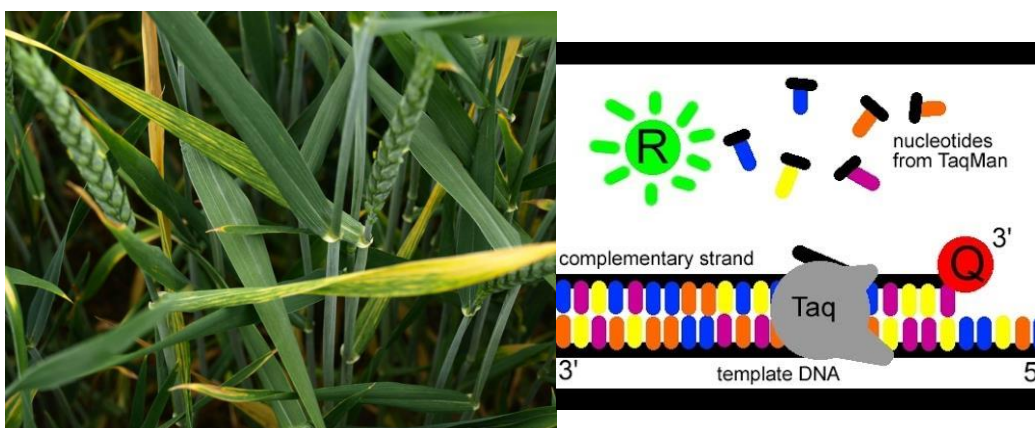




VÝZKUMNÝ ÚSTAV ROSTLINNÉ VÝROBY, v.v.i.

Metodika detekce tří obilných virů (BYDV, WDV, WSMV) pomocí Multiplex TaqMan RT-qPCR



Jarošová a Kumar

Praha, 2018

Metodika detekce tří obilných virů (BYDV, WDV, WSMV) pomocí Multiplex TaqMan RT-qPCR

Autoři:

Ing. Jana Jarošová, Ph.D.*

Ing. Jiban Kumar, Ph.D

Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i.

Drnovská 507, 161 06 Praha-Ruzyně

* korespondující autor: e-mail: j.jarosova@vurv.cz

Tato práce byla financována z projektu TAČR TF02000056.



© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2018

ISBN: 978-80-7427-284-4

Anotace (česky):

Čeleď *Poaceae* je zemědělsky nejdůležitější čeledí rostlin na světě. Rostliny z čeledi *Poaceae* jsou také hostitelem mnoha patogenů včetně více než sta známých druhů virů. Tři nejdůležitější viry napadající obilniny v ČR jsou virus zakrslosti pšenice (WDV), virus žluté zakrslosti ječmene (BYDV) a virus čárkovité mozaiky pšenice (WSMV). Tato metodika poskytuje popis způsobu současné detekce a kvantifikace těchto tří virů obilnin a trav v jedné reakci pomocí metody TaqMan RT-qPCR. Metodika může sloužit vědeckým pracovníkům ke studijním účelům i pracovníkům státní správy k monitoringu výskytu jednotlivých virů na území ČR.

Anotace (anglicky):

The family *Poaceae* is one of the most important groups of plants in the terms of agricultural production. The family *Poaceae* also hosts many pathogens including more than 100 known virus species. The three most important viruses affecting cereals in the Czech Republic are *Barley yellow dwarf virus* (BYDV), *Wheat dwarf virus* (WDV) and *Wheat streak mosaic virus* (WSMV). In this methodology, we provide an assay for multiplex detection and quantification of these viruses by TaqMan RT-qPCR. The purpose of this methodology is to serve scientists as well as the employees of state laboratories as a tool for individual virus occurrence monitoring in the Czech Republic.

Oponenti:

Mgr. Šárka Linhartová, Ph.D. & RNDr. Kateřina Tománková, Ph.D.

Vedoucí Laboratoře virologie & vedoucí Laboratoře biochemie

Odbor diagnostiky

ÚSTŘEDNÍ KONTROLNÍ A ZKUŠEBNÍ ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝ

Šlechtitelů 773/23, 779 00 Olomouc.

Ing. Tomáš Moravec, Ph.D.

Vedoucí Laboratoře virologie

ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BOTANIKY AVČR, v.v.i.

Rozvojová 313, 16502 Praha 6-Lysolaje

Metodika byla certifikována Ústředím kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským (ÚKZÚZ), Pod
OSVĚDČENÍ: UKZUZ

Obsah

Cíl	6
Úvod	6
Přehled uváděných virů obilnin.....	7
BYDV	7
WDV	10
WSMV	13
Rozšíření virů obilnin v ČR a jejich determinace	15
Metody detekce.....	17
Sérologické metody diagnostiky	17
Molekulární metody detekce	18
1) Protokol přípravy vzorku	22
A) Odběr vzorku.....	22
B) Homogenizace	22
2) Protokol izolace RNA	23
2) Protokol tvorby cDNA pomocí náhodných hexamerů	24
3) Protokol současné detekce virů (BYDV, WDV, WSMV) pomocí RT-qPCR.....	25
4) Interpretace výsledků	27
Validace metody	28
Využití molekulární metod pro monitoring virů obilnin a trav	28
Ekonomické aspekty.....	30
Závěr	32
Srovnání „novosti postupů“	33
Popis uplatnění metodiky.....	33
Seznam použité literatury	34
Seznam publikací, které předcházely metodice	37

Cíl

Cílem této metodiky je navrhnutí přesného postupu současné detekce a kvantifikace tří nejčastějších virů obilnin v ČR (BYDV, WDV, WSMV) v jedné reakci pomocí metody TaqMan RT-qPCR. Metodika může sloužit vědeckým pracovníkům ke studijním účelům i pracovníkům státní správy k monitoringu výskytu jednotlivých virů na území ČR.

Úvod

Poaceae (*Gramineae*) - lipnicovité je jedna z nejdůležitějších čeledí rostlin, jak počtem svých druhů, tak i rozšířením v ekosystémech a především jako plodina živící lidstvo i zvěř. *Poaceae* hostí mnoho patogenních organismů včetně více jak 100 druhů virů (Lapierre a Signoret 2004). Virus žluté zakrslosti ječmene (Barley yellow dwarf virus - BYDV) (Beoni *et al.*, 2016; Jarošová *et al.*, 2013; Kundu *et al.*, 2009a) a virus zakrslosti pšenice (Wheat dwarf virus - WDV) (Kundu *et al.*, 2009b) v České republice svým výskytem převládají a mohou způsobovat vysoké ztráty na výnosech. Jediným způsobem, jak snížit dopad těchto virů na výnosy obilnin, je pěstovat odolné odrůdy (Ordon *et al.* 2009). V posledních letech se začíná zvyšovat výskyt a význam další virózy obilnin způsobené virem čárkovité mozaiky pšenice (Wheat streak mosaic virus - WSMV) (Chalupníková *et al.* 2017).

BYDV patří do čeledi *Luteoviridae*, která zahrnuje několik kmenů z rodu *Luteovirus* (PAV, PAS, MAV), *Polerovirus* - virus žluté zakrslosti obilnin (Cereal yellow dwarf virus-RPV, -RPS) a nezařazené členy *Luteoviridae* (RMV, SGV, GPV) (Miller a Rasochová, 1997). WDV patří do rodu *Mastrevirus*, má jako jeden z mála rostlinných virů +ssDNA genom a na území ČR byl poprvé popsán Dr J. Vackem v roce 1961. WDV má dva kmeny, ječný (WDV-B) a pšeničný (WDV-W) (Gadiou *et al.* 2012). WSMV patří do rodu *Tritimovirus*, vyskytuje se celosvětově ve všech pěstitelských oblastech pšenice. V roce 2007 byl virus zaznamenán na Slovensku (Kúdela *et al.* 2008) a v České republice (Gadiou *et al.* 2009). Jeho výskyt má v posledních letech v ČR vzestupnou tendenci (Chalupníková *et al.* 2017).

Každý ze tří virů má odlišné přenašeče. BYDV je přenášeno mšicemi (Oswald a Houston 1951), WDV křískem polním (Vacke 1961) a WSMV roztočem *Aceria tosichella* Keifer (Stenger et al. 1998).

V rutinní diagnostice se využívá převážně sérologické metody ELISA, ačkoliv v posledních letech na významu nabývají techniky založené na detekci nukleových kyselin patogenu, převážně pak technika reverzní transkripce RNA a následné polymerázové řetězové reakce DNA (RT-PCR). Kvantitativní varianta této techniky, RT-qPCR, umožňuje nejen detekci, ale i kvantifikaci množství patogenu ve vzorku (Jarosová a Kundu 2010); a obecně se vyznačuje vyšší citlivostí a efektivitou ve smyslu času a nákladů (Izzo et al. 2012). Multiplex technika pak umožňuje detekci několika patogenů současně, a tím výrazně šetří čas i náklady.

Přehled uváděných virů obilnin

BYDV

Virus žluté zakrslosti ječmene (*Barley yellow dwarf virus*, BYDV) spolu s virem zakrslosti pšenice (*Wheat dwarf virus*, WDV) patří mezi nejdůležitější patogeny obilnin v ČR (Kundu et al., 2009a). BYDV patří do čeledi *Luteoviridae*, která zahrnuje několik kmenů z rodu *Luteovirus* (PAV, PAS, MAV), *Polerovirus* virus žluté zakrslosti obilnin (*Cereal yellow dwarf virus*-RPV, -RPS) a nezařazené členy *Luteoviridae* (RMV, SGV, GPV) (Miller a Rasochová, 1997).

Všechny kmeny viru způsobující žlutou zakrslost ječmene jsou přenášeny mšicemi žijícími na *Poaceae* s různým stupněm specifičnosti přenosu (Dedryver et al. 2005). Přes 25 druhů mšic je známo jako přenašečů tohoto komplexu virů (Rastgou et al. 2005). BYDV je přenášen perzistentním způsobem, což znamená, že virus zůstává infekční v hemolymfě a tím pádem se tělo mšice stává rezervoárem viru, který může být přenášen celé dny i týdny, v podstatě po zbytek života mšice (Gray a Gildow 2003).

BYDV jako původce choroby žluté zakrslosti ječmene prokázali poprvé v roce 1951 Oswald & Houston. BYDV se v ČR v poslední dekádě vyskytuje epidemicky u všech druhů obilnin. Z hlediska epidemiologie je velmi významný u ozimů, kde dochází k vysokým hospodářským ztrátám, a intenzita napadení může být v nepříznivých podmínkách tak vysoká, že takto napadené porosty musí být zaorávány.

Obilniny jsou u nás infikovány BYDV ve dvou fázích. K první fázi infekcí dochází na podzim při migraci přenašečů z výdrolů na vzcházející ozimy. Mšice mohou také migrovat z travních ploch i z kukuřice, není-li sklizena. Intenzivní migrace přenašečů trvá do nástupu chladného počasí, infekce rostlin do příchodu mrazů. Druhé období nálezů ozimých a jarních obilnin probíhá na jaře a v létě ve fázi jejich sloupkování a později. Virus žluté zakrslosti ječmene je přenášen mšicemi migrujícími ze zimních hostitelů, které se nakazily na travách nebo ozimech infikovaných v předchozím roce (Jarošová et al. 2009).

V důsledku napadení virem dochází k ucpávání cévních svazků a omezení celkového růstu. Menší kořenový systém a problémy s asimilačním tokem v rostlinách navozují symptomy nedostatečné výživy. Mezi příznaky patří různě silná zakrslost (obr. 1). Kořeny jsou kratší a méně rozvětvené (rostlina jde snadno vytrhnout). Infekci provázejí poruchy v metání a někdy i předčasné odumírání rostlin. Listy nemocných rostlin jsou zpravidla kratší, někdy i vzpřímenější. U ječmene a některých odrůd pšenice žloutnou od špiček a jejich okrajů, přičemž se chlorotické skvrny, případně rozplývavé pruhy, objevují uprostřed listové čepele. Některé odrůdy pšenice mají listy oranžové, červené až červenohnědé (Ripl a Kumar 2008).

Typickými symptomy napadení je zlatožluté až oranžové zbarvení listů a retardace růstu (obr. 1). Žloutnutí postupuje od špiček a okrajů listů a zachvacuje postupně celou listovou čepel. Žloutnutí většinou začíná 7 - 20 dnů po infekci a může být předcházeno tvorbou vodovatých skvrn na listech (D'Arcy, 1995). Zakrslost doprovází deformace listů a listových čepelí (u ovsa se listy stáčí do ruliček), redukce nadzemní i podzemní biomasy, poruchy metání, sterilita kvítků, redukce počtu klásků a tvorba zadinového zrna. V dalším stádiu choroby se může objevovat nekróza cévních svazků a redukce kořenového systému. Napadené rostliny nemetají nebo nevytvářejí semena. Symptomy jsou v některých případech těžko odlišitelné od příčin neparazitického původu (Miller a Rasochová, 1997).



Obrázek 1. Příznaky BYDV u ječmene (foto J. Kumar, VÚRV, v.v.i.)

K velkému poškození porostů, které může vést až k jejich zaorání, dochází při epidemickém výskytu především u ozimého ječmene. Napadení virem BYDV u pšenice je považováno za méně časté a obvykle dochází k menšímu poškození než u ječmene či ovsa, přesto však v některých ročnících a lokalitách může dojít ke značnému poškození. Ztráty na infikovaných porostech nejsou jen výnosové, ale vedou i k poklesu technologických a nutričních i biologických vlastností. Zvyšuje se náchylnost k suchu a k řadě fytopatogenních hub (Vacke et al. 1998). Výnosové ztráty v důsledku infekce BYDV u časně infikovaných rostlin ozimé pšenice se pohybují v rozmezí 40-80% u náchylných genotypů a 10-40% u odolných (Šíp et al. 2006).

WDV

Virus zakrslosti pšenice (*Wheat dwarf virus*, WDV) se v posledních letech stává jednou z nejdůležitějších chorob obilnin v ČR. WDV patří do rodu Mastrevirus, má jako jeden z mála rostlinných virů +ssDNA genom a na území ČR byl prvně popsán Dr. J. Vackem v roce 1961.

Současná nomenklatura rozděluje virus na tři kmeny: pšeničný kmen, ječný kmen a ovesný kmen (Schubert et al. 2007). Na území České republiky se vyskytuje kmen pšeničný (WDV-W) a ječný (WDV-B). Jednotlivé kmeny se geneticky liší (Kundu et al. 2009), proto mají různou virulenci a hostitelské okruhy. Pšeničný kmen je virulentnější a má široké spektrum hostitelských rostlin čeledi lipnicovité. Kromě pšenice, ječmene, ovsa, žita a tritikále se pšeničný kmen vyskytuje na planě rostoucích a plevelných travách jako jsou oves hluchý (*Avena fatua*), sveřepy (*Bromus inermis*, *B. sterilis*, *B. tectorum*), jílky (*Lolium multiflorum*, *L. perenne*), lipnice roční (*Poa annua*) a chundelka metlice (*Apera spica-venti*) (Vacke, 1972; Vacke a Cibulka, 1999). Hostiteli ječného kmene jsou ječmen, některé druhy rodu oves (*Avena spp.*) a zaječí ocásek (*Lagurus spp.*) (Lindsten a Vacke, 1991). Uvedený výčet hostitelů však zdaleka není úplný. Významnými rezervoáry WDV v agroekosystému jsou obilní výdrolky, plevelné jednoleté trávy (oves hluchý, chundelka metlice, sveřepy a lipnice roční). Dalšími rezervoáry jsou některé druhy trav vytrvalých travních společenstev. U těchto druhů trav není v jejich přirozených stanovištích přesně známa jejich reakce na infekce (Ripl a Kumar, 2008).

Hlavním příznakem virové zakrslosti pšenice u kulturních obilnin společným pro všechny odrůdy je zakrslost rostlin způsobená omezením dlouhivého růstu. Nejvíce patrné jsou příznaky v době obvyklé pro počátek sloupkování. Častými příznaky jsou odumření terminálního listu, po němž následuje odumření zbytku odnože, deformace, prohýbání listů. Žloutnutí starších listů (obr. 2),

předcházející jejich odumření, začíná od špiček. Inkubační doba se pohybuje v polních podmínkách za příznivých vegetačních podmínek od tří do šesti týdnů (Ripl a Kumar, 2008).

Pro narušení normálního vývoje je nutná silná infestace rostliny virem, proto jsou intenzita i projev příznaků závislé na růstové fázi v době infekce a latentním období. U později napadených rostlin má choroba mírnější průběh (Ripl a Kumar, 2008).



Obrázek 2. Ohniskový zdroj infekce WDV v pšenici (foto J. Kumar, VÚRV, v.v.i.)



Obrázek 3. Sekundární infekce WDV v pšenici (foto J. Kumar, VÚRV, v.v.i.)

Dosud je schopnost přenosu viru WDV z nemocných na zdravé rostliny bezpečně potvrzena jen u jediného přenašeče – kříška polního. Virus se přenáší perzistentně nepropagativně (nemnoží se v těle přenašeče). Není přenosný transovariálně (přes vajíčko na potomstvo) ani mechanicky či osivem. Křísek polní je schopen získat virus již při 5-ti minutovém sání na infikované rostlině. Vironosní křísci mohou úspěšně přenést virus na zdravou rostlinu během 15-ti minutového sání. Křísek polní uchovává WDV v těle a přenáší jej po dobu až 50 dní, což znamená prakticky po celý svůj život (Vacke 1971). Velmi atraktivní jsou mladé rostliny šťavnatých kulturních obilnin. Křísci se proto v létě ve velkém množství stěhují na obilní výdroly a na podzim na nové výsevy ozimů (kde dochází k primární infekci porostu). Z hlediska infekčního cyklu a vývoje choroby je tato primární infekce porostu velice důležitá. Nejnáchylnější jsou rostliny do fáze třetího listu, zejména porosty s časným zavlečením viru mohou být chorobou zcela zničené. Na jaře dochází k šíření infekce nymfami vylíhlými z přezimujících vajíček a nakaženými při sání na nemocných rostlinách (sekundární rozšiřování infekce v porostu – obr. 3). Hostitelem kříška polního jsou i

nekulturní plané trávy, předpokládá se proto i migrace mezi volnými plochami a obhospodařovanými pozemky a dlouhé migrační období (Ripl a Kumar, 2008).

WSMV

WSMV napadá pšenici (*Triticum aestivum*), oves (*Avena sativa*), ječmen (*Hordeum vulgare*), žito (*Secale cereale*), kukuřici (*Zea mays*), čirok (*Sorghum vulgare*), proso (*Panicum*, *Setaria* a *Echinochloa* spp.). Specifickým symptomem je žlutozelená mozaika na listech (obr. 4). V polních podmínkách se symptomy projeví spolu s nástupem teplejšího počasí od poloviny do konce jara. Infikované rostliny vykazují mozaiky listů a napadlé odnože jsou povadlejší a polehlejší v porovnání s odnožemi zdravými. Symptomy přetrvávají až do zralosti rostlin. Mezi běžné symptomy se řadí i zakrslost. U čiroku se mohou objevit sporadicky nekrotické skvrny (Brakke 1971). Infikované rostliny se objevují zpočátku na okrajích polí. Tato skutečnost souvisí s migrací roztočů z travnatých, neudržovaných ploch hraničících s porosty obilnin (Hunger 2010).



Obrázek 4. Pšenice postižená virem čárkovitosti pšenice (WSMV). (Foto Jiban Kumar, VÚRV, v.v.i.)

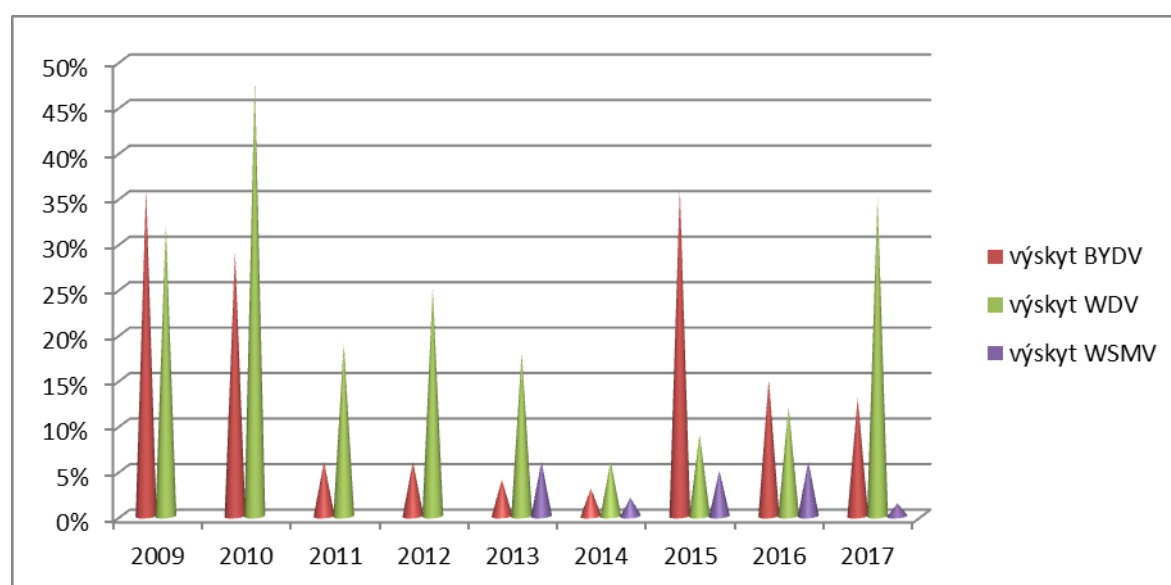
Napadá také mnoho plevelných a volně rostoucích trav, včetně rodů *Aeiglops*, *Agropyron*, *Bouteloua*, *Bromus*, *Cenchrus*, *Digitaria*, *Echinochloa*, *Elymus*, *Eragrostis*, *Haynaldia*, *Hordeum*, *Lolium*, *Panicum*, *Phalaris*, *Poa*, *Orizopsis*, *Setaria* a *Stipa*. Nenapadá *Agropyron repens*, *Bromus inermis*, *Hordeum jubatum*, rýži (*Oryza sativa*) nebo cukrovou třtinu (*Saccharum officinarum*) (French a Stenger, 2002).

Cyklus napadení WSMV začíná v podzimním období, kdy se vironosní roztoči stěhují z infikovaných porostů obilnin, kukuřice, výdrolů pšenice nebo trav na nově vzešlé porosty ozimých obilnin (pšenice). Časná infekce u mladých vzcházejících rostlin má za následek vyšší výnosové ztráty ozimé pšenice (Slykhuis et al. 1957; Hunger et al. 1992). Porosty ozimé pšenice mohou být rovněž infikovány na jaře, avšak jarní infekce nemají podstatný vliv na výnosové ztráty (Somsen and Sill 1970). Pšenice nebo jiné obilniny či trávy infikované WSMV slouží jako zdroj inokula viru. Po sklizni plodiny (v letním období) se roztoči přestěhují na výdrol a travní porosty na mezích (tzv. „zelený most“), kde roztoči infikovaní WSMV přežívají a množí se. Poté vironosní roztoči znovu infikují nově vzešlé porosty ozimé pšenice či jiných obilnin (Kumar et al. 2016).

WSMV je přenášen především roztočem *Aceria tosichella* z čeledi *Eriophyidae* (angl. Wheat curl mite - WCM). Tento roztoč je velký 0,1 až 0,3 mm, má bílé zbarvení a doutníkový tvar těla. *A. tosichella* není okřídlený a má dva páry nohou blízko hlavy. Na nová stanoviště se šíří vzdušnými proudy (Sabelis and Bruin 1996). Životní cyklus se skládá z vajíčka, dvou instarů nymfy a dospělé. Při teplotách okolo 25 - 28 °C je roztoč *Aceria tosichella* během 8-10 dní schopen uskutečnit svůj vývoj od vajíčka až po dospělé schopného další reprodukce. Samičky produkují kolem 20 vajíček, přičemž potenciál samic je přes 3 milióny vajíček v průběhu 60 dní. Z tohoto důvodu jsou pro expanzi této choroby nebezpečná dlouhá období teplého léta s teplotami kolem 25 °C. Naopak při teplotách nižších než 15 °C jejich reprodukční schopnost velice rychle klesá. Vajíčka tohoto roztoče jsou schopna přežít poměrně dlouhou dobu při teplotách pod bodem mrazu. Experimentálně bylo zjištěno, že po expozici vajíček teplotě -15°C po dobu 8 dní byla více než čtvrtina všech vajíček schopna dále pokračovat ve vývoji při následném zvýšení teplot na 20°C (Slykhuis 1973). Obě nymfální stádia i dospělci jsou schopni přenášet virus. Pozorovat a nalézt tohoto roztoče v porostu, vzhledem k jeho velikosti, není možné. Je možné ho vidět pouze pomocí mikroskopu.

Rozšíření virů obilnin v ČR a jejich determinace

V České republice je výskyt BYDV a WDV pravidelně monitorován. Od roku 2013 dochází i k pravidelnému monitorování výskytu WSMV. BYDV a WDV jsou jednoznačně viry v porostech obilnin převládající. Intenzita výskytu viróz přenášných hmyzem je velice nepravidelná a těžko odhadnutelná. V ČR se výskyt viróz pohybuje v řádu od jednotek po desítky procent (graf č. 1). Jedná se ovšem o procenta z odebraných vzorků, které jsou již symptomaticky determinovány v porostech a tudíž jejich výběr není nahodilý. Podíl jednotlivých nakažených rostlin v porostech je tedy v realitě mnohem nižší. Intenzita výskytu ročníkově výrazně kolísá, u BYDV a WDV je silně závislá na atmosférických podmínkách, které ovlivňují chování přenašečů. U WSMV je výrazný efekt teploty. U polí s plošným výskytem WSMV lze i v okolních porostech předpokládat jeho výskyt i v dalších letech, pokud nedojde k pečlivé likvidaci zeleného mostu.



Graf č. 1. Výskyt BYDV, WDV a WSMV ve vzorcích odebíraných ve VÚRV v.v.i. a v ÚKZÚZ. Procenta jsou vztažena k celkovému počtu odebraných vzorků obilnin po celý průběh roku.

Výskyt viróz je diagnosticky patrnější v určitých specifických obdobích. U ozimů je poměrně složité determinovat výskyt virů již na podzim u vzcházejících rostlin. Pokud dojde k podzimní infekci, trvá několik týdnů, než v rostlině nastoupá titr viru na úroveň detekovatelnou sérologickými metodami. I poté je ovšem velmi obtížné infikovanou rostlinu symptomaticky odhalit, neboť symptomatický projev je v tomto období ještě minimální. S vyšší určitostí lze ozimé rostliny symptomaticky hodnotit na jaře. V brzkém jaru je relativně jednoduché určit podzimní infekce WDV v pšenici i ječmeni a podzimní infekce BYDV v ječmeni. Nejvýraznějším

znakem obou dvou viróz je zde výrazná zakrslost a žloutnutí (obr. 5). U infekce BYDV v pšenici nedochází obvykle ani k výrazné retardaci růstu ani ke změnám barvy. S postupujícím jarem jsou zakrslé rostliny v porostu utlačeny ostatními rostlinami. Současně začínají být s vyššími teplotami u ozimů patrné podzimní infekce WSMV a BYDV v pšenici. U obou se jedná převážně o změny zbarvení listů. WSMV lze diagnostikovat dle charakteristických nepatrných, avšak velmi četných čárek rovnoběžných s žilnatinou. Tato místa vykazují úbytek chlorofylu, mohou být širší a tvořit souvislejší pruhy. U BYDV dochází u pšenice ke zlatožlutému až oranžovému zbarvení listů, které postupuje od špiček a okrajů listů a zachvacuje postupně celou listovou čepel. U ječmene je žloutnutí provázeno výraznější zakrslostí, u pšenice je tato zakrslost méně nápadná. V mnoha případech jsou rostliny pšenice nakažené virem BYDV téměř bez příznaků, patrný je jen celkové menší objem nadzemní hmoty v porovnání s nenakaženými rostlinami.



Obrázek 5. Podzimní infekce BYDV v ozimém ječmeni - stav na jaře. Foto Jiban Kumar.

Metody detekce

Detekce a identifikace virů je velikou výzvou od vzniku rostlinné virologie jako samostatné disciplíny, a od té doby byla vyvinuta řada metod umožňujících určit virové patogeny (Boonham *et al.* 2007). Přesná diagnóza organismů způsobujících choroby je nezbytným předpokladem účinné kontroly (Boonham *et al.* 2003) a ve studiích epidemiologie a ekologie virů kritickým faktorem (Wheelis 2002). Do současnosti bylo vyvinuto a je každodenně využíváno mnoho metod (elektronová mikroskopie, ELISA, PCR, RT-PCR, TaqMan, reverse PAGE, hybridizace nukleových kyselin, metagenomické přístupy, biologické testy) (Boonham *et al.* 2003). Běžné metody nacházející uplatnění v rutinní diagnostice zahrnují různé variace polymerázové řetězové reakce (PCR), sérologických testů jako Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), a dále imunofluorescenční testy na protilátky (Menzel *et al.* 2002; Melcher *et al.* 2008). Jednotlivé metody se liší svou citlivostí, náročností provedení a v neposlední řadě náklady.

Při rutinním testování se obvykle rostlinný materiál (osivo, sadba, vzorky ze zemědělsky obhospodařovaných ploch) testuje na předem dané spektrum patogenů danou jednou, max. dvěma metodami. Výběr vzorků může být náhodný, nebo mu může předcházet vizuální zhodnocení příznaků odborným pracovníkem nebo zemědělcem.

V současné době se v České republice obvykle rutinně testuje sérologicky nebo zjišťováním nukleové kyseliny viru ve vzorku pomocí RT-PCR.

Sérologické metody diagnostiky

Metody enzymové imunoanalýzy patří k důležitým technikám stanovení řady makromolekul (především proteinů), jejich komplexů (např. viry, buňky), ale i nízkomolekulárních látek (např. hormony, růstové regulátory). Základem všech sérologických technik a jejich modifikací je reakce protilátky s antigenem. Virové částice mají na povrchu plášťového proteinu specifické struktury, které nazýváme epitopy. Jestliže izolovaný (purifikovaný) virus naočkujeme do vhodného obratlovce, nejčastěji králíka, vytvoří ve svém těle proti těmto bílkovinám specifické protilátky zvané imunoglobuliny G (IgG).

Běžně využívanou sérologickou metodou je v rostlinné virologii DAS-ELISA test, kde virový antigen nejdříve reaguje se specifickými protilátkami (obvykle jako imuno- γ -globulin nebo IgG frakce antiséra) navázanými na povrch pevného nosiče a je pak detekován specifickými

protilátkami značenými enzymem, který v případě pozitivního vzorku zviditelní reakci rozkladem vhodného chromogenního substrátu (tj. změnou barvy). Protilátky vázané na pevný nosič a protilátky značené mohou a nemusí být ze stejného zdroje. Vzhledem k tomu, že je virus umístěn mezi dvě molekuly protilátek, nazývá se metoda double antibody sandwich (DAS) ELISA (Naidu a Hughes 2003). Ve všech případech je výstupní informací provedeného ELISA testu soubor hodnot absorbance. Protože ELISA testem je stanovován proteinový antigen virionu, hodnota absorbance nás neinformuje přímo o stavu virové částice a o její schopnosti vyvolat infekci. V praxi je DAS-ELISA relativně vysoce specifická (Naidu a Hughes 2003).

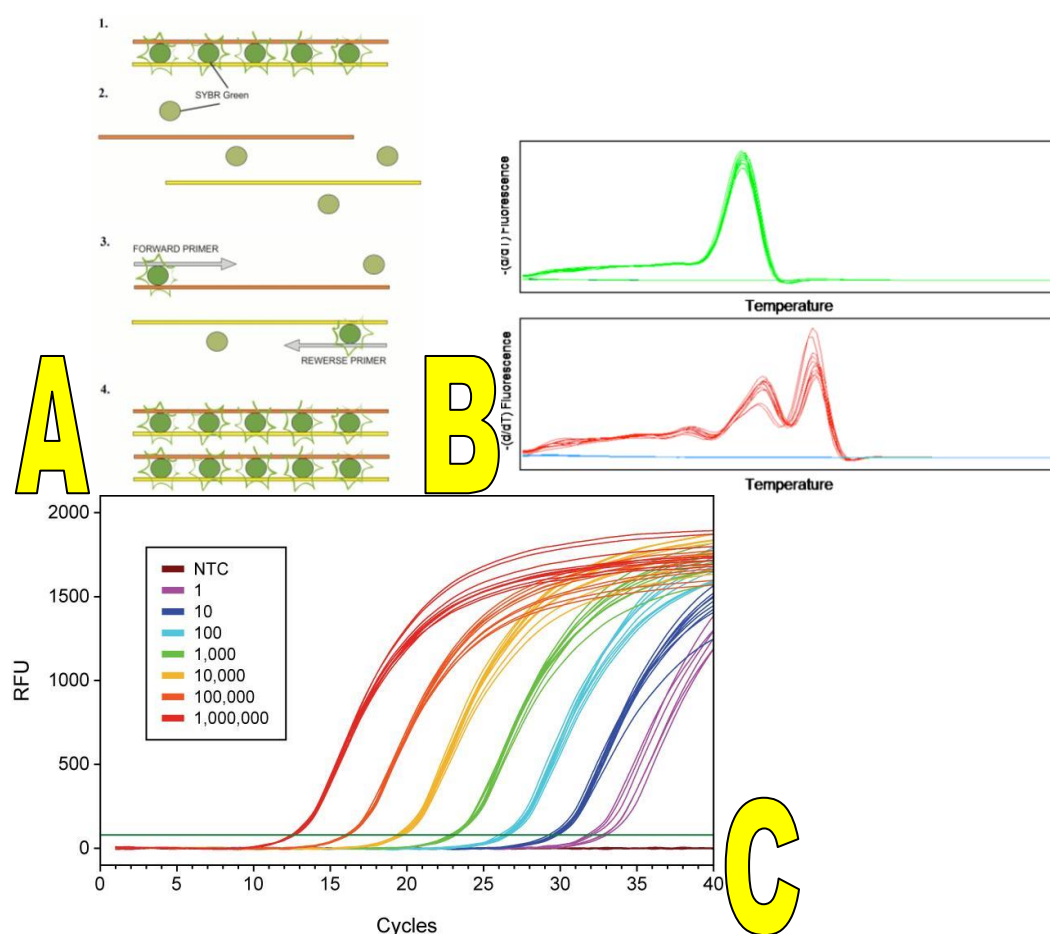
ELISA se stala od momentu, kdy ji poprvé do rostlinné virologie uvedli Clark a Adams v roce 1977 velmi populární volbou detekce virů v rostlinném materiálu, hmyzích vektorech, semenech i vegetativním rozmnožovacím materiálu. Díky své přizpůsobivosti, citlivosti a výši nákladů je ELISA stále využívána v mnoha případech, především pokud se jedná o testování vysokého počtu vzorků najednou (Naidu a Hughes 2003).

Molekulární metody detekce

Metody molekulární detekce se poprvé objevily v sedmdesátých letech a od té doby stále nabývají v rutinní diagnostice na významu. Princip PCR (polymerase chain reaction) byl poprvé představen Kerry Mullisem v roce 1983 (Mullis 1990). PCR je *in vitro* metoda pro enzymatickou syntézu definované sekvence DNA. Reakce využívá dvou oligonukleotidových primerů, které hybridizují s protichůdnými vlákny DNA a od jejich 3'-konců je zahájena syntéza komplementárních řetězců. Syntéza nových komplementárních vláken je katalyzována termostabilní DNA polymerázou (např. Taq DNA - polymeráza). Opakování cyklů, které zahrnují denaturaci DNA templátu (denaturation), hybridizaci primeru (annealing) a syntézu komplementárních vláken DNA (extension), má za výsledek exponenciální nárůst počtu specifických DNA fragmentů. PCR je velice citlivá metoda, která umožňuje detekci DNA ve vzorku tím, že určenou sekvenci namnoží do té míry, že ji můžeme po separaci gelovou elektroforézou a obarvení snadno detekovat.

Většina rostlinných virů je tvořena pouze RNA. DNA polymeráza není schopna využít RNA jako matici pro syntézu nového řetězce, proto musí být RNA nejprve přepsána na jednořetězovou DNA (cDNA), která posléze vstupuje jako templát do PCR (RT-PCR – reverse transcription-polymerase chain reaction).

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí (nejčastěji označovaná jako Real-time RT-PCR nebo RT-qPCR) je metoda založena na principu klasické PCR, umožňuje však kvantifikaci sledovaného úseku RNA. Na rozdíl od konvenční RT-PCR, kde se analyzuje až výsledný produkt pomocí elektroforézy v agaróze, je při RT-qPCR zaznamenáván každý cyklus PCR ve skutečném čase. Záznam amplifikace je založen na principu fluorescence, kdy se používají sondy (fluorescenční látky), které se vážou specificky nebo nespecificky na amplifikované DNA. Běžně se používají fluorescenční kyaninová barviva SYBR® Green (obr. 9a), která fluoreskují po vazbě na menší žlábkové dsDNA. Fluorescence SYBR green I je po vazbě na DNA až 1000x vyšší a fluorescenční signál se zvyšuje se vzrůstajícím množstvím PCR produktu. Signál se měří buď na konci elongace, nebo kontinuálně. Je zřejmé, že barviva, která se nespecificky vážou na DNA, nemohou být použita u mnohonásobných reakcí, a jejich hlavním omezením je nemožnost odlišení nespecifických produktů (obr. 9b). qPCR je založena na konceptu C_p hodnoty (C_p jako crossing point, bod překročení) (obr. 9c) (Heid et al. 1996).



Obrázek 9a. Princip SYBR Green qPCR. Barvivo SYBR Green se váže na jakoukoli dvouvláknennou DNA (dsDNA), čímž začne emitovat fluorescenci, kterou je přístroj schopen zachytit. Nárůst

množství dsDNA (tedy PCR produktu) vede k nárůstu intenzity fluorescence, která je po každém cyklu změřena přístrojem.

Obrázek 9b. Analýza křivky tání. Pokud pro qPCR využíváme SybrGreen, můžeme velmi snadno kontrolovat, jestli v průběhu reakce vznikají nespecifické produkty či primery-dimery. Je k tomu využívána křivka tání, tzv. melting curve, která využívá toho, že různé PCR produkty mají různé teploty tání. Nespecifické produkty mají obvykle teplotu tání nižší než specifické. Křivka tání ukazuje změnu intenzity fluorescence při různých teplotách. Pokud má křivka tání pouze jeden vrchol, reakce je čistě specifická, pokud křivka má dva a více vrcholů, znamená to, že kromě specifických produktů vznikají také nespecifické.

Obrázek 9c. C_t hodnota reflektuje cyklus, kdy dochází k nárůstu fluorescence nad práh pozadí, které se v reakci vyskytuje. Tato fluorescence je zachycena detektorem. Jedná se tedy o bod, kdy se křivka nárůstu fluorescence protíná s prahem pozadí (modrá lineární čára). Číslo tohoto cyklu je zaznamenáno a dále využíváno právě jako C_t hodnota.

qPCR se stala nejpřesnější a nejcitlivější metodou, která byla doposud vyvinuta (Dorak 2006). Metodiky detekce a kvantifikace patogenů pomocí RT-qPCR od roku 1999 přibývají. Jsou rychlejší, přesnější a citlivější v porovnání s tradičně využívanými metodami detekce a kvantifikace, a mohou být použity naprosto univerzálně (tab. 1). Z těchto důvodů jsou využívány pro diagnostiku zemědělských vzorků, i pro aplikované účely (Gachon et al. 2004).

Tabulka 1. Souhrn technických vlastností qPCR v porovnání s jinými v současnosti využívanými technikami (zdroj Gachon et al., 2004). Počet šipek označuje míru důležitosti vyžadované u jednotlivých parametrů. Znaménka ‘+’ a ‘-’ označují schopnost dané techniky uspokojit jednotlivé požadavky.

Parametry	Rychlost	Citlivost	Specifická	Kvantifikace	Spolehlivost	Náklady
Technické požadavky	→	→→→	→→	→→→	→→→	
qPCR	+++	+++	+++	+++	+++	-
Southern blot	-	--	Proměnlivá	-	+	+
ELISA	+++	--	Proměnlivá	+	+	+++

Je jednoznačné, že rozvoj širokého využití qPCR metod v rutinní diagnostice je limitován jediným faktorem; a to jsou stále relativně vysoké náklady na přístrojové vybavení a reagenty

(Gachon et al. 2004). Technologie Multiplex tyto náklady prudce snižuje, neboť dochází k současné detekci více virů v jednom vzorku a náklady tedy lze podělit.

1) Protokol přípravy vzorku

A) Odběr vzorku

Odebíráme na prvním místě rostliny symptomatické, nebo rostliny, na nichž byl zaznamenán výskyt vektorů. Pokud v porostu takové rostliny nejsou, odebíráme náhodně více vzorků z různých míst porostu. U mladých rostlin je možno odebírat celé nadzemní části nebo jen listy, u starších rostlin je opět možné obojí, nicméně z hlediska úspory času při homogenizaci a kvality izolované RNA je vhodnější odebírat jen mladší listy bez stébel. Při odběru dbáme na zabránění kontaminace z rostliny na rostlinu (pracujeme v rukavicích, nůžky, skalpel nebo jiné nástroje omýváme mezi odběry jednotlivých vzorků vhodným dezinfekčním činidlem, vzorky uskladňujeme každý zvlášť). Odebrané vzorky uchováváme v chladu a co nejdříve buď ihned homogenizujeme, nebo uskladníme na -80°C .

B) Homogenizace

Pro izolaci RNA potřebujeme 0,1 g rostlinného pletiva. Jednodušší je ovšem homogenizovat větší množství vstupního materiálu a z homogenátu 0,1 g odvážit. Vzorky homogenizujeme v tekutém dusíku, u vzorků uchovávaných na -80°C dbáme na to, aby nedošlo k jejich rozmražení, ideálně odebíráme z mrazicího boxu každý vzorek zvlášť. Vzorek pečlivě homogenizujeme v předmražené třecí misce a do 2 ml sterilní mikrozkušavky odvážíme maximálně 0,1 g homogenátu, lepších výsledků izolace RNA lze dosáhnout s 60-70 mg vzorku. Mikrozkušavky je také možno předmrazit krátkým ponořením do tekutého dusíku. Je velmi důležité nepřesáhnout danou váhu, neboť u kolonkových metod izolace RNA dochází v tomto případě ke sníženému výtěžku i kvalitě RNA. Jakmile máme vzorky navážené, je opět nutno zabránit jejich rozmražení před samotnou izolací - vhodné je uchování v tekutém dusíku nebo v mrazicím boxu.

2) Protokol izolace RNA

Existuje mnoho způsobů izolace RNA. Zde je uveden tzv. kolonkový způsob metody izolace. Tato izolační metoda vychází ze zjištění, že nukleové kyseliny v přítomnosti tzv. chaotropních solí adherují na silikátový povrch. Výhodou metody založené na adsorpci na silikát je rychlost a pohodlnost, proto jsou na tomto principu vyráběny komerční soupravy (kity) pro rutinní extrakce RNA. Kity jsou optimalizovány pro použití na konkrétní typ a množství vzorku a poskytují standardizované výsledky. Pohodlnost použití kitů je dále zvýšena tím, že obvykle používají nástavce do mikrozkušavek, obsahující jemný filtr, který zadrží silikátové částice. Zpracování pak probíhá tak, že jsou roztoky promývány přes kolonku (filtr se zachycenými částicemi). Namísto tradičního silikátu kity často využívají speciální pryskyřice a mají různě upravené složení pufrů tak, že např. preferují při adsorpci molekuly nukleových kyselin určitého velikostního rozpětí.

V našem případě doporučujeme použití komerční soupravy Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma - kat.č. STRN10, STRN50 a STRN250).

Protokol izolace RNA komerční soupravou Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma)

Lyzace

1. Předem si nachystat směs lyzačního pufru s 2-mercaptoethanolem (na každý vzorek je zapotřebí **500µl Lysis solution** a 5 µl 2-ME)
2. Předem si nachystat rovněž mikrozkušavky s kolonkou s modrým kroužkem (Filtration column), s kolonkou s červeným kroužkem (Binding column) a další dvě mikrozkušavky bez kolonek.
3. Do homogenizovaného vzorku napipetovat 500 µl lyzačního roztoku předem namíchaného s 2-mercaptoethanolem a 2 minuty vortexovat.

Přečištění-filtrace

4. Všechny vzorky vložit do vodní lázně a inkubovat **5 min při 56 °C**. Centrifugovat vše **3 min při 14000 RPM**.
5. Přepipetovat supernatant na **Filtration column** (modrý kroužek), zavřít a centrifugovat 1 min při **14000 RPM**.

Navázání RNA na kolonku

6. Kolonku zahodit a připipetovat po **500 µl Binding solution**, zvortexovat a **700 µl** napipetovat na **Binding column (červený kroužek)**.
7. Poté kolonky centrifugovat **1 min při 14000 RPM**. Vylít supernatant, osušit Collection tube o filtrační papír, vrátit do ní kolonku, napipetovat zbytek směsi a centrifugovat **1 min při 14000 RPM**.
8. Vylít supernatant, osušit Collection tube o filtrační papír a vrátit do ní kolonku.

Promytí RNA na kolonce

9. Do kolonky napipetovat **500 µl Wash Solution 1** a centrifugovat **1 min při 14000 RPM**.
10. Vylít supernatant, osušit Collection tube o filtrační papír a vrátit do ní kolonku.
11. Do kolonky napipetovat **500 µl Wash Solution 2** a centrifugovat **30 s při 14000 RPM**.
12. Vylít supernatant, osušit Collection tube o filtrační papír a vrátit do ní kolonku.
13. Krok 11 a 12 dvakrát zopakovat

Eluce RNA z kolonky

14. Přendat kolonku do nové mikrozkušavky a centrifugovat **1 min při 14000 RPM**, aby se kolonka osušila.
15. Poté kolonku vyjmout a vložit opatrně do nové **popsané** 2 ml eppendorfky (součást kitu). Do středu kolonky (přímo na membránu) napipetovat **50 µl Elution Solution**, zavřít víčko a nechat stát **1 min při pokojové teplotě**. Centrifugovat kolonku **1 min při 14000 RPM**. Vyndat kolonku z eppendorfky a zahodit ji.
16. Změřit koncentraci RNA.
17. Naředit vzorek pomocí autoklávané ddH₂O na koncentraci 300 ng/µl.

Kvalitu izolované RNA měříme spektrofotometricky (NanoDrop2000, ThermoScientific, USA). Měří se při vlnových délkách 260, 230 a 280 nm. To umožní hodnocení čistoty vzorku, očekávané poměry jednotlivých absorbancí naměřených při výše zmíněných vlnových délkách (260/280; 260/230) jsou 2.0 pro RNA. Poměr absorbancí 260/280 menší než 1.75 svědčí pro obsah kontaminujících bílkovin. Poměr absorbancí 260/230 nižší než 2 značí přítomnost nečistot, jako jsou sacharidy, fenolické sloučeniny, aromatické složky. Při výpočtu koncentrace optická hustota 1 odpovídá přibližně 40 ng/µl pro RNA.

2) Protokol tvorby cDNA pomocí náhodných hexamerů

Neboť PCR pracuje s DNA, je zapotřebí přepsat izolovanou RNA do komplementární DNA – cDNA. K tomu použijeme enzym reverzní transkriptázu (RT), nukleotidy (dNTPs), vhodný pufr a

dosedající primery – náhodně nasyntetizované hexamery (random hexamers). Zde je v příkladu uvedeno použití kitu RevertAid First Strand cDNA od firmy ThermoFisher Scientific; lze však využít jakýkoli jiný produkt rutinně používaný v laboratoři k tvorbě cDNA.

Protokol přepisu RNA do cDNA

1. Smícháme 0,5 – 5 µg RNA s 0,3 µl primerů random hexamers (součást kitu) a doplníme sterilní vodou prostou nukleáz do objemu 9,55 µl.
2. Dáme do PCR cycleru na 5 min na 65°C. Pak prudce zchladíme (nejlépe na ledu).
3. Doplníme 3 µl pufru; 1,5 µl dNTPs; 0,4 µl inhibitoru RNáz Ribolock a 0,55 µl reverzní transkriptázy (vše součást kitu).
4. Vložíme opět do PCR cycleru za následujících podmínek: 25°C 5 min; 42°C 60 min; 72°C 5 min; 4°C zchlazení.

cDNA lze využít přímo do PCR nebo ji lze skladovat na -20°C.

3) Protokol současné detekce virů (BYDV, WDV, WSMV) pomocí RT-qPCR

Tento protokol popisuje postup pro použití přístroje Lightcycler 480 od firmy Roche, protokol pro použití s jinými přístroji může být lehce odlišný.

Při použití destiček (ať již 96- nebo 384- jamkových) je vhodné si nejprve udělat návrh umístění jednotlivých vzorků na destičku a podle něj postupovat. Ideálně použijeme každý vzorek v triplicátu, včetně pozitivní kontroly (RNA izolovaná z rostliny s potvrzenou infekcí BYDV, WDV nebo WSMV) a negativní kontroly (RNA izolovaná ze zdravé rostliny), případně použijeme jako templát pouze destilovanou vodu pro kontrolu, zda nejsou primery kontaminovány.

Návrh destičky tedy vypadá např. takto:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Vzorek 5	Vzorek 6	Pozitivní kontrola BYDV	Pozitivní kontrola WDV	Pozitivní kontrola WSMV	Pozitivní kontrola BYDV + WDV	Pozitivní kontrola WDV + WSMV	Negativní kontrola BYDV + WSMV
B	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Vzorek 5	Vzorek 6	Pozitivní kontrola BYDV	Pozitivní kontrola WDV	Pozitivní kontrola WSMV	Pozitivní kontrola BYDV + WDV	Pozitivní kontrola WDV + WSMV	Negativní kontrola BYDV + WSMV
C	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Vzorek 5	Vzorek 6	Pozitivní kontrola BYDV	Pozitivní kontrola WDV	Pozitivní kontrola WSMV	Pozitivní kontrola BYDV + WDV	Pozitivní kontrola WDV + WSMV	Negativní kontrola BYDV + WSMV

D	Vzorek 7	Vzorek 8	Vzorek 9	Vzorek 10	Vzorek 11	Vzorek 12	Vzorek 13	Vzorek 14	Vzorek 15	Pozitivní kontrola BYDV + WDV + WSMV	Negativní kontrola zdravá rostlina	Negativní kontrola H ₂ O
E	Vzorek 7	Vzorek 8	Vzorek 9	Vzorek 10	Vzorek 11	Vzorek 12	Vzorek 13	Vzorek 14	Vzorek 15	Pozitivní kontrola BYDV + WDV + WSMV	Negativní kontrola zdravá rostlina	Negativní kontrola H ₂ O
F	Vzorek 7	Vzorek 8	Vzorek 9	Vzorek 10	Vzorek 11	Vzorek 12	Vzorek 13	Vzorek 14	Vzorek 15	Pozitivní kontrola BYDV + WDV + WSMV	Negativní kontrola zdravá rostlina	Negativní kontrola H ₂ O
G												
H												

Mastermix se skládá z 10 µl Lightcycler Probe (Roche), primerů a sond pro jednotlivé detekce (tab. 2) o konečné individuální koncentraci 0,17 µM (tedy koncentrace jednotlivých primerů i sond) a 5 µl cDNA - vše doplníme do 20 µl vodou. U 384- jamkových destiček vše přepočítáme na celkový objem reakce 12 µl. Sonda pro BYDV je značená FAM, pro WDV HEX a pro WSMV Cy5. V případě Multiplex detekce je nutné použití tmavých zhášeců – zde se jedná o Black Hole Quenchers.

Amplifikace má následující podmínky: 5 min inkubace při 95°C následované 40 cykly o 10 s při 95°C, 40 s při 60°C, a 1 s při 72°C; následuje chlazení při 40°C. K odečítání fluorescence dochází v každém cyklu při 60°C.

Tabulka 02. Seznam primerů používaných v této metodice.

Název	Sekvence	Virus	Pozice	Reference
BYD-1R	GCCCAGCGCTTTCAGAC	BYDV	3132-3116	(Fabre et al. 2003)
BYD-1F	AAAGCCAACTCTCCGGG	BYDV	3067-3084	(Fabre et al. 2003)
BYD-Taq	FAM-CAAATTCGGCCCCAGTCTATCGCA-BHQ1	BYDV	3090-3113	(Fabre et al. 2003)
WDV-1R	CGGTCTGATTTGTATGCCGATT	WDV	680-659	(Zhang et al. 2010)
WDV-1F	CCCCGGGTCGATCTGATT	WDV	611-628	(Zhang et al. 2010)
WDV-Taq	HEX-CCTGTTTTGCTCAGGGTAAGGCCGAT-BHQ1	WDV	630-655	(Zhang et al. 2010)
WSM-3R	TCCTTTTGATCCTGACCCTTG	WSMV	8443-8423	Navrženo v laboratoři
WSM-3F	AGTGGAAGTACGCAGTCAAG	WSMV	8255-8274	Navrženo v laboratoři
WSM-3Taq	Cy5-TGCCATGACCGACACGTTGCTA-BHQ2	WSMV	8395-8374	Navrženo v laboratoři

4) Interpretace výsledků

Výsledné hodnoty lze v přístrojích Lightcycler od Roche zkopírovat do tabulek nebo stáhnout ve formátu PDF. U každé jednotlivé hodnoty je třeba zkontrolovat několik dat:

- Triplikáty:** jsou C_p hodnoty totožné / velmi podobné (ne vyšší než 0,5 cyklu; u vyšších C_p hodnot lze očekávat i vyšší rozptyl)? Pokud je u triplicátů zaznamenán vysoký rozptyl C_p hodnot, značí to špatnou techniku pipetování. Lze je nutno rozhodnout, zda experiment opakovat (lze doporučit v případě, kdy se všechny tři hodnoty výrazně rozcházejí; nebo vyřadit tzv. „outliera“ a průměr spočítat ze zbývajících dvou hodnot).
- Pozitivní kontroly:** Jsou opravdu pozitivní a to pouze pro daný virus? Pokud jsou výsledky negativní, nutno zkontrolovat kvalitu pozitivní kontroly (např. konvenční PCR). Pokud je kvalita pozitivní kontroly potvrzena, nutno zopakovat celý run.
- Negativní kontroly:** Jsou opravdu negativní? Pokud se objeví falešná pozitiva (C_p hodnoty vyšší než 35 lze tolerovat), je nutno toto ověřit jinými technikami – např.

konvenční PCR a popř. zkontrolovat, zda se v laboratoři nevyskytuje kontaminace např. plazmidy s danými inserty).

d) **Načtení jednotlivých vlnových délek měření:** U přístroje Roche se jedná o tzv. Filter Comb, kde lze zaškrtnout detekci pro FAM (465-510); HEX (533-580) a Cy5 (618-680).

e) **Účinnost amplifikace, tzv. efficiency:** Lze ji spočítat vytvořením sériového dilučního ředění. U přístroje Roche stačí zadat při vyplňování vzorků koncentraci jednotlivých ředění a účinnost amplifikace se spočítá sama. Měla by se pohybovat mezi 90 a 110%.

Poté je nutno rozhodnout, která hodnota C_p lze ještě být chápána jako pozitivní výsledek a která jako již negativní. Obvykle jsou hraniční hodnoty okolo 35-40 cyklů. Vhodné je pro každý jednotlivý přístroj a detekovaný virus provést diluční ředění pozitivního vzorku a sledovat, při jakých C_p hodnotách má ještě vypovídající hodnotu a kdy jsou již výsledky nepřesné. Samozřejmě i u této metody existuje tzv. hraniční pole, kdy je nutno výsledky potvrdit/vyvrátit jinou metodou, popř. kombinací jiných metod.

Validace metody

Námi navržené primery byly validovány společně s primery navrženými jinými autory (Fabre et al. 2003; Zhang et al. 2010) na 88 vzorcích obilnin a trav odebraných v různých regionech České republiky. U všech testovaných vzorků bylo podezření na virovou infekci. U 81 vzorků byla virová infekce skutečně potvrzena; u 38 se jednalo o směsné infekce. Validace byla popsána v impaktovaném časopise (Jarosova et al., 2018, in press).

Využití molekulární metod pro monitoring virů obilnin a trav

V České republice je výskyt BYDV a WDV v obilných porostech velmi běžný. Výskyt WSMV narůstá každým rokem na významu a s měnícím se klimatem lze tempo tohoto nárůstu očekávat čím dál vyšší. Jejich včasná detekce je pro metody ochrany plodin, které jsou prakticky založeny na insekticidním ošetření zaměřeném proti vektorům viróz, stěžejním předpokladem.

Metoda qPCR je jednou z nejpresnějších a nejcitlivějších metod, které byly doposud vyvinuty. Metodiky detekce a kvantifikace patogenů pomocí RT-qPCR od roku 1999 přibývají. Jsou rychlejší, přesnější a citlivější v porovnání s tradičně využívanými metodami detekce a

kvantifikace.. Z těchto důvodů jsou využívány pro diagnostiku zemědělských vzorků i pro aplikované účely.



Ekonomické aspekty

Tabulka 3: Finanční náročnost metod detekce virů obilnin.

Metodiky	Potřebné kity	Cena za kit	Cena na analýzu jednoho vzorku	Cena na analýzu jednoho vzorku při detekci tří virů	Cena na analýzu virů v jednom vzorku	Citlivost metody
ELISA*	Sérum (Sediag)	10000 Kč/500 reakcí	40 Kč	40 Kč	120 Kč	
	Destičky (Sediag)	4300 Kč/ 60 destiček/30 jamek	5 Kč	5 Kč	14 Kč	
	Krycí fólie (Sediag)	4 500 Kč / 100 ks	3 Kč	3 Kč	9 Kč	
	Plast+chemikálie		50 Kč	50 Kč	150 Kč	
	CELKEM		98 Kč	98 Kč	293 Kč	*
One-step RT-PCR	Izolace RNA (Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich)	30 780 Kč / 250 vzorků	123 Kč	41 Kč	123 Kč	
	Reverzní transkripce + PCR (QIAGEN One-Step RT-PCR Kit)	11 800 Kč / 200 reakcí à 25 µl	60,00 Kč	60,00 Kč	180,00 Kč	
	Agaróza (LE SeaKemp Lonza)	5 000 Kč / 500 g / cca 1000 gelů/20 vzorků	0,25 Kč	0,25 Kč	0,75 Kč	
	TAE pufr do elektroforézy (Thermo Scientific 50X TAE Buffer)	1 913 Kč/1 l koncentrátu	0,10 Kč	0,10 Kč	0,29 Kč	
	Barvivo SYBR Safe (Thermo Fischer Scientific)	2 315 Kč / 400 µl	0,2 Kč	0,15 Kč	0,45 Kč	
	Gene Ruler 100 bp Plus Ready-to-use (Thermo Fischer Scientific)	1 932 Kč	0,4 Kč	0,40 Kč	0,40 Kč	
	Primery (100 µM)	cca. 350 Kč	0,04 Kč	0,04 Kč	0,12 Kč	
	Plast		50 Kč	50,00 Kč	150,00 Kč	
	CELKEM		234 Kč	152 Kč	455 Kč	**
Two-step RT-PCR	Izolace RNA (Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich)	30 780 Kč / 250 vzorků	123 Kč	41 Kč	123 Kč	
	cDNA přepis (RevertAid First Strand cDNA – ThermoFisher Scientific)	7120 Kč / 133 reakcí à 15 µl	54,00 Kč	18,00 Kč	54,00 Kč	
	Go-Taq 2 Polymerase (Promega)		6,20 Kč	6,20 Kč	18,60 Kč	
	dNTPs 100 mM každý, Promega) – ředění 2,5 mM	5 518 Kč	4,10 Kč	4,10 Kč	12,30 Kč	
	Primery (100 µM)	cca. 350 Kč	0,04 Kč	0,04 Kč	0,12 Kč	
	Agarózový gel (podrobně rozepsáno u One-step RT-PCR)		0,90 Kč	0,90 Kč	3 Kč	
	Plast		50 Kč	50,00 Kč	150 Kč	
PCR (WDV)	CELKEM		243 Kč	120 Kč	361 Kč	**1/2*
	Izolace DNA (GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit Sigma-Aldrich)	35 000 Kč/ 350 vzorků	100 Kč	N.A. (WDV je jediný DNA virus)	N.A. (WDV je jediný DNA virus)	
	RNáza A (4 mg/ml, Promega)	2 169 Kč / 1 ml	6,50 Kč			
	Proteináza K (20 mg/ml, Fisher ThermoScientific)	762 Kč / 1 ml	0,40 Kč			

	Fenol-Chloroform-Izoamylalkohol (Sigma Aldrich)	2 166 Kč / 100 ml	11 Kč		
	Octan sodný (Sigma Aldrich)	1 226 Kč / 250 g	0,30 Kč		
	EtOH Pure	600 Kč / 1 l	1 Kč		
	Go-Taq 2 Polymerase (Promega)		6,20 Kč		
	dNTPs 100 mM každý, Promega) – ředění 2,5 mM	5 518 Kč	4,10 Kč		
	Primery (100 µM)	cca. 350 Kč	0,04 Kč		
	Agarózový gel (podrobně rozepsáno u One-step RT-PCR)		0,90 Kč		
	Plast		50 Kč		
	CELKEM		179 Kč		**1/2*
	SYBR Green I RT-qPCR**				
	Izolace RNA (Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich)	30 780 Kč / 250 vzorků	123 Kč	41 Kč	123 Kč
	qPCR (Lightcycler SybrGreen Master Mix)	12370 Kč / 833 reakcí á 12 µl	91,60 Kč	91,60 Kč	274,80 Kč
	Destička (LightCycler® 480 Multiwell Plate 384, white) včetně folie	13 560 Kč / 50 destiček á 384 jamek	2,10 Kč	2,10 Kč	6,30 Kč
	Primery (100 µM)	cca. 350 Kč	0,04 Kč	0,04 Kč	0,12 Kč
	Plast		50 Kč	50,00 Kč	150 Kč
	CELKEM		267 Kč	185 Kč	554 Kč ***
	Multiplex TaqMan RT-qPCR**				
	Izolace RNA (Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich)	30 780 Kč / 250 vzorků	123 Kč	41,00 Kč	123 Kč
	cDNA přepis (RevertAid First Strand cDNA – ThermoFisher Scientific)	7120 Kč / 133 reakcí á 15 µl	54 Kč	18,00 Kč	54 Kč
	qPCR (Lightcycler Probe Master mix)	12370 Kč / 833 reakcí á 12 µl	45 Kč	45 Kč	15 Kč
	Destička (LightCycler® 480 Multiwell Plate 384, white) včetně folie	13 560 Kč / 50 destiček á 384 jamek	2,10 Kč	2,10 Kč	2,10 Kč
	Primery (100 µM)	1000 Kč / cca 2 ml (na cca 15000 reakcí)	0,04 Kč	0,04 Kč	0,12 Kč
	Sondy (100 µM)	21000 Kč / cca 1 ml (na cca 15000 reakcí)	1,4	1,40 Kč	4,2
	Plast		50,00 Kč	50,00 Kč	50,00 Kč
	Celkem		276 Kč	158 Kč	248 Kč ***

- U metody ELISA se předpokládá použití duplikátů.
- U metody RT-qPCR se předpokládá použití triplikátů.

Z ekonomického hlediska lze spatřit veliký rozdíl v cenách mezi sérologickou metodou ELISA (98Kč na vzorek) a molekulárními metodami (PCR, One step RT-PCR, RT-PCR, RT-qPCR), kde se cena pohybuje mezi 179 Kč pro detekci DNA viru WDV a cca 250 Kč za detekci RNA virů). Vyšší

cenu molekulárních metod lze ospravedlnit jejich výrazně vyšší přesností. Pokud ale chceme v jednom vzorku určit tři různé viry, což je běžná praxe, neboť všechny tři jsou symptomaticky zaměnitelné, nejnižší náklady lze spatřovat u metody multiplex, kdy detekce všech tří virů vychází na 248 Kč v porovnání s 293 Kč za serologickou ELISA metodu. Tento výrazný pokles ceny je způsoben jednotnou přípravou a zpracováním vzorku od izolace až po qPCR.

Metodiky	Cena na analýzu jednoho vzorku	Cena na analýzu jednoho vzorku při detekci tří virů	Cena na analýzu tří virů v jednom vzorku
ELISA	98 Kč	98 Kč	293 Kč
One-step RT-PCR	234 Kč	152 Kč	455 Kč
Two-step RT-PCR	243 Kč	120 Kč	361 Kč
PCR (WDV)	179 Kč	N.A. (WDV je jediný DNA virus)	N.A. (WDV je jediný DNA virus)
SYBR Green I RT-qPCR	267 Kč	185 Kč	554 Kč
Multiplex TaqMan RT-qPCR	276 Kč	128 Kč	248 Kč

Další velkou výhodou metody (RT)-qPCR je rovněž skutečnost, že v jednom běhu přístroje lze analyzovat více vzorků najednou (více než 100 u přístroje s adaptérem na 384 jamkovou destičku), čímž se ušetří čas, peníze, lidská práce i přístroj na provádění analýz. Pokud toto množství vynásobíme 3 viry v multiplex metodě detekce, může na jedné destičce současně docházet k 300 detekcím jednotlivých virů najednou, což výrazně zvyšuje výkonnou kapacitu laboratoře.

Závěr

Monitoring virových chorob obilnin a ostatních zemědělských plodin je důležitou součástí fytopatologických opatření. Při výskytu patogenu v určité oblasti lze přijmout preventivní opatření zabráňujícím epidemickému šíření virů, a tím zabránit vysokým ztrátám na výnosu, které virové choroby způsobují. Je rovněž velmi důležité kontrolovat trvalé travní porosty, které jsou známy jako rezervoáry virových patogenů, a z nichž je možnost přenosu na kulturní plodiny. Tato metodika poskytuje návod na velmi citlivou a přesnou detekci 3 nejčastěji se vyskytujících obilných virů současně, čímž výrazně šetří ekonomiku i časové prostředky dané

laboratoře. Včasná diagnostika je jednou z nejúčinnějších metod prevence výskytu epidemií chorob.

Srovnání „novosti postupů“

V ČR ani ve světě doposud nebyla známa metoda schopná současné detekce tří nejčastějších virů v ČR: BYDV, WDV a WSMV.

Popis uplatnění metodiky

Metodika může sloužit vědeckým pracovníkům ke studijním účelům i pracovníkům státní správy k monitoringu výskytu jednotlivých obilných virů na území ČR i jinde v Evropě. Metodiku lze využít k rutinní detekci BYDV, WDV a WSMV, jakož i k hlubšímu studiu těchto viróz pomocí kvantifikační metody RT-qPCR.

Seznam použité literatury

- Beoni E, Chrpová J, Jarošová J, Kundu JK (2016) Survey of Barley yellow dwarf virus incidence in winter cereal crops, and assessment of wheat and barley resistance to the virus. *Crop and Pasture Science* **67**,. doi:10.1071/CP16167.
- Boonham N, Tomlinson J, Mumford R (2007) Microarrays for Rapid Identification of Plant Viruses 1. *Annu Rev Phytopathol* **45**, 307–328. doi:10.1146/annurev.phyto.45.062806.094349.
- Boonham N, Walsh K, Smith P, Madagan K, Graham I, Barker I (2003) Detection of potato viruses using microarray technology: Towards a generic method for plant viral disease diagnosis. *Journal of Virological Methods* **108**, 181–187. doi:10.1016/S0166-0934(02)00284-7.
- Brakke MK (1971) Wheat streak mosaic virus. *CMI/AAB descriptions of plant viruses* **48**, 1–4.
- Clark MF, Adams AN (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of general virology* **34**, 475–483.
- D’Arcy CJ (1995) Symptomatology and host range of barley yellow dwarf. *Barley yellow dwarf* **40**, 9–28.
- Dedryver C a., Riault G, Tanguy S, Le Gallic JF, Trottet M, Jacquot E (2005) Intra-specific variation and inheritance of BYDV-PAV transmission in the aphid *Sitobion avenae*. *European Journal of Plant Pathology* **111**, 341–354. doi:10.1007/s10658-004-4890-1.
- Dorak MT (2006) ‘Real-time PCR.’ (Taylor & Francis: Abingdon)
- Fabre F, Kervarrec C, Mieuzet L, Riault G, Vialatte A, Jacquot E (2003) Improvement of Barley yellow dwarf virus-PAV detection in single aphids using a fluorescent real time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* **110**, 51–60. doi:10.1016/S0166-0934(03)00097-1.
- French R, Stenger DC (2002) Wheat streak mosaic virus. (Wellesbourne, UK)
- Gadiou S, Kudela O, Ripl J, Rabenstein F, Kundu JK, Glasa M (2009) An amino acid deletion in Wheat streak mosaic virus capsid protein distinguishes a homogeneous group of European isolates and facilitates their specific detection. *Plant disease* **93**, 1209–1213.
- Gadiou S, Ripl J, Jaňourová B, Jarošová J, Kundu JK (2012) Erratum: Real-time PCR assay for the discrimination and quantification of wheat and barley strains of Wheat dwarf virus (Virus Genes (2012) 44 (349-355) DOI: 10.1007/s11262-011-0699-0). *Virus Genes* **45**,. doi:10.1007/s11262-012-0841-7.
- Gachon C, Mingam A, Charrier B (2004) Real-time PCR: what relevance to plant studies? *Journal of experimental botany* **55**, 1445–1454.
- Gray S, Gildow FE (2003) L Uteovirus -a Phid I Nteractions *. *Review Literature And Arts Of The Americas*. doi:10.1146/annurev.phyto.41.012203.105815.
- Heid CA, Stevens J, Livak KL (1996) Real Time quantitative PCR. *Genome Research* **6**, 986–994. doi:10.1101/gr.6.10.986.
- Hunger RL (2010) Wheat streak mosaic virus. *Compendium of wheat diseases and pests*, 3rd edn

APS Press, St Paul 115–117.

- Hunger RM, Sherwood JL, Evans CK, Montana JR (1992) Effects of planting date and inoculation date on severity of wheat streak mosaic in hard red winter wheat cultivars. *Plant Disease* **76**, 1056–1060.
- Chalupníková J, Kundu JK, Singh K, Bartáková P, Beoni E (2017) Wheat streak mosaic virus: incidence in field crops, potential reservoir within grass species and uptake in winter wheat cultivars. *Journal of Integrative Agriculture* **16**, 523–531.
- Izzo MM, Kirkland PD, Gu X, Lele Y, Gunn AA, House JK (2012) Comparison of three diagnostic techniques for detection of rotavirus and coronavirus in calf faeces in Australia. *Australian veterinary journal* **90**, 122–129.
- Jarošová J, Kundu JK (2010) Validation of reference genes as internal control for studying viral infections in cereals by quantitative real-time RT-PCR. *BMC plant biology* **10**, 146. doi:10.1186/1471-2229-10-146.
- Jarošová J, Chrpová J, Šíp V, Kundu JK (2013) A comparative study of the Barley yellow dwarf virus species PAV and PAS: Distribution, accumulation and host resistance. *Plant Pathology* **62**,. doi:10.1111/j.1365-3059.2012.02644.x.
- Jarošová J, Jaňourová B, Kumar J (2009) Metodika molekulární detekce viru žluté zakrslosti ječmene v jeho vektorech pomocí RT-PCR: Metodika pro Státní rostlinolékařskou správu.
- Jarošová J, Rípl J, Fousek J, Kumar J (2018) TaqMan Multiplex Real-Time qPCR assay for the detection of Barley yellow dwarf virus, Wheat dwarf virus and Wheat streak mosaic virus and the study of their interactions. *Crop and pasture science*. In press.
- Kúdela O, Kúdelová M, Nováková S, Glasa M (2008) First report of Wheat streak mosaic virus in Slovakia. *Plant Disease* **92**, 1365.
- Kumar J, Slavíková L, Chalupníková J (2016) 'Virová čárkovitá mozaika pšenice: choroba s narůstajícím významem.' (Výzkumný ústav rostlinné výroby, vvi)
- Kundu JK, Gadiou S, Červená G (2009) Discrimination and genetic diversity of Wheat dwarf virus in the Czech Republic. *Virus genes* **38**, 468–474.
- Kundu JK, Jarošová J, Gadiou S, Červená G (2009) Discrimination of three BYDV species by one-step RT-PCR-RFLP and sequence based methods in cereal plants from the Czech Republic. *Cereal Research Communications* **37**, 541–550. doi:10.1556/CRC.37.2009.4.7.
- Lapierre H, Signoret P-A (2004) 'Viruses and virus diseases of Poaceae (Gramineae).' (Editions Quae)
- Lindsten K, Vacke J (1991) A possible barley adapted strain of wheat dwarf virus (WDV). *Acta phytopathologica et entomologica Hungarica* **26**, 175–180.
- Melcher U, Muthukumar V, Wiley GB, Min BE, Palmer MW, Verchot-Lubicz J, Ali A, Nelson RS, Roe BA, Thapa V (2008) Evidence for novel viruses by analysis of nucleic acids in virus-like particle fractions from *Ambrosia psilostachya*. *Journal of virological methods* **152**, 49–55.
- 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.
- Miller and WA, Rasochová L (1997) Barley Yellow Dwarf Viruses. *Annual Review of*

- Phytopathology* **35**, 167–190. doi:10.1146/annurev.phyto.35.1.167.
- Mullis KB (1990) The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* **262**, 56–61.
- Naidu RA, Hughes J d'A (2003) Methods for the detection of plant virus diseases. *Plant Virology in Sub Saharan Africa* 233–253.
- Ordon F, Habekuss A, Kastirr U, Rabenstein F, Kühne T (2009) Virus resistance in cereals: Sources of resistance, genetics and breeding. *Journal of Phytopathology* **157**, 535–545. doi:10.1111/j.1439-0434.2009.01540.x.
- Oswald JW, Houston BR (1951) A new virus disease of cereals, transmissible by aphids. *Plant Disease Reporter* **11**, 471–475.
- Rastgou M, Khatabi B, Kvarnheden a., Izadpanah K (2005) Relationships of Barley yellow dwarf virus-PAV and Cereal yellow dwarf virus-RPV from Iran with viruses of the family Luteoviridae. *European Journal of Plant Pathology* **113**, 321–326. doi:10.1007/s10658-005-1231-y.
- Ripl J, Kumar J (2008) 'Metodika ochrany obilnin proti viru zakrslosti pšenice a jeho vektoru k ř ísku polnímu Metodika pro státní rostlinoléka ř skou správu.'
- Sabelis MW, Bruin J (1996) 1.5. 3. Evolutionary ecology: Life history patterns, food plant choice and dispersal. *World crop pests* **6**, 329–366.
- Schubert J, Habekuß A, Kazmaier K, Jeske H (2007) Surveying cereal-infecting geminiviruses in Germany—diagnostics and direct sequencing using rolling circle amplification. *Virus research* **127**, 61–70.
- Slykhuis JT (1973) ACERIA TULIPAE KEIFER (ACARINA: ERIOPHYIDAE) IN RELATION TO THE SPREAD OF WHEAT STREAK MOSAIC. *Readings in Insect-plant Disease Relationships* **11**, 394.
- Slykhuis JT, Andrews JE, Pittman UJ (1957) Relation of date of seeding winter wheat in southern Alberta to losses from wheat streak mosaic, root rot, and rust. *Canadian Journal of Plant Science* **37**, 113–127.
- Somsen HW, Sill WH (1970) 'The wheat curl mite, *Aceria tulipae* Keifer, in relation to epidemiology and control of wheat streak mosaic.' (Agricultural Experiment Station)
- Stenger DC, Hall JS, Choi IR, French R (1998) Phylogenetic relationships within the family potyviridae: wheat streak mosaic virus and brome streak mosaic virus are not members of the genus rymovirus. *Phytopathology* **88**, 782–7. doi:10.1094/PHTO.1998.88.8.782.
- Šíp V, Širlová L, Chrpová J (2006) Screening for Barley yellow dwarf virus-resistant barley genotypes by assessment of virus content in inoculated seedlings. *Journal of Phytopathology* **154**, 336–342. doi:10.1111/j.1439-0434.2006.01103.x.
- Vacke J (1961) Wheat dwarf virus disease. *Biologia Plantarum* **3**, 228–233.
- Vacke J (1971) Zakrslost pšenice.
- Vacke J (1972) Host plants range and symptoms of wheat dwarf virus. *Věd Pr Výz Ústavú Rostl Výroby Praha-Ruzyně* **17**, 151–162.
- Vacke J, Cibulka R (1999) Silky bent grass (*Apera spica-venti* [L.] Beauv.)-a new host and reservoir of wheat dwarf virus. *Plant protection science* **35**, 47–50.

- Vacke J, Sip V, Skorpik M (1998) Barley yellow dwarf virus harmfulness on winter barley crops infected at an early growth stage. *Genetika a Slechteni-UZPI (Czech Republic)*.
- Wheelis M (2002) Biotechnology and chemical weapons control. *Pure and applied chemistry* **74**, 2247–2251.
- Zhang X, Zhou G, Wang X (2010) Detection of wheat dwarf virus (WDV) in wheat and vector leafhopper (*Psammotettix alienus* Dahlb.) by real-time PCR. *Journal of virological methods* **169**, 416–419.

Seznam publikací, které předcházely metodice

- Dráb T., Svobodová E., Ripl J., Jarošová J., Rabenstein F., Melcher U., Kundu J. K. 2014. SYBR Green I based RT-qPCR assays for the detection of RNA viruses of cereals and grasses. *Crop and Pasture Science* 65(12): 1323-1328.
- Gadiou S., Kudela O., Ripl J., Rabenstein F., Kundu J. K., Glasa M. 2009. An amino acid deletion in *Wheat streak mosaic virus* capsid protein distinguishes a homogeneous group of European isolates and facilitates their specific detection. *Plant Disease* 93:1209–1213.
- Gadiou S., Ripl J., Jaňourová B., Jarošová J., Kundu J. K. 2012. Real-time PCR assay for the discrimination and quantification of wheat and barley strains of *Wheat dwarf virus*. *Virus Genes* 44(2):349-55
- Chalupníková, J., Kundu, J.K., Singh, K., Bartaková, P., Beoni, E., 2017. Wheat streak mosaic virus: incidence in field crops, potential reservoir within grass species and uptake in winter wheat cultivars. *J. Integr. Agric.* 16, 523–531.
- Jarošová J., Kundu J. K. 2010. Validation of reference genes as internal control for studying viral infections in cereals by quantitative real-time RT-PCR. *BMC Plant Biology* 10: 146
- Jarošová J., Chrpová J., Šíp V., Kundu J. K. 2013. A comparative study of the *Barley yellow dwarf virus* species PAV and PAS: distribution, accumulation and host resistance. *Plant Pathology* 62:436–443.
- Kumar, J., Slavíková, L., Chalupníková, J., 2016. Virová čárkovitá mozaika pšenice: choroba s narůstajícím významem. Výzkumný ústav rostlinné výroby, vvi.
- Kundu J. K., Gadiou S., Červená G. 2009a. Discrimination and genetic diversity of *Wheat dwarf virus* in the Czech Republic. *Virus Genes* 38:468–474.

Kundu J. K., Jarošová J., Gadiou S., Červená G. 2009b. Discrimination of three BYDV species by one-step RT-PCR-RFLP and sequence based methods in cereal plants from the Czech Republic. *Cereal Research Communications* 37:541–550.

Kundu J. K. 2008. First Report of barley yellow dwarf virus- PAS in wheat and barley grown in the Czech Republic. *Plant Dis.* 92 (11): 1587.



(Příznaky čárkovité mozaiky u ozimé pšenice, odrůda Hymack. Foto, J. Kumar, VÚRV v.v.i.)

Název: Metodika detekce tří obilných virů (BYDV, WDV, WSMV) pomocí Multiplex TaqMan RT-qPCR

Autoři: Jarošová J a Kumar J.

Vydal: Výzkumný Ústav Rostlinné Výroby, v.v.i.
Drnovská 507, 16106 Praha 6–Ruzyně

Tisk: 200 ks

Počet stran: 35

Vydání: první

Rok vydání: 2018

ISBN: 978-80-7427-284-4



© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2018