



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Metodika ozdravování odrůd révy vinné pomocí chemoterapie

Ing. Petr Komínek, Ph.D.
Barbora Jandová
Ing. Marcela Komínková
Doc. Ing. Jaroslav Polák, DrSc.

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

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

Metodika ozdravování odrůd révy vinné pomocí chemoterapie

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Ing. Petr Komínek, Ph.D.
Barbora Jandová
Ing. Marcela Komínková
Doc. Ing. Jaroslav Polák, DrSc.

2017

Dedikace:

Metodika vznikla za finanční podpory Ministerstva zemědělství a je výstupem řešení projektu NAZV QJ1210175, **Výzkum a vývoj standardních metodických postupů ozdravování ovocných dřevin a révy vinné pomocí chemoterapie *in vitro* kultur pro systém certifikace zdravotního stavu výsadbového materiálu.**

Autoři:

Ing. Petr Komínek, Ph.D.	podíl 50%
Barbora Jandová	podíl 30%
Ing. Marcela Komínková	podíl 10%
Doc. Ing. Jaroslav Polák, DrSc.	podíl 10%

Drnovská 507
161 06 Praha 6 - Ruzyně

Jména oponentů:

Ing. Petr Svoboda, CSc.
Chmelařský institut s.r.o.

Ing. Jitka Drozdová
Ministerstvo zemědělství ČR

Metodika pro útvary státní správy

Metodiku schválilo Ministerstvo zemědělství ČR a doporučilo její využití v zemědělské praxi.

Fotografie na obálce: kultivace rostlin révy vinné *in vitro*.
Autor fotografie: ing. Petr Komínek, Ph.D.

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

ISBN 978-80-7427-231-8

Abstrakt

Metodika popisuje postup kultivace rostlin révy vinné in vitro za účelem jejich ozdravení od virových patogenů pomocí Ribavirinu. Velká část metodiky se zabývá diagnostikou virů pro stanovení úspěšnosti ozdravení.

Metodika je určena pracovištím technických izolátů a dalším podnikům, které provádějí ozdravování podnoží a odrůd révy vinné, případně ji mohou využít též MZe, ÚKZÚZ, Svaz pěstitelů révy vinné a další zájemci a pěstitelé révy vinné.

Klíčová slova: in vitro, Ribavirin, virus, virové choroby, diagnostika, RT-PCR

Abstract

The guideline describe a method of grapevine cultivation in vitro and its sanitation from virus pathogens using Ribavirin. Large part of this guideline describe diagnostic protocols for estimation of healthy status of sanitized grapevines.

The guideline is intended for laboratories dealing with sanitation and diagnostics of viral pathogens of grapevine cultivars and rootstocks. Further utilization can be done by the Ministry of Agriculture, Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture and also by growers of grapevine.

Keywords: in vitro, Ribavirin, virus, virus disease, diagnostics, RT-PCR

Obsah:	strana číslo
I. Cíl metodiky	2
II. Vlastní popis metodiky	
Úvod	2
1. Vybavení a chemikálie	3
1.1. Přístrojové zabezpečení	3
1.2. Materiál	4
1.3. Chemikálie a kity	5
1.4. Příprava roztoků a kultivačních médií	7
2. Vlastní ozdravování	9
3. Hodnocení zdravotního stavu ozdravených materiálů - detekce virů	10
3.1. Odběr a příprava vzorků	10
3.2. Pozitivní kontrola	10
3.3. Negativní kontrola	10
3.4. Detekce virů pomocí RT-PCR	10
III) Srovnání novosti postupů	15
IV) Popis uplatnění certifikované metodiky	15
V) Ekonomické aspekty	15
VI) Seznam použité související literatury	15
VII) Seznam publikací, které předcházely metodice	16

I. Cíl metodiky

Cílem metodiky je poskytnout zájemcům podrobnou metodiku pro ozdravení odrůd révy vinné a následnou kontrolu zdravotního stavu ozdravených materiálů.

II. Vlastní popis metodiky

Úvod

První část metodiky popisuje výběr rostlin révy vinné pro ozdravování, zakládání *in vitro* kultur, aplikaci chemoterapeutických látek, propagaci *in vitro* kultur, zakořeňování a převod do nesterilních podmínek.

Druhá část metodiky popisuje postup hodnocení zdravotního stavu ozdravených materiálů, tedy postup detekce virů révy vinné. Pro detekci virů použijeme metodu RT-PCR, která je citlivější než ELISA a je schopná zachytit o dva řády nižší koncentraci virů v testovaném materiálu. Dle našich dosavadních výsledků (Komínek 2008) se v ČR vyskytují tyto viry révy vinné:

Virus roncetu révy vinné - *Grapevine fanleaf virus* - GFLV

Virus mozaiky huseníku - *Arabidopsis mosaic virus* - ArMV

Virus svinutky révy vinné 1 - *Grapevine leafroll-associated virus 1* - GLRaV-1

Virus svinutky révy vinné 2 - *Grapevine leafroll-associated virus 2* - GLRaV-2

Virus svinutky révy vinné 3 - *Grapevine leafroll-associated virus 3* - GLRaV-3

A virus révy vinné - *Grapevine virus A* - GVA

B virus révy vinné - *Grapevine virus B* - GVB

Virus vrásčitosti dřeva révy vinné - *Rupestris stem pitting-associated virus* - RSPaV

Virus skvrnitosti révy vinné - *Grapevine fleck virus* - GFkV a další, dosud neidentifikované viry z čeledi *Tymoviridae*.

Virus révy Rulandské šedé - *Grapevine Pinot gris virus* - GPGV

GFLV a ArMV vyvolávají u napadených rostlin příznaky mozaiky, žloutnutí, deformací čepele listů. Způsobují také sprchání hroznů, pokud se vyvinou bobule, jsou malé nebo nerovnoměrné velikosti.

Viry svinutky (GLRaV-1 2 3) vyvolávají chorobu svinutku, která se projevuje stáčením okrajů čepelí listů směrem dolů a předčasným podzimním zabarvením listů. Viruprosté rostliny na podzim takřka vůbec nebarví listy! Dochází také ke snižování cukernatosti bobulí. Viry způsobující svinutku révy vinné jsou v ČR značně rozšířené.

GVA, GVB a RSPaV způsobují poruchy růstu, které se projevují nejvíce na srůstu podnože a naštěpované odrůdy. Tím dochází ke snižování toku živin a asimilátů mezi podzemní a nadzemní částí rostliny, snižování životaschopnosti keře a tím i k snižování výnosů. Extrémním případem je inkompatibilita podnože a naštěpované části, kdy naštěpovaná část přiroste jen málo nebo vůbec ne a nadzemní část rostliny během několika let zcela odumírá. Příznaky infekce GVA, GVB a RSPaV se na listech napadených rostlin většinou neprojevují. RSPaV je nejrozšířenějším virem révy vinné na světě.

GFkV a příbuzné viry způsobují kromě listových příznaků skvrnitosti také poruchy srůstu podnože a naštěpované odrůdy.

GPGV vyvolává deformace listů a zakrslost růstu, nejčastěji je však zcela bez příznaků.

Častá je i infekce více viry v jedné rostlině.

Požadavky na zdravotní stav množitelského materiálu jsou dány zákonem č. 219/2003 Sb. a navazující vyhláškou č. 332/2006Sb, které zapracovávají i příslušné předpisy Evropských

společnosti. Dle této platné legislativy je povinné testování množitelského materiálu révy na GFLV, ArMV, GLRaV-1, GLRaV-3 a u podnožové révy ještě navíc GFkV.

1. Vybavení a chemikálie

1.1. Přístrojové zabezpečení

1.1.1. Ozdravování

- chladnička (+4 °C)
- mraznička (-20 °C)
- pH-metr
- laboratorní váhy
- autokláv (parní tlakový sterilizátor)
- sušička (160 °C)
- mikrovlnná trouba
- výrobek ledové tříště
- termostat
- destilační přístroj
- sada mikropipet (0,5–10 µl, 20–200 µl, 200–1000 µl)
- osmikanálová pipeta 20–200 µl

1.1.2. Detekce virů

- termocyklyer (např. PTC200 od MJ Research)
- mrazicí boxy -80 °C a -20 °C
- dokumentační systém (pracoviště týmu rostlinolékařské virologie a fytoplazmologie VÚRV, v.v.i. je vybaveno dokumentačním systémem ChemiGeniusQ od SynGene, lze pořídit i levnější řešení s cenou do 100 tis. Kč)
- digestoř nebo laminární box
- chladnička (+4 °C)
- autokláv
- vodní lázeň
- třecí misky s tloučky
- vortex (mikrotřepačka)
- centrifuga na mikrozkušavky (není zapotřebí chlazená, otáčky nastavitelné do 15 000 rpm; s možností odstředovat mikrozkušavky objemu 0,5 a 2,0 ml)
- sada mikropipet (0,5–10 µl, 2–20 µl, 20–200 µl, 200–1000 µl)
 - silně doporučujeme používat několik oddělených sad pipet: jedna sada pro izolaci RNA, druhá sada pro pipetování reakčních směsí (premix PCR), třetí pro pipetování vzorků a čtvrtá pro pipetování PCR produktů
- pH-metr
- laboratorní váhy
- horizontální elektroforéza + zdroj
- mikrovlnná trouba
- výrobek ledové tříště

1.2. Materiál

1.2.1. Ozdravování

- zahradnické nůžky
- ostrý nůž
- skalpel
- role alobalu
- váženky
- laboratorní sklo (kádinky, odměrné válce)
- filtrační papír
- papírové ručníky
- permanentní popisovač na sklo a na plast
- skalpel s výměnnými čepelkami nebo sterilizovatelný nůž nebo sterilizovatelné nůžky
- pinzety
- pipety
- vyšetřovací rukavice
- mikroténové sáčky na uchování vzorků
- pěstební kontejnery
- pěstební rašelinové substráty
- roubovací páska
- roubovací nůž

1.2.2. Detekce virů

- zahradnické nůžky, ostrý nůž
- skalpel s výměnnými čepelkami nebo sterilizovatelný nůž nebo sterilizovatelné nůžky
- role alobalu
- váženky
- stojánky na mikroskopické zkušební skleničky
- filtrační papír, papírové ručníky
- laboratorní sklo (kádinky, odměrné válce, láhve reagenční s uzávěrem – autoklávovatelné)
- třecí misky s tloučky
- 0,5 ml a 2 ml mikroskopické zkušební skleničky
- PCR zkušební skleničky (velikost a typ podle použitého přístroje)
- permanentní popisovač na sklo a na plast
- špičky pro mikropipety + boxy (sterilizovatelné)
- vyšetřovací rukavice

1.3. Chemikálie a kity

1.3.1. Ozdravování

NH₄NO₃

KNO₃

MgSO₄

KH₂PO₄

Ca(NO₃)₂ bezvodý

FeNaEDTA

Na₂EDTA · 2H₂O

MnSO₄ · H₂O

ZnSO₄ · 7H₂O

Na₂MoO₄ · 2H₂O

CuSO₄ · 5H₂O

H₃BO₃

KI

CoCl₂ · 6H₂O

sacharóza

agar (Duchefa Biochemie B.V.)

karagenan

BAP

GA3

IBA

IAA

thiamin

kyselina nikotinová

glycin

pyridoxin

myo-inositol

NaClO

etanol

NaOH

KOH

1.3.2. Detekce virů

- RNeasy Plant Mini Kit (50), katalog Qiagen 74904

- OneStep RT-PCR Kit (100), katalog Qiagen 210212

- primery: nutno je nechat nasyntetizovat na zakázku (např. Sigma nebo Generi Biotech)

Primery pro detekci GLRaV-1 (Komínek a Bryxiová, 2005):

Primer LR1: 5' CAGGCGTCGTTTGTACTGTG 3'

Primer LR2: 5' TCGGACAGCGTTTAAGTTCC 3'

Primery pro detekci RSPaV (Komínek et al., 2009):

RSPL: 5' CACAGGCATTTGCACAGAATC 3'

RSPR: 5' GGTTTCTTAAAGATCCCTTCTTTG 3'

Primery pro detekci GVA (Goszczyński a Jooste, 2003):

GVA6591F 5' GAGGTAGATATAGTAGGACCTA 3'

GVA6862R 5' TCGAACATAACCTGTGGCTC 3'

Primery pro detekci GVB (Abou Ghanem – Sabanadzovic, osobní sdělení)

GvbA 5' GTGCTAAGAACGTCTTCACAGC 3'

GvbS 5' AGTAGCCCTTCGTTTAGCCGC 3'

Primery pro detekci nepovirů (GFLV a ArMV) dle Wetzel et al., (2002)

M2A 5' YTRGATTTTAGGCTCAATGG 3'

M3R 5' TGYAARCCAGGRAAGAAAAT 3'

Primery pro detekci všech virů čeledi *Tymoviridae* (Sabanadzovic et al., 2000):

Flek1 5' CYCARCAYAARGTVAACGA 3'

Flek2 5' CATGCANGTSAGRGGRCRAA 3'

Primery pro detekci GPGV (Glasa et al., 2014):

GPGVrev 5' CTGAGAAGCATTGTCCCATC 3'

GPGVamp 5' ATTGCGGAGTTGCCTTCAAG 3'

- SeaKem LE Agarose 1 kg, katalog Lonza 50005
- Tris Base, katalog Promega H5131
- Acetic acid, 1l, katalog Sigma 45726-1L-F
- Ethidium bromide 1g, katalog Sigma E8751, **pozor - vysoce toxický, možné nebezpečí nevratných účinků**
- GeneRuler™ 100 bp Plus, katalog Fermentas SM0323
- EDTA, 100g, katalog Sigma E5134-100g
- Ficoll PM 400, 10g, katalog Sigma F4375
- Bromophenol Blue sodium salt, 5g, katalog Sigma B8026-5G
- Xylene Cyanol, 10g, katalog Sigma X4126-10G
- Orange G, 25g, katalog Sigma 03756-25G
- 2-mercaptoethanol, katalog Sigma M3148. **Pozor, 2-mercaptoethanol je toxická látka!!**
- sterilní redestilovaná voda, nebo komerčně dodávaná voda pro PCR
- Ethanol 100% p.a.
- kapalný dusík

1.4. Příprava roztoků a kultivačních médií

1.4.1. Ozdravování

Tab. 1. Složení použitých médií.

Složka (mg.l^{-1})	QL-In	QL1	QL1-Rib
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ bezvodý	578,92	578,92	578,92
KH_2PO_4	270	270	270
KNO_3	1800	1800	1800
MgSO_4	175,79	175,79	175,79
NH_4NO_3	400	400	400
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,025
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,025
FeNaEDTA	36,7	36,7	36,7
H_3BO_3	6,2	6,2	6,2
KI	0,08	0,08	0,08
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,76	0,76	0,76
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	0,25
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	8,6	8,6
Thiamin	0,1	0,1	0,1
Pyridoxin	0,5	0,5	0,5
Nikotinová kyselina	0,5	0,5	0,5
Glycin	2	2	2
IAA	0,1	0,2	0,2
BAP	0,7		
Agar	6000	6000	6000
Sacharóza	3400	25000	25000
Fruktóza			
Myo-inositol	100	100	100
Ribavirin			10, 20, 40

1.4.2. Detekce virů

0,5 M EDTA 200 ml

37,22 g EDTA prášek

doplnit vodou do 200 ml

upravíme pH pomocí NaOH na hodnotu 8,0

FLB (Ficoll Loading Buffer) 10x, 15 ml

Ficoll 400 2 g

0,5M EDTA (pH 8,0) 1,25 ml

Bromophenol Blue 10 mg

Xylene Cyanol 10 mg

Orange G 20 mg

doplnit vodou do 15 ml

2% agarózový gel

Objem připravovaného agarózového gelu závisí na velikosti vaničky horizontální elektroforézy, kterou máme k dispozici. Podle toho si musí každý uživatel této metodiky přepočítat následující recept: 2 g agarózy nasypeme do 100 ml pufru 1x TAE, směs agarózy a pufru TAE rozehrějeme v mikrovlnné troubě nebo na elektrickém míchadle s ohřevem a ještě horkou nalijeme do vaničky s hřebínkem. Necháme ztuhnout při pokojové teplotě.

50xTAE - zásobní roztok:

242 g Tris baze

57,1 ml kyseliny octové

100 ml 0,5M EDTA (pH = 8,0)

doplníme redestilovanou vodou do 1 litru

1 x TAE - pracovní roztok:

20 ml 50xTAE doplníme redestilovanou vodou do 1 litru.

Ethidium bromid

zásobní roztok: 2,5 mg/1 ml vody

dávkování 4 µl na 100 ml pufru TAE

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

Ethidium bromid je mutagen, proto veškerou manipulaci s ním provádíme v rukavicích.

Pro snížení rizika kontaminace laboratoře je možné ethidium bromid do gelu nepřidávat a gel po elektroforéze barvit v roztoku ethidium bromidu a odbarvovat ho v 1x TAE pufru. Veškerou manipulaci s ethidium bromidem doporučujeme přesunout do zvláštní místnosti s dokumentačním zařízením.

Agarózové gely, vyšetřovací rukavice a plasty kontaminované ethidium bromidem skladujeme odděleně v silných PE pytlích. Likvidaci provádějí speciální firmy zabezpečující likvidaci nebezpečného odpadu. Roztoky a pufrы se dekontaminují přímo v laboratoři pomocí specifických adsorpčních kolon, jejichž likvidaci opět zajišťují speciální firmy na likvidaci nebezpečného odpadu.

2. Vlastní ozdravování

Založení *in vitro* kultury

Příprava média

Kultivační médium je zdrojem výživy a regulátorů růstu pro explantátové kultury. Médium je složeno z destilované vody, skupiny anorganických látek (makroprvků a mikroprvků), organických látek (vitamíny, cukry atd.), rostlinných hormonů (auxiny, cytokininy, gibbereliny atd.) a agaru nebo jiné zpevňující látky (např. pektin, carrageenan atd.). Pro jednotlivé rostlinné druhy jsou používána média s rozdílným obsahem jednotlivých složek (tab. 1). Agar (popřípadě s přidávkou zpevňující látky) se rozvaří, přidají se jednotlivé komponenty dle receptu, médium se upraví pH (pomocí 5% vodného roztoku NaOH nebo HCl) a následně je rozlito do vhodných nádob a sterilizováno autoklávováním (20 minut při 121°C a 110 kPa). Pokud je v médiu komponent, který se rozkládá při sterilizaci média, je třeba ho přidat až po tomto procesu ve sterilním prostředí flow-boxu přes sterilní filtr s membránou o velikosti průduchů 0,22 µm (Millipore MILLEX®GP). Takto se přidává např. Ribavirin®.

Převedení rostlin do *in vitro* podmínek

Pro založení *in vitro* kultur odebereme z matečních rostlin, které mají být ozdraveny, tažně, nejlépe v lednu či nejpozději v únoru, rozstříháme je nůžkami na kratší řízky a přeneseme je v mikroténových sáčcích do laboratoře. Rostliny nařežeme na 1 - nodální segmenty a umístíme je pro narašení do vody, do plastových vaniček potažených fólií s otvory pro fixaci segmentů (Faltus a kol., 2012). Dle potřeby vždy po několika dnech vyměňujeme vodu za čistou. Vaničky s rostlinami umístíme do kultivační místnosti s teplotou 15 až 20 °C pro rychlejší prorůstání pupenů a zkrácení času pro možný rozvoj patogenů. Po 3 – 6 týdnech, v závislosti na rychlosti růstu rostlin jednotlivých odrůd, odebíráme odlomením nové výhony o minimální délce 2 cm a alespoň dvou rozvinutých listech. Z nich zakládáme *in vitro* kultury. Odstříhneme listy a ponecháme řapíky o délce cca 5mm. Výhony jsou dále povrchově sterilizovány - omyty štětečkem namočeným v detergentu (prostředek na mytí nádobí) a opláchnuty pod tekoucí vodou. Následně již všechny práce probíhají ve sterilních podmínkách flow-boxu. Sterilizace rostlinných řízků probíhá v Erlenmayerových baňkách jejich ponořením do sterilizačního roztoku po stanovenou dobu (záleží na vyzrálosti pletiv) nejlépe na třepačce, popřípadě je s roztoky pravidelně mícháno. Výhony jsou sterilizovány postupně v roztoku Parmetolu DF 35 - (Ethylendioxy)dimethanol, 5-Chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-on, 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (1 %, 20 minut) a komerčního přípravku SAVO – NaClO (30%, po dobu 30 minut) a po použití každého činidla opláchnuty 3x ve sterilní destilované vodě vždy po dobu 10 minut. Vysterylizovaným 1- nodálním segmentům jsou seříznuty o cca 3 mm oba konce a řapík. Vyloučí se tak rozvoj nekrózy v důsledku popálení těchto částí sterilizačními činidly. Následně jsou segmenty s jedním pupenem zasazeny do iniciačního média (QL-In, tabulka 1) tak, aby pupen nebyl do média zanořen. Toto iniciační médium je modifikované médium Quoirin a Lepoivre (1977), s přidávkou 6 g.l⁻¹ agaru, 3,4 g.l⁻¹ sacharózy a fytohormonů, 0,7 mg.l⁻¹ BAP a 0,1 mg.l⁻¹ IAA (Faltus a kol., 2012). Nejvhodnější je použití kultivačních zkumavek, do kterých je umístěn vždy pouze jeden pupen, takže v případě infekce dojde k znehodnocení minimálního množství materiálu. Alternativně použijeme Erlenmayerovy baňky, vždy jednu pro umístění dvou segmentů. Po iniciaci kultury trávící 1 – 2 týdny jsou segmenty převedeny na médium QL1 (složení viz tab. 1) a umístěny v kultivační místnosti v podmínkách světlo 14 hodin/tma 10 hodin a teplotě 23-24 °C. Rostliny jsou po 4 - 6 týdnech subkultivace přepasázovávány na nové médium.

Chemoterapie

Pro chemoterapii použijeme stejné médium, na jakém rostliny pěstujeme (tzn. QL1 médium), s přídatkem antivirotika Ribavirinu (1- β -ribofuranosyl-1, 2, 4-triazol-3- carboxamid). Složení viz tabulka 1, médium QL1-Rib. Ribavirin v požadované koncentraci přidáváme do vysterilizovaného a mírně vychlazeného média ve sterilním prostředí flow-boxu přes sterilní filtr. Rostliny ozdravujeme na médiu s 20 mg.l⁻¹ ribavirinu po dobu 8 týdnů v kultivační místnosti při režimu světlo 14 hodin/tma 10 hodin a teplotě 23-24 °C. Poté rostliny opět převedeme na médium QL1 bez antivirotika.

Cca po 4 – 8 týdnech můžeme hodnotit zdravotní stav.

3. Hodnocení zdravotního stavu ozdravených materiálů - detekce virů

3.1. Odběr a příprava vzorků

Testování zdravotního stavu rostlin provádíme před a po aplikaci chemoterapie. Odebíráme jedno- a vícenodální segmenty, bereme na zřetel, že ideálním pletivem pro detekci virových patogenů révy vinné jsou lýková pletiva z výhonů, proto dbáme, aby v odebraném materiálu byly přítomny výhonky, nejen listy nebo části listů.

3.2. Pozitivní kontrola

Jako pozitivní kontrolu používáme rostliny révy vinné infikované testovanými viry. Postup přípravy vzorků je stejný jako je uvedeno výše u testovaných rostlin.

3.3. Negativní kontrola

Jako negativní kontrolu používáme rostliny révy vinné prosté testovaných virů. Postup přípravy vzorků je stejný jako u testovaných rostlin.

3.4. Detekce virů pomocí RT-PCR

Viry přítomné v rostlinách révy vinné stanovujeme v RNA izolované ze vzorků odebraných z testovaných rostlin. Pro izolaci RNA doporučujeme kit RNeasy Plant Mini Kit od Qiagenu. Pokud má diagnostická laboratoř dobré zkušenosti s jiným kitem pro izolaci RNA, lze jej samozřejmě použít místo toho.

Detekce GLRaV-1 a RSPaV

Z praktických důvodů, zejména cenových, ale i z důvodu pracnosti, netestujeme každý materiál hned na všechny viry. Nejprve provedeme test na dva nejrozšířenější viry, což jsou GLRaV-1 a RSPaV. Pouze ty rostliny, které byly v tomto prvním testu negativní, testujeme na další virové patogeny.

Pro detekci GLRaV-1 použijeme primery dle práce Komínek and Bryxiová (2005):

Primer LR1: 5' CAGGCGTCGTTTGTACTGTG 3' je amplifikační primer.

Primer LR2: 5' TCGGACAGCGTTTAAAGTTCC 3' je reverzní primer. Amplifikovaný fragment má délku 540 bp.

Pro detekci RSPaV použijeme primery dle práce Komínek et al. (2009):

RSPL: 5' CACAGGCATTTGCACAGAATC 3' je amplifikační primer.

RSPR: 5' GGTTTCTTAAAGATCCCTTCTTTG 3' je reverzní primer. U pozitivních vzorků dávají tyto primery produkt délky 432 párů bazí.

Tyto primery jsou schopny detekovat i atypický izolát RSPaV-SG1, kterým je latentně infikován celosvětově používaný indikátor virových chorob révy *Vitis rupestris* St. George (Meng et al., 2005).

U každého vzorku RNA provedeme dva testy RT-PCR.

Smícháme v mikrozkuhavce objemu 500 µl následující složky reakční směsi:

RNA	4 µl
primer LR1 nebo RSPL	1 µl
primer LR2 nebo RSPR	1 µl
voda	4 µl
celkem	10 µl

Inkubujeme při 100° C po dobu 10 minut a následně ochladíme na ledu po dobu 5 minut, pak necháme 25 minut stát při pokojové teplotě.

Přidáme následující složky, používáme OneStep RT-PCR Kit (Qiagen):

5x Qiagen Buffer	5 µl
dNTP mix	1 µl
Q roztok	5 µl
Qiagen Enzyme Mix	1 µl
voda	3 µl
celkem	25 µl

Ihned po přidání enzymatické směsi vložíme mikrozkuhavky do cykleru (PTC200 od MJ Research) předehřátého na 45° C. Dále probíhá následující program:

GLRaV-1

45° C	45 minut	
95° C	15 minut	
94° C	1 min.	} 40 x
55° C	1 min.	
72° C	1 min.	
72° C	10 minut	
10° C	stále	

RSPaV

45° C	45 minut	
95° C	15 minut	
94° C	55 sec.	} 40 x
50° C	55 sec.	
72° C	55 sec.	
72° C	10 minut	
10° C	stále	

Po skončení reakce přidáme k reakční směsi 2 µl FLB (Ficoll Loading Buffer) a nanášíme na 1% agarózový gel spolu s vhodným markerem (např. GeneRuler 100 bp Plus firmy Fermentas). U pozitivních vzorků obdržíme produkt délky 540 bp u GLRaV-1 nebo 432 bp u RSPaV.

Pokud je vzorek pozitivní na některý ze dvou testovaných virů, jsou rostliny tímto virem stále infikovány a je nutno proces ozdravování zopakovat. V případě negativního testu pokračujeme detekcí dalších virových patogenů.

Detekce GVA, nepovirů a tymovirů

První krok uvádíme zvlášť pro jednotlivé viry nebo skupiny virů, druhý krok je pak pro všechny společný.

GVA

Primery jsou převzaty dle práce Goszczyński and Jooste (2003).

GVA6591F 5' GAGGTAGATATAGTAGGACCTA 3'

GVA6862R 5' TCGAACATAACCTGTGGCTC 3'

Délka amplifikovaného produktu je 271 bp.

Smícháme v mikrozkušavce objemu 500 μ l následující složky reakční směsi:

RNA	4 μ l
primer GVA6591F	0,5 μ l
primer GVA6862R	0,5 μ l
voda	5 μ l
celkem	10 μ l

Inkubujeme při 100° C po dobu 10 minut a následně ochladíme na ledu po dobu 5 minut, pak necháme 25 minut stát při pokojové teplotě.

Nepoviry

Primery pro detekci nepovirů jsou převzaty z práce Wetzel et al., (2001)

M2A 5' YTRGATTTTAGGCTCAATGG 3'

M3R 5' TGYAARCCAGGRAAGAAAAT 3'

Tyto primery detekují přítomnost GFLV i ArMV, produkt amplifikace má délku 290 bp.

Smícháme v mikrozkušavce objemu 500 μ l následující složky reakční směsi:

RNA	4 μ l
primer M2A	0,5 μ l
primer M3R	0,5 μ l
voda	5 μ l
celkem	10 μ l

Inkubujeme při 100° C po dobu 10 minut a následně ochladíme na ledu po dobu 5 minut, pak necháme 25 minut stát při pokojové teplotě.

Tymoviry

Primery jsou převzaty dle práce Sabanadzović *et al.* (2000), jsou navrženy pro detekci všech virů čeledi *Tymoviridae* (rody *Tymovirus*, *Marafivirus*, *Maculavirus*). Z virů infikujících révu vinnou detekují GFkV a GRGV z rodu *Maculavirus* a GAMaV z rodu *Marafivirus*. Přítomnost všech tří virů již byla prokázána v ČR (Komínek a Komínková, dosud nepublikováno).

Délka amplifikovaného produktu je 386 bp.

Flek1 5' CYCARCAYAARGTVAACGA 3'

Flek2 5' CATGCANGTSAGRGGRCRAA 3'

Smícháme v mikrozkuhavce objemu 500 μ l následující složky reakční směsi:

RNA	4 μ l
primer Flek1	0,8 μ l
primer Flek2	0,8 μ l
voda	4,4 μ l
celkem	10 μ l

Inkubujeme při 100° C po dobu 10 minut a následně ochladíme na ledu po dobu 5 minut, pak necháme 25 minut stát při pokojové teplotě.

Detekce *Grapevine Pinot gris virus*

Pro detekci tohoto viru použijeme primery podle práce Glasa *et al.* (2014):

5' CTGAGAAGCATTGTCCTCATC 3' je reverzní primer

5' ATTGCGGAGTTGCCTTCAAG 3' je amplifikační primer

Další postup je stejný jako u tymovirů.

Další postup je společný pro všechny skupiny virů:

Přidáme následující složky, používáme OneStep RT-PCR Kit (Qiagen):

5x Qiagen Buffer	5 μ l
dNTP mix	1 μ l
Q roztok	5 μ l
Qiagen Enzyme Mix	1 μ l
voda	3 μ l
celkem	25 μ l

Premix připravujeme na ledě.

Po přidání RNA držet na ledě, dokud se cykler nepřehřeje na 45° C.

Ihned po přidání enzymatické směsi vložíme mikrozkuhavky do cykleru (PTC200 od MJ Research) předehřátého na 45° C. V termocykleru spustíme následující program:

45° C	60 minut	
95° C	15 minut	
94° C	45 sec.	} 40 x
50° C	45 sec.	
72° C	1 min.	└
72° C	10 minut	
10° C	stále	

Po skončení reakce přidáme k reakční směsi 2 μ l FLB (Ficoll Loading Buffer) a nanášíme na 1,5% agarózový gel spolu s vhodným markerem (např. GeneRuler 100 bp Plus firmy Fermentas).

Očekáváme fragmenty následujících délek:

GVA	271 bp
nepoviry	290 bp
tymoviry	386 bp
GPGV	303 bp

Pokud je výsledek testování vzorku pomocí RT-PCR na přítomnost některého z virů pozitivní, je rostlina tímto virem stále infikována a je nutno proces ozdravování zopakovat. V případě negativních výsledků RT-PCR považujeme rostlinu za viruprostou.

Při použití výše popsaného způsobu detekce virových patogenů révy vinné již není zapotřebí používat bylinné nebo dřevinné indikátory na zjištění jejich přítomnosti, protože ty zjistí pouze přítomnost těch patogenů, které detekujeme pomocí RT-PCR. Tím se navíc i značně urychlí proces testování zdravotního stavu ozdravených materiálů, protože testování pomocí dřevinných indikátorů by trvalo 2-3 vegetační období.

III) Srovnání novosti postupů

Metodika zabývající se ozdravováním podnoží a odrůd révy vinné byla vydána již v roce 2009, byla založena na použití termoterapie a *in vitro* kultur. Pro ne zcela uspokojivé výsledky postupů založených na termoterapii je nyní vydávána metodika ozdravování odrůd révy vinné založená na chemoterapii. Takto zaměřené metodika dosud nebyla publikována.

IV) Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika je určena pracovištím technických izolátů a dalším podnikům, které provádějí ozdravování podnoží a odrůd révy vinné, případně ji mohou využít též MZe, ÚKZÚZ, Svaz pěstitelů révy vinné a další zájemci a pěstitelé révy vinné. Je zaměřena na popis metod ozdravení a odrůd révy vinné pomocí chemoterapie a postupů diagnostiky virových patogenů révy vinné.

V) Ekonomické aspekty

Náklady na zavedení metodiky na pracovištích, které provádějí ozdravování, jsou zcela nepatrné, protože tyto organizace jsou na tuto práci již vybaveny.

Přínosem metodiky je pak ozdravení základních odrůd sortimentu révy vinné, což může přinést zvýšení kvality produkce révy, především cukernatosti hroznů.

Při předpokládaném osázení 100 ha révy ozdravenými klony lze očekávat zvýšení tržby za prodej hroznů ze současných 60 tis. Kč/ha ročně o 5%, zvýšení celkových tržeb za období 5 let pak bude činit 1,5 mil. Kč.

VI) Seznam použité související literatury

Faltus M, Kotková R, Bilavčík A, Zámečník J., 2012 Kryokonzervace révy vinné. Certifikovaná metodika. VÚRV, v.v.i. Praha 2012. ISBN: 978-80-7427-107-6

Glasa M, Predajňa L, Komínek P, Nagyová A, Candresse T, Olmos A, 2014. Molecular characterization of divergent Grapevine Pinot gris virus isolates and their detection in Slovak and Czech grapevines. *Archives of Virology* 159 (8): 2103-2107.

Goszczyński DE, Jooste AEC, 2003. Identification of divergent variants of Grapevine virus A. *European Journal of Plant Pathology* 109: 397-403.

Komínek P, Bryxiová M, 2005. Comparison of three techniques for the detection of *Grapevine leafroll-associated virus 1*. *Acta Virologica* 49: 37-43.

Komínek P, 2008. Distribution of grapevine viruses in vineyards of the Czech Republic. *Journal of Plant Pathology* 90: 355-356.

Komínek P, Glasa M, Komínková M, 2009. Analysis of multiple virus-infected grapevine plant reveals persistence but uneven virus distribution. *Acta Virologica* 53: 281-285.

Sabanadzovic S, Abou-Ghanem N, Castellano MA, Digiario M, Martelli GP, 2000. Grapevine fleck virus-like viruses in *Vitis*. *Archives of Virology* 145: 553-565.

Wetzel T, Jardak R, Meunier L, Ghorbel A, Reustle GM, Krczal G., 2002. Simultaneous RT/PCR detection and differentiation of arabis mosaic and grapevine fanleaf nepoviruses in grapevines with a single pair of primers. *J. Virol. Methods* 101: 63-69.

VII) Seznam publikací, které předcházely metodice

Paprštein F., Sedlák J., Polák J., Komínek P., Jandurová O., Zeman P., Komínková M., Křížan B., Holleínová V., Ondrušíková E., Bláhová L., Adam M., Baránková K. Metodika ozdravování odrůd ovocných stromů a révy vinné od virů pomocí termoterapie a *in vitro* kultur. Certifikovaná metodika. Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o., 2009. 71 stran. ISBN: 978-80-87030-15-8.

Metodika je dedikována na projekt MZe 1B44051, Výzkum a vývoj standardních metod ozdravení pomocí termoterapie a *in vitro* kultur odrůd ovocných stromů a révy vinné od virů, fytoplazem a karantenních patogenů pro systém certifikace zdravotního stavu výsadbového materiálu.

Komínek P, Jandurová OM, 2011. Thermotherapy sanitation of two grapevine cultivars. Acta virologica 55: 89-90.

Práce je dedikována na projekt MZe QH91153, Využití *in vitro* kultur k ozdravení odrůd ovocných dřevin a révy vinné od virů, fytoplazem a karantenních patogenů pro systém certifikace výsadbového materiálu včetně ověřování kvality.

Komínek P, Komínková M, Jandová B, 2016. Effect of repeated Ribavirin treatment on grapevine viruses. Acta virologica 60: 400-403.

Práce je dedikována na projekt MZe QJ1210175, Výzkum a vývoj standardních metodických postupů ozdravování ovocných dřevin a révy vinné pomocí chemoterapie *in vitro* kultur pro systém certifikace zdravotního stavu výsadbového materiálu.

Metodika ozdravování odrůd révy vinné pomocí chemoterapie
ing. Petr Komínek, Ph.D.
Barbora Jandová
Ing. Marcela Komínková
Doc. Ing. Jaroslav Polák, DrSc.

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Praha, 2017
ISBN 978-80-7427-231-8