány na 188 ha osevních ploch, průměrný výnos byl 20,54 t/ha a průměrná cena výrobce 30 900,00 Kč/t. Celkové tržby potom byly cca 119,3 mil. Kč. Pokud ekonomický přínos vztáhneme na osevní plochy kedlubnů v ekologickém systému pěstování, jejichž kvalifikovaný odhad je 0,44 % osevních ploch, můžeme vyčíslit ekonomický přínos spojený s omezením negativního vlivu infekce TuMV od cca 25 tis. Kč (snížení ztrát o 5 %) do 157 tis. Kč ročně (snížení ztrát o 30 %). Rozmezí ztrát 5 až 30 % bylo zvoleno na základě vlastních pozorování na ekologických farmách a publikovaných údajů o průměrných ztrátách na produkci vlivem infekce TuMV.

Vzhledem k rostoucímu podílu osevních ploch košťálovin pěstovaných v ekologickém systému pěstování se dá předpokládat růst přínosů uplatnění metodiky. Při zvýšeném výskytu a nárůstu škod se dá očekávat příslušné kroky k nápravě ze strany státní správy, která se bez spolehlivých, ověřených postupů diagnostiky neobejde.

Pro vybavená šlechtitelská nebo diagnostická pracoviště není potřeba dalších nákladů k uplatnění metodiky.



# 6 Literatura

## Seznam použité související literatury

- Gardner M. W., Kendrick J. B. (1921): Turnip mosaic. *Journal of Agricultural Research* 22: 123–124.
- Chod J., Jokes M. (1991): Turnip mosaic virus as a cause of spinach yellow-spotting. *Ochrana rostlin -UVTIZ (CSFR)* 27 (3-4): 211–215.
- Kawakubo S., Gao F., Li S., Tan Z., Huang Y.-K., Adkar-Purushothama C. R., Ohshima K. (2021). Genomic analysis of the brassica pathogen turnip mosaic potyvirus reveals its spread along the former trade routes of the Silk Road. *Proceedings of the National Academy of Sciences the United States of America*, 118(12), e2021221118.
- Menzel W., Jelkmann W., Maiss E. (2002): Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods* 99: 81–92.
- NCBI (2023): National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>. Navštíveno 20.1.2023.
- Nellist C. F., Ohshima K., Ponz F., Walsh J. A. (2022): *Turnip mosaic virus*, a virus for all seasons. *Annals of Applied Biology* 180 (3): 312–327.
- Ohshima K., Yamaguchi Y., Hirota R., Hamamota T., Tomimura K., Tan Z., Sano T., Azuhata F., Walsh J. A., Fletcher J., Chen J., Gera A., Gibbs A. (2002): Molecular evolution of *Turnip mosaic virus*: evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. *Journal of General Virology* 83: 1511–1521.
- Rychlý S., Fryč D., Škulavíková O. (2022): Monitorování letu mšic v České republice v roce 2021 a jejich očekávaný stav v roce 2022. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský pp. 187.
- Schultz E. S. (1921): A transmissible mosaic disease of Chinese cabbage, mustard, and turnip. *Journal of Agricultural Research* 22: 173–177.
- Špak J., Kubelková D. (1990): Occurrence of turnip mosaic virus in opium poppy (*Papaver somniferum*) in CSFR. *Ochrana Rostlin – UVTIZ (CSFR)* 26: 257–261
- Tomimura K., Špak J., Katis N., Jenner C. E., Walsh J. A., Gibbs A. J., Ohshima, K. (2004): Comparisons of the genetic structure of populations of *Turnip mosaic virus* in West and East Eurasia. *Virology*. 330: 408–423.

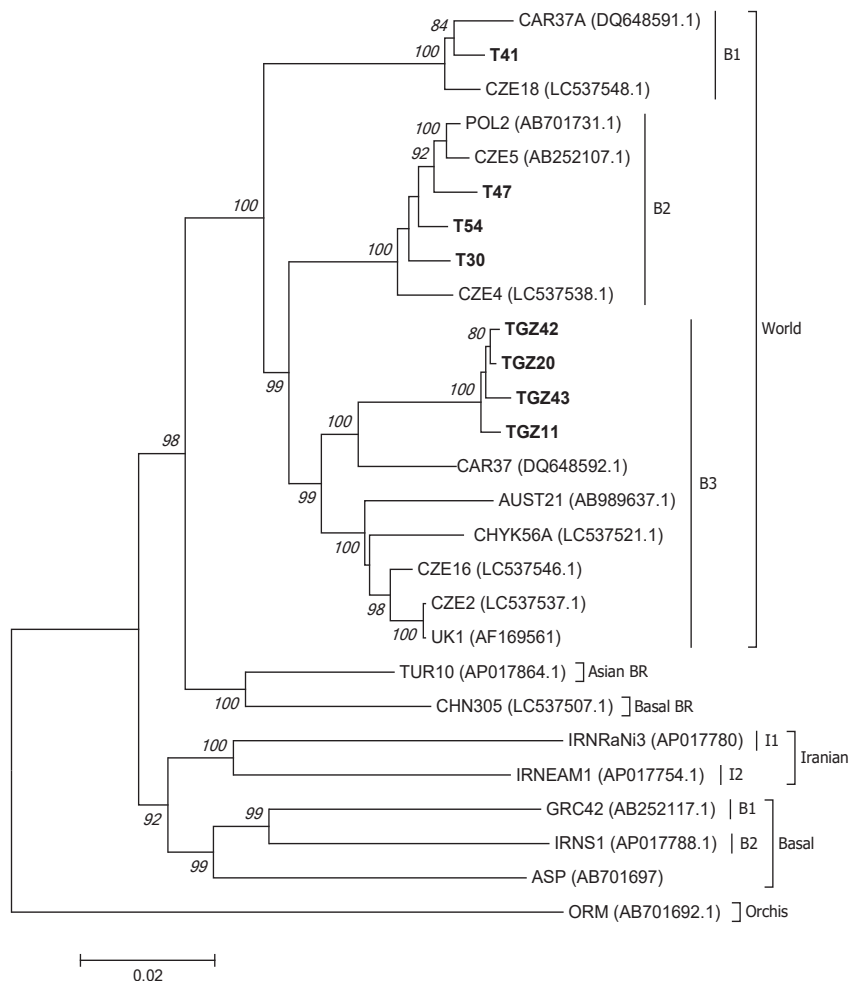
- Valentová L., Rejlová M., Podlipný J., Čmejla R. (2021): Real-time PCR detekce viru *Tomato ringspot virus* (ToRSV) v biologickém materiálu (certifikovaná metodika). Vyzkumny a šlechtitelsky ustav ovocnařsky Holovousy s.r.o.
- Walsh J. A., Jenner C. E. (2002): *Turnip mosaic virus* and the quest for durable resistance. *Molecular Plant Pathology* 3: 289–300.
- Yasaka R., Fukagawa H., Ikematsu M., Soda H., Korkmaz S., Golnaraghi A., Katis N., Ho S. Y. W., Gibbs A. J., Ohshima K. (2017): The timescale of emergence and spread of turnip mosaic virus. *Scientific Reports* 7: 4240.

## Seznam publikací, které předcházely metodice

- Navrátil M., Šafářová D. (2022): Virus mozaiky vodnice (*Turnip mosaic virus*): riziko pro pěstování košťálové zeleniny – Ano nebo Ne? *Úroda* 12 (Vědecká příloha časopisu) 163–169.
- Šafářová D., Majeský L., Navrátil M. (2023): Molecular study of turnip mosaic virus population in the Czech Republic. *Plant Protection Science* (doi: 10.17221/34/2023-PPS).

## 7

## Přílohy



**Obrázek 1** **Fylogenetický strom konstruovaný pomocí neighbor-joining analýzy na základě sekvence ORF1 polyproteinu analyzovaných izolátů TuMV. Svorkami jsou označeny základní fylogenetické skupiny, jednotlivé izoláty jsou popsány názvem izolátu a GenBank přístupovým číslem (Acc. No.), vyznačeny jsou hodnoty bootstrap  $\geq 70\%$  (500 replikací), úsečka představuje 2% divergenci. Recentní české izoláty jsou zvýrazněny tučně.**

## Tabule I

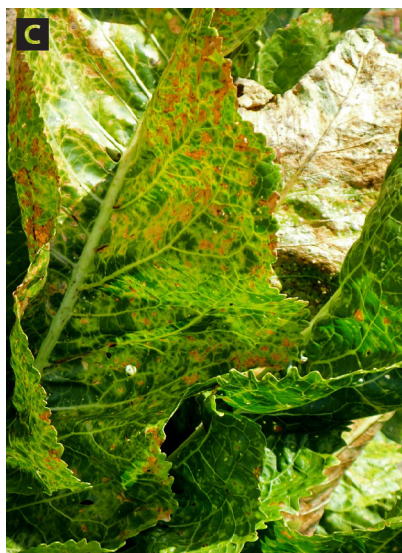
**A** zakrslá infikovaná rostlina kedlubnu s chlorotickou mozaikou na listech, **B** slabá chlorotická mozaika na listu kedlubnu, **C** infikovaná rostlina tuřínu s chlorotickou mozaikou na listech, **D** chlorotická mozaika na listu tuřínu





## Tabule II

**A**, **B** slabá chlorotická mozaika na listech křenu, **C** silná nekrotizující chlorotická mozaika na listu křenu, **D** chlorotická kroužkovitost na listech křenu (cv. Malínský)



### Tabule III

**A** velmi slabá mozaika na listu zelí hlávkového bílého (cv. Atila F1), **B** silná chlorotická mozaika na listu zelí hlávkového modrého (cv. Mars), **C** slabá mozaika na listu zelí hlávkového bílého (cv. Polar), **D** silná chlorotická mozaika na listu zelí hlávkového bílého (cv. Hornet)



#### Tabule IV

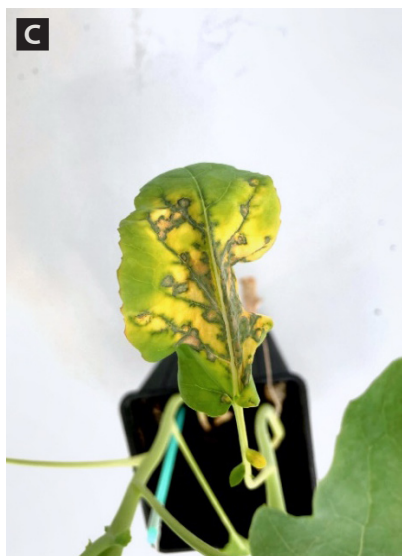
**A** chlorotická mozaika a žilková nekróza na listu modrého kedlubnu (cv. Ballot F1), **B** chlorotická mozaika na listu kedlubnu bílého (cv. Gaston F1), **C** žilková nekróza na listu kedlubnu bílého (cv. Korfu F1), **D** chlorotická mozaika na listu kedlubnu bílého (cv. Troja F1)





## Tabule V

**A** chlorotická mozaika na listu brokolice (cv. Limba), **B** ojedinělé chlorotické léze na listu brokolice (cv. Leonora), **C** nekrózy na inokulovaném listu květáku (cv. Beta), **D** chlorotické léze na listu květáku (cv. Beta)



## Tabule VI

**A** chlorotická mozaika na listu kadeřávku (cv. Rednex F1), **B** nekrózy na listu kadeřávku (cv. Scarlet), **C** ojedinělé nekrotizující chlorotické léze na listu kapusty (cv. Předzvěst), **D** ojedinělé nekrotické léze na listu kapusty (cv. Verita F1)



## Tabule VII

**A** pekingské zelí (cv. Forco F1) – vlevo chlorotická až nekrotická mozaika na infikované rostlině, vpravo zdravá rostlina, **B** celková nekróza na rostlině čínské zelnice (cv. Paket)



