

VIROVÁ ŽLOUTENKA VODNICE



SLAVÍKOVÁ LUCIE

KUMAR JIBAN

VIROVÁ ŽLOUTENKA VODNICE

METODIKA PRO PRAXI



Virová žloutenka vodnice**Autoři:****Ing. Lucie Slavíková ^{1,2}****Ing. Jiban Kumar, Ph.D. ¹****1. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.**

Drnovská 507, Praha 6 – Ruzyně, 161 06

2. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Česká zemědělská univerzita, Kamýcká 129, Praha 6 Suchbát, 165 00

korespondující autor: email: slavikova@vurv.cz

Metodika vznikla za podpory Ministerstva zemědělství, institucionální podpora MZE-RO0418: Udržitelné systémy a technologie pěstování zemědělských plodin pro zlepšení a zkvalitnění produkce potravin, krmiv a surovin v podmínkách měnícího se klimatu.

©Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2020

ISBN: 978-80-7427-337-7

Anotace

Virus žloutenky vodnice, jako významný patogen řepky, je na území České republiky poměrně novým problémem. Infekce způsobená tímto virem je významným, limitujícím faktorem při pěstování řepky ozimé. Poprvé byl jeho výskyt ve větší míře v porostu řepky nalezen v roce 2016, kdy také došlo k silnému přemnožení hlavního přenašeče – mšice broskvoňové.

Tato metodika shrnuje současné poznatky o uvedené chorobě, zaměřuje se na popis, původce, symptomy, výskyt, hostitelský okruh, přenašeče i na možnosti ochrany. Součástí metodiky jsou také diagnostické postupy pomocí sérologické metody DAS – ELISA a molekulární metody RT – PCR. Metodika může sloužit široké zemědělské veřejnosti jako klíč k určení významného řepkového patogenu i jako návod, jak minimalizovat negativní dopady virové infekce řepkového porostu.

Abstract

Turnip yellows virus as a significant pathogen of rapeseed is a relatively new problem in the Czech Republic. The occurrence of the disease is a significant limiting factor in the cultivation of winter rapeseed. The occurrence of turnip yellows virus recorded in rapeseed to a greater extent for the first time in 2016, when there was also a strong incidence of its main vector - the peach aphid.

This methodology summarizes the current knowledge about the disease, focuses on the description, causal agent, symptoms, occurrence, host range, vectors and protection options. The methodology also includes diagnostic procedures using the serological method DAS - ELISA and the molecular method RT - PCR. The methodology can serve in the general agricultural communities as a key to identify the pathogen as well as a guide on how to minimize the negative effects of viral infection of rapeseed.

Oponenti

Mgr. Šárka Linhartová, Ph.D.

Zástupce vedoucí Laboratoře virologie

Odbor diagnostiky škodlivých organismů rostlin

ÚSTŘEDNÍ KONTROLNÍ A ZKUŠEBNÍ ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝ

Šlechtitelů 23/773, Olomouc 9, PSČ 779 00

Mgr. Tomáš Moravec, Ph.D.

Vedoucí laboratoře virologie

Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.

Rozvojová 313, Praha 6 - Lysolaje, Česká republika 165 02

OSVĚDČENÍ

OBSAH

Cíl metodiky	8
Vlastní popis metodiky	9
1. Úvod	9
2. Původ a popis virové žloutenky vodnice	10
3 Přenos viru žloutenky vodnice	11
3.1 Mšice broskvoňová jako hlavní vektor viru žloutenky vodnice	13
3.1.1 Vývoj mšice broskvoňové	14
4. Hostitelé viru žloutenky vodnice	16
5. Příznaky virové žloutenky vodnice	21
6. Poškození porostu a výnosové ztráty způsobené TuYV	23
7. Odrůdová odolnost vůči TuYV	24
8. Výskyt TuYV v České republice	30
9. Diagnostika viru žloutenky vodnice	30
9.1 Detekce TuYV pomocí DAS – ELISA	30
9.2 Detekce viru žloutenky vodnice pomocí RT – PCR	32
9.2.1 Homogenizace vzorků	32
9.2.2 Izolace celkové RNA	33
9.2.3 Měření kvality a koncentrace RNA	36
9.2.4 Syntéza cDNA (reverzní transkripce)	37
9.2.5 Primery pro detekci TuYV v rostlinných vzorcích	37
9.2.6 Amplifikace cDNA (samotná metoda PCR)	38
9.2.7 Elektroforéza a vizualizace amplifikovaných produktů PCR	39
10 Ochranná opatření proti TuYV	42
Srovnání novosti postupů	44
Popis uplatnění metodiky	44
Ekonomické aspekty	44
Seznam použité související literatury	47
Seznam publikací, které předcházely metodice	51

Použitá literatura je dostupná u autorů metodiky

CÍL METODIKY

Cílem metodiky je v ucelené formě předložit zemědělské veřejnosti i dalším odborníkům na problematiku virových chorob řepky, informace týkající se problematiky této choroby. Pozornost je věnována jednak popisu této choroby, příznakům, hostitelskému okruhu, samotným vektorům, způsobům přenosu, diagnostickým metodám, ale také možnostem ochrany. Z ochranných opatření jsou zmíněny možnosti chemické i nechemické, mezi které se řadí především optimalizace termínu setí, agrotechnická opatření, vhodná skladba plodin a volba odolných odrůd. Jednotlivá opatření jsou navrhována vždy s cílem dosažení ekonomické rentability, zdravotní nezávadnosti a s cílem minimalizace negativních dopadů na životní prostředí.

Tato metodika je určena především pro zemědělce a agronomy zabývající se produkcí ozimé řepky.

VLASTNÍ POPIS METODIKY

1. ÚVOD

Řepka ozimá je České republice průměrně pěstována na ploše okolo 400 tisíc hektarů. Tato pěstební plocha je již po dlouhá léta stabilní. Z hlediska zastoupení ve struktuře pěstovaných plodin zaujímá druhé místo, hned po pšenici ozimé. Z hlediska řazení v osevním postupu se jedná o výhodnou předplodinu pro obilniny. Rostliny řepky mají dlouhé, křivité kořeny. Těmi rostliny pronikají do hlubších vrstev půdního profilu a vynášejí na povrch živiny, které jsou pro běžné plodiny nedostupné. Mohutným kulovitým kořenem zajišťují biologickou melioraci půdy a mobilizaci živin a to hlavně fosforu.

Řepku lze úspěšně pěstovat od nížin až do nadmořských výšek kolem 700 m. S nárůstem pěstebních ploch se řepka rozšířila do všech výrobních oblastí ČR, přesto však je hlavní oblast pěstování soustředěna do bramborářských a řepářských oblastí.

Z fyto-sanitárních důvodů pro výskyt celé řady chorob a škůdců není vhodné pěstovat řepku po sobě. Současná praxe pěstování ekonomicky výhodných plodin je však taková, že je řepka do osevního postupu řazena jednou za tři roky, a to ještě nejčastěji po dvou osevech pšenice ozimé. Toto časté řazení do osevního postupu má za následek nárůst výskytu různých škůdců a chorob, včetně virových.

Řepka olejka (*Brassica napus* L. subsp. *napus*) může být s různou intenzitou a škodlivostí napadána 12 virovými patogeny z různých taxonomických rodů. Mezi ekonomicky nejvýznamnější virus řepky však patří virus žloutenky vodnice (Turnip yellows virus, TuYV).

Od 1. prosince 2013 je zakázáno insekticidní moření osiva řepky. Insekticidní moření osiva řepky přípravky na bázi neonikotinoidů (klothianidin, imidakloprid, thiamethoxam a beta – cyfluthrin) poskytovalo v době vzcházení porostů ochranu na několik týdnů. Spektrum účinku bylo široké, mladý porost byl chráněn proti savému i žravému hmyzu. V souvislosti se zákazem

insekticidního moření osiva došlo k nárůstu populací mšice broskvoňové, která má svůj životní cyklus úzce spjat právě s řepkou ozimou. Ta poskytuje potravu mšicím v době, kdy již ostatní porosty jsou odrostlé a jako potrava pro ně nevhodné. V porostech řepky se mšice broskvoňová intenzivně množí, formují se jak partenogenetické, tak sexuální formy mšic a jsou posledním hostitelem před náletem na broskvoně, kde samičky mšic kladou vajíčka.

Šíření mimo porosty řepky je následkem širokého okruhu hostitelů, který zahrnuje velmi vysoký počet plevelných druhů, ale také všechny běžně pěstované druhy brukvovité zeleniny, hořčici, mák, řepu cukrovou, krmnou a mák.

V roce 2016 došlo k silnému přemnožení mšice broskvoňové. S tímto přemnožením také došlo k masivnímu šíření viru žloutenky vodnice v porostech řepky, ale i mimo ně. Právě v roce 2016 byly na řepce ozimé při obhlídkách porostů poprvé spatřeny neobvyklé příznaky. Vzorky z různých oblastí byly dodány do diagnostických laboratoří (i do VÚRV) a již tehdy byla sérologickou metodou ELISA poprvé potvrzena nákaza virovou žloutenkou vodnice.

Od této doby se laboratoř diagnostiky virových patogenů ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v.v.i každoročně zabývá detekcí virových infekcí na vzorcích řepky, ale také na nekulturních hostitelích, protože pochopení vztahů patogen – hostitel jsou pro průběh onemocnění a minimalizaci rizika infekce zcela zásadní.

2. PŮVOD A POPIS VIROVÉ ŽLOUTENKY VODNICE

Virus žloutenky vodnice je patogen, způsobující chorobu – virovou žloutenku vodnice. Je považován za nejvýznamnějšího patogena řepky ozimé, který způsobuje výrazná poškození a výnosové ztráty na produkci řepkového semene. Dříve byl virus žloutenky vodnice ve vzorcích rostlin detekován pod názvem virus západní žloutenky řepy (BWYV – Beet western yellows virus). Sekvence BWYV a TuYV nejsou identické. V případě TuYV se jedná o evropské izoláty, které neinfikují řepu.

TuYV patří do čeledi *Luteoviridae*, rodu *Polerovirus*. Virus má v genomu jednovláčennou pozitivní RNA o délce 5.6–6 kb.

Genom viru obsahuje 6 čtecích rámců (ORF - open reading frames (ORFs), počítáno od 0 do 5. Čtecí rámce ORF 1 a ORF2 jsou tvořeny genomickou RNA a čtecí rámce ORF 3, 4 a 5 subgenomickou RNA. Čtecí rámec ORF 0 kóduje P0 protein zodpovědný za symptomy a hostitelskou specifitu a funguje zároveň jako umlčovací supresor. Čtecí rámce ORF1 a ORF2 kódují protein související s replikací. Obalový protein (coat protein), který je na povrchu viru, jehož hlavní úlohou je ochrana virové částice před degradací, je kódovaný třetím čtecím rámcem – ORF3. ORF 3 je také zodpovědný za infekci, systémové šíření a pohyb virových částic floémem na dlouhé vzdálenosti. Protein hraje klíčovou roli při navázání viru na vektora a při interakci buněčných receptorů. P3 je charakteristický pro celý rod *Polerovirus* (90 % identity celého rodu), změny v jeho sekvenci mohou vyvolat dekapsulaci, která může být pro virus fatální. Rámec ORF 5, vyjádřený jako read-through (RT) protein, hraje klíčovou roli v přenosu mšicemi a je zásadní při pohybu viru na dlouhé vzdálenosti. Ostatní zástupci rodu *Polerovirus* obsahují ještě gen P6, jeho funkce je zatím neznámá, ale u viru žloutenky vodnice identifikován nebyl.

3 PŘENOS VIRU ŽLOUTENKY VODNICE

Virus žloutenky vodnice je přenášen mnoha druhy mšic, hlavním vektorem však je mšice broskvoňová. V tabulce č. 1 je uveden seznam potenciálních vektorů viru žloutenky vodnice. Způsob přenosu viru žloutenky vodnice je cirkulativně perzistentní a nepropagativní. Další způsoby přenosu virové žloutenky vodnice a to ať už přenos mechanický nebo přenos osivem zaznamenán nebyl.

Tabulka č. 1: potenciální přenašeči viru žloutenky vodnice

český název	vědecký název
kyjatka hrachová	<i>Acyrtosiphon pisum</i>
mšice bavlníková	<i>Aphis gossypii</i>
mšice skleníková	<i>Aulacorthum circumflexum</i>

mšice bramborová	<i>Aulacorthum solani</i>
mšice chřestová	<i>Brachycorynella asparagi</i>
mšice zelná	<i>Brevicoryne brassicae</i>
mšice bršlicová	<i>Cavariella aegopodii</i>
kyjatka chryzantémová	<i>Macrosiphoniella sanborni</i>
kyjatka vlčincová	<i>Macrosiphum albifrons</i>
kyjatka zahradní	<i>Macrosiphum euphorbiae</i>
mšice tabáková	<i>Myzus nicotinae</i>
mšice broskvoňová	<i>Myzus persicae</i>
mšice meruzalková	<i>Nasonovia ribisnigri</i>
mšice jahodníková	<i>Pentatrichopus fragaefolii</i>
mšice kukuřičná	<i>Rhopalosiphum Maidis</i>
mšice střemchová	<i>Rhopalosiphum padi</i>
kyjatka osenní	<i>Sitobion avenae</i>



Obrázek 1: mšice zelná je také vektorem viru žloutenky vodnice



Obrázek 2: kolonie mšice broskvoňové na spodní straně listů řepky ozimé

Významným vektorem je také mšice zelná (*Brevicoryne brassicae*) a to zejména proto, že je její životní cyklus s brukvovitými rostlinami úzce spjat. Narozdíl od mšice broskvoňové (teplotní optimum 20 °C) má mšice zelná vyšší teplotní optimum a teploty, které převyšují hranici 30 °C, stimulují intenzivní množení a tedy i zvýšenou intenzitu přenosu viru.

3.1 MŠICE BROSKVOŇOVÁ JAKO HLAVNÍ VEKTOR VIRU ŽLOUTENKY VODNICE

Mšice broskvoňová - *Myzus persicae* má mezi mšicemi výjimečné postavení. Je schopná sát a žít se na širokém rozsahu hostitelských rostlin, který zahrnuje druhy v přibližně 40 rostlinných čeledích, zejména pak *Brassicaceae*, *Solanaceae* a *Asteraceae*. Životní cyklus se značně liší v závislosti na přítomnosti chladných zim. Vývoj může být rychlý, často 10 až 12 dní pro úplnou generaci a s více než 20 generacemi v mírném podnebí. Vývoj

zakladatelek (první partenogenetické populace) začíná brzy na jaře, poté co zimní hostitel – broskvoně překoná dormantní období a začne růst. Vývojovými stádii mšice broskvoňové jsou vajíčka, larvy (nymfy) a dospělci. Mortalita vajíček *M. persicae* je poměrně vysoká. Nymfy, které se líhnou z vajíček, jsou zpočátku nazelenalé, ale velmi rychle žloutnou a začnou se výrazně podobat dospělcům. Dospělci mohou být okřídlení nebo bezkřídlí. To, zda jsou dospělci s křídly nebo bezkřídlí je závislé na kvalitě rostlinného materiálu. Okřídlené formy mají usnadněný pohyb v porostu nebo při přesunu na nové lokality.



Obrázek 3: kolonie mšice broskvoňové na spodní straně listu řepky ozimé

3.1.1. Vývoj mšice broskvoňové

Mšice broskvoňová může mít holocyklický nebo anholocyklický vývoj. Anholocyklické populace zahrnují pouze samice s partenogenetickým rozmnožováním. Řepka ozimá je významným hostitelem pro anholocyklický i holocyklický vývoj. V anholocyklickém vývoji je využívána jako zimní hostitel,

kde ve stádiu dospělého jedinci přezimují. Při holocyklickém vývoji je řepka ozimá poslední rostlinou před nakladením vajíček do kůry broskvoní.

Holocyklické populace *M. persicae* se vytváří na podzim, hlavně v reakci na rostoucí délku noci společně se snižující se kvalitou rostlinného materiálu. V návaznosti na tyto podmínky jsou produkovány smíšené populace samečků a samic, kteří se množí generativně. Okřídlené samice se následně přesouvají z letních hostitelů za účelem nalezení broskvoní. Na nich pak kladou do kůry vajíčka, která jsou tolerantnější k nízkým teplotám než ostatní formy vznikající v průběhu vegetace.

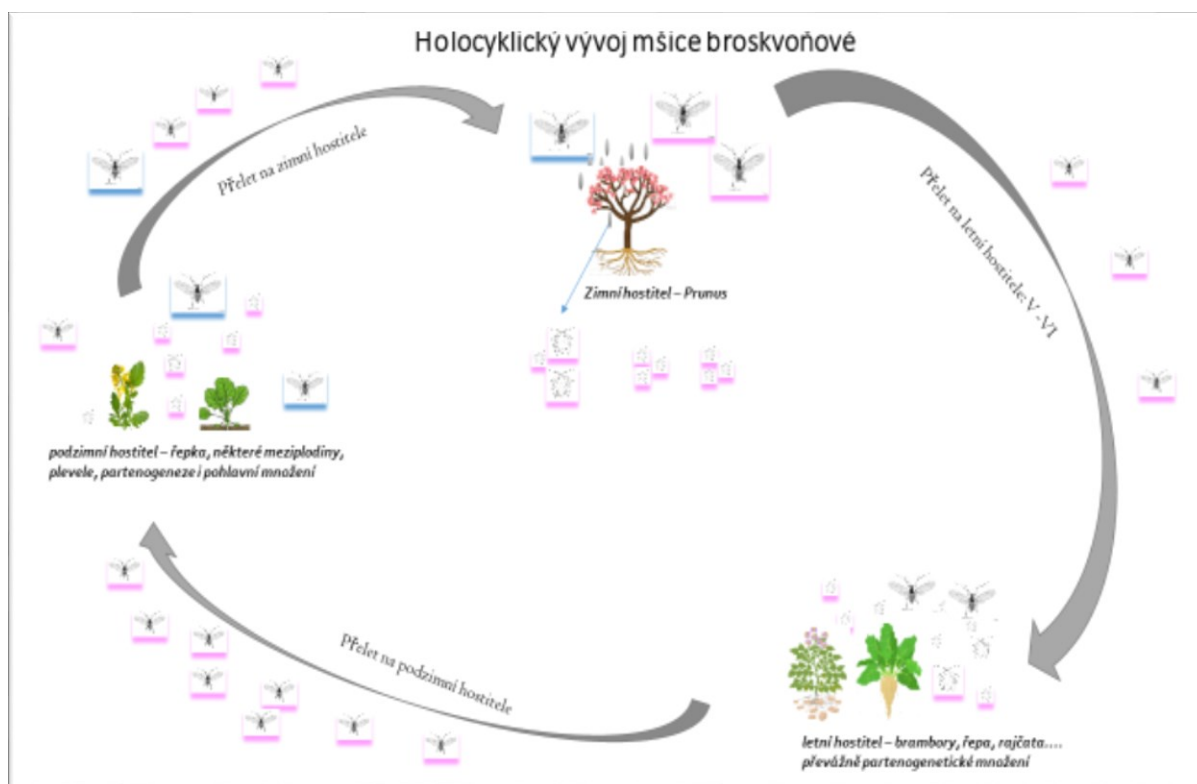


Obrázek 4: mšice broskoňová pod stereomikroskopem

Přezimující aktivní stadia (anholocyklické populace) mají změněnou toleranci k chladu – lépe přežívají mrazové teploty a v porovnání s jedinci vylihnutými z přezimujících vajíček jsou schopni se reprodukovat i při nižších teplotách.

V otázce přezimování jedinců mšice broskvoňové na území České republiky existují mezi entomology rozdílné názory. Prof. Kocourek z VÚRV (ústní sdělení) se hledání anholocyklických populací věnoval celou řadu let, nikdy však přezimující dospělé na území České republiky nenašel. Ale podle údajů z Aphid bulletinu (monitoring letové aktivity mšic, ÚKZÚZ) dochází v

posledních letech k poklesu odchytu samečků v sacích pastech a to je jedním z ukazatelů formování anholocyklie.



Obrázek 5: Holocyklický vývoj zahrnující první 3 populace na zimním hostiteli a následné přelety na letní hostitele (cukrová řepa, brambory, zelinářské porosty) a následný přelet na podzimního hostitele - řepku ozimou. Se zkracující se částí dne, poklesem teplot a zhoršující se kvalitou rostlinné potravy se začínají formovat samčí populace a před nástupem zimy přelétají smíšené populace na broskvoně, kde kladou do kůry broskvoní vajíčka

4. HOSTITELÉ VIRU ŽLOUTENKY VODNICE

Virus žloutenky vodnice má velmi široký okruh hostitelských rostlin mezi dvouděložnými druhy s více než 100 botanickými druhy a 21 rody dvouděložných rostlin. Zahrnuje mnoho botanických čeledí, rostliny brukvovité – *Brassicaceae*, merlíkovité – *Chenopodiaceae*, bobovité – *Fabaceae*, hvězdnicovité – *Asteraceae*, tykvovité – *Cucurbitaceae*, hluchavkovité – *Lamiaceae*, zemědýmiovité – *Fumariaceae*, mákovité – *Papaveraceae*, kopřivovité – *Urticaceae*, violkovité – *Violaceae* a další.

Běžnými hostiteli jsou zástupci polních plodin jako řepka ozimá i jarní, hořčice bílá, hořčice černá, hořčice sareptská, pohanka i mák polní. Seznam experimentálně inokulovaných polních plodin a různých druhů zeleniny je uveden v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2: Experimentální inokulace polních plodin

čeleď	český název	vědecký název	Citace
Brassicaceae	hořčice sareptská	<i>Brassica juncea</i>	Greichen et Rabenstein, 1996
	řepka olejka	<i>Brasica napus</i> ssp. <i>napus</i>	Stevens et al., 1994
	tuřín	<i>Brassica napus</i> ssp. <i>rapifera</i>	Greichen et Rabenstein, 1996
	kadeřávek	<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>acephala</i>	Stevens et al., 1994
	čínské zelí	<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>alboglabra</i>	Greichen et Rabenstein, 1996
	květák	<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>botrytis</i>	Stevens et al., 1994
	zelí	<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>capitata</i>	Stevens et al., 1994
	růžičková kapusta	<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>gemmifera</i>	Stevens et al., 1994
	kedlubna	<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>gongylodes</i>	Greichen et Rabenstein, 1996
	brokolice	<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>italica</i>	Stevens et al., 1994
	hlávková kapusta	<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>sabauda</i>	Greichen et Rabenstein, 1996
	pak choi	<i>Brassica rapa</i> ssp. <i>chinensis</i>	
	tat soi	<i>Brassica rapa</i> ssp. <i>narinosa</i>	
	řepice olejná	<i>Brassica rapa</i> ssp. <i>oleifera</i>	

	choi sum	<i>Brassica rapa</i> ssp. <i>parachinensis</i>	
	pekingské zelí	<i>Brassica rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i>	
	komatsuna	<i>Brassica rapa</i> ssp. <i>perviridis</i>	
	vodnice	<i>Brassica rapa</i> ssp. <i>rapifera</i>	
	řeřicha setá	<i>Lepidium sativum</i>	
	ředkev setá černá	<i>Raphanus sativus</i> var. <i>niger</i>	
	ředkev setá olejná	<i>Raphanus sativus</i> var. <i>oleiformis</i>	
	ředkvička	<i>Raphanus sativus</i> var. <i>sativus</i>	
	hořčice bílá	<i>Sinapis alba</i>	
<i>Chenopodiaceae</i>	špenát setý	<i>Spinacea oleraceae</i>	Walkey et Pink, 1990
<i>Asteraceae</i>	locika setá (salát)	<i>Lactuca sativa</i>	
<i>Fabaceae</i>	cizrna	<i>Cicer arietinum</i>	Greichen et Rabenstein, 1996
	lupina bílá	<i>Lupinus albus</i>	
	hrách setý	<i>Pisum sativum</i>	
	bob obecný	<i>Vicia faba</i>	

Studiu a detekci planých a plevelných rezervoárů viru žloutenky vodnice byla v předchozích pracích věnována velká pozornost. Rozsáhlý přehled detekovaných druhů je uveden v tabulce číslo 3.

Tabulka č. 3: přirození hostitelé viru žloutenky vodnice

čeleď	český název	vědecký název	citace
<i>Asteraceae</i> - hvězdnicovité	rmen smrdutý	<i>Anthemis cotula</i>	Hampton et al., 1998
	pcháč obecný	<i>Cirsium arvense</i>	
	řebříček obecný	<i>Achillea millefolium</i>	Polák et Májková, 1992
	Turanka	<i>Conyza</i> spp.	Coutts et al., 2006

	pampeliška lékařská	<i>Taraxacum officinalis</i>	Polák et Majkova, 1992
	ostálka	<i>Zinia peruviana</i>	Graichen et Rabenstein, 1996
	kopretina osenní	<i>Chrysanthemum segetum</i>	
	starček obecný	<i>Senecio vulgaris</i>	Hampton et al., 1998, Stevens et al., 1994
	heřmánkovec nevonný	<i>Matricaria perforata</i>	Polák et Majkova, 1992
<i>Brassicaceae</i> - brukvovité	huseníček rolní	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Graichen et Rabenstein, 1996, Hampton et al., 1998
	kokoška pastuší tobolka	<i>Capsella bursa – pastoris</i>	Hampton et al., 1998
	lnička setá	<i>Camelina sativa</i>	Graichen et Rabenstein, 1996
	řeřicha chlumní	<i>Lepidium campestre</i>	
	řeřicha rumní	<i>Lepidium rudemale</i>	
	ředkev ohnice	<i>Raphanus raphanistrum</i>	Shahraeen, 2012, Stevens et al., 1994, Coutts et al., 2006
	vesnovka obecná	<i>Cardaria draba</i>	Polák et Majkova, 1992
	penízek rolní	<i>Thlaspi arvense</i>	Graichen et Rabenstein, 1996
	hořčice rolní	<i>Sinapis arvensis</i>	
<i>Caryophyllaceae</i> - hvozdíkovité	ptačinec prostřední	<i>Stellaria media</i>	Timmerman et al., 1985, Stevens et al., 1994
	kolenec rolní	<i>Spergula arvensis</i>	Stevens et al., 1994
<i>Cucurbitaceae</i> - tykvovité	meloun vodní	<i>Citrulus lanatus</i>	Coutts et al., 2006
<i>Fumariaceae</i> - zemědým zemědým vité	zemědým lékařský	<i>Fumaria officinalis</i>	Graichen et Rabenstein, 1996
<i>Hydrophyllaceae</i> - stružkovcovité	svazenka vratičolistá	<i>Phacelia tanacetifolia</i>	

<i>Lamiaceae</i> - hluchavkovité	hluchavka objímavá	<i>Lamium amplexicaule</i>	
	hluchavka nachová	<i>Lamium purpureum</i>	Stevens et al., 1994
<i>Convolvulaceae</i> - svlačcovité	povíjnice	<i>Ipomea pandurata</i>	Timmerman et al., 1985
<i>Amaranthaceae</i> - laskavcovité	laskavec žmindovitý	<i>Amaranthus blitoides</i>	Hampton et al., 1998
	laskavec ohnutý	<i>Amaranthus retroflexus</i>	Timmerman et al., 1985; Graichen et Rabenstein, 1996
	laskavec povellův	<i>Amaranthus powelii</i>	Hampton et al., 1998
<i>Portulacaceae</i> – šruchovité	šrucha zelná	<i>Portulaca oleraceae</i>	Timmerman et al., 1985
<i>Polygonaceae</i> - rdesnovité	rdesno pensylvánské	<i>Polygonum pensylvanicum</i>	Timmerman et al., 1985
	opletka obecná	<i>Fagopyrum convolvulus</i>	Graichen et Rabenstein, 1996
<i>Geraniaceae</i> - kakostovité	kakost dlanitosečný	<i>Geranium dissectum</i>	
	pumpava obecná	<i>Erodium cicutarium</i>	
<i>Fabaceae</i> - bobovité	jetel podzemní	<i>Trifolium subterraneum</i>	Hampton et al., 1998
	vlčí bob	<i>Lupinus luteus</i>	Graichen et Rabenstein, 1996
	jetel zvrácený	<i>Trifolium resupinatum</i>	
	jetel luční	<i>Trifolium pratense</i>	Hampton et al., 1998
<i>Chenopodiaceae</i> - merlíkovité	lebeda rozkladitá	<i>Atriplex patula</i>	Stevens et al., 1994
	merlík bílý	<i>Chenopodium album</i>	Moreno et al., 2004

<i>Violaceae</i> - violkovité	violka rolní	<i>Viola arvensis</i>	Stevens et al., 1994
<i>Urticaceae</i> - kopřivovité	kopřiva žahavka	<i>Urtica urens</i>	
<i>Primulaceae</i> - prvosenkovité	drchnička rolní	<i>Anagalis arvensis</i>	
<i>Papaveraceae</i> - makovité	mák vlčí	<i>Papaver rhoeas</i>	
<i>Boraginaceae</i> - brutnákovité	kostival lékařský	<i>Symphytum officinale</i>	Polák et Májková, 1992
<i>Plantaginaceae</i> - jitrocelovité	rozrazil břečťanolistý	<i>Veronica hederifolia</i>	
<i>Polemoniaceae</i> - jirnicovité	nemá český název	<i>Navarretia squarrosa</i>	Coutts et al., 2006
<i>Solanaceae</i> - lilkovité	lilek černý	<i>Solanum nigrum</i>	

5. PŘÍZNAKY VIROVÉ ŽLOUTENKY VODNICE

Symptomy infekce TuYV nejsou často jednoznačné a mnohdy bývají zaměňovány s nedostatečností ve výživě porostů anebo jsou přičítány různým fyziologickým poruchám. Hlavními příznaky jsou však růstové zakrslosti, červenání starších listů, antokyanové zbarvení na bázi listové růžice, na okrajích listů, ale i na celé ploše listů, různé nekrózy na listech, listové mozaiky, vybělení žilek, pokroucení listů, opožděné nakvétání, nedostatečně vyvinuté květy či jejich nižší násada a s tím spojený nižší počet šešulí a odlišný počet semen oproti viruprostým rostlinám. Na projevy a dopady infekce virem TuYV má vliv celá řada faktorů.

Významným faktorem v symptomatických projevech je konkrétní druh hostitelské rostliny, protože každá rostlina na infekci TuYV reaguje jinak. Například starší listy u kokošky pastuší tobolek jsou celé žluté, zatímco u zdrojovky (*Montia perfoliata*) jsou červené. Výrazné příznaky infekce vykazují některé brukvovité plevely jako například hořčice rolní a ředkev ohnice.

Naopak příznaky infekce jsou téměř neznatelné u pryšce kolovratce, nebo mléče. V České republice nejsou doposud zpracované údaje o dopadech infekce, protože se na našem území jedná o poměrně nový problém. Poprvé byly porosty řepky s neobvyklými symptomy zaznamenány na podzim roku 2016.



Obrázek 6: projevy infekce TuYV u penízku rolníku jsou patrné na starších listech



Obrázek 7: příznaky žloutenky vodnice na listech řepky v jarním období

Ačkoliv jsou příznaky infekce virovou žloutenkou vodnice variabilní, mezi hlavní příznaky patří mozaikové symptomy, žloutnutí listů, červenání listů na bázi listové růžice, mezižilkové žloutnutí a červenání.



Obrázek 8: příznaky žloutenky vodnice na listech řepky

6. POŠKOZENÍ POROSTU A VÝNOSOVÉ ZTRÁTY ZPŮSOBENÉ TuYV

Míra poškození porostů vlivem infekce TuYV je velmi variabilní. Závažnost poškození porostu závisí na době, kdy k samotné infekci dojde. Obecně platí, že pokud je porost infikován brzy po vzejití, dopady infekce jsou větší. V České republice nejsou doposud zpracované údaje o dopadech infekce, protože se na našem území jedná o poměrně nový problém. Poprvé byly porosty řepky s neobvyklými symptomy zaznamenány na podzim roku 2016.

V okolních zemích jsou však s infekcemi virovou žloutenkou vodnice větší zkušenosti. V Německu bylo během experimentu zjištěno, že infikované

rostliny měly výnos semene nižší v rozmezí 12–34 % oproti neinfikovaným rostlinám. V Austrálii jsou dopady infekce TuYV mnohem závažnější. Jones et al. (2007) uvádí, že virus byl zjištěn na 97 % pěstovaných ploch a ztráty na výnosu dosahovaly až 46 %. Závažné ztráty na produkci řepkového semene v Austrálii jsou připisovány několika faktorům. Vlivem infekce mají šešule méně semen a jsou dále sniženy kvalitativní aspekty produkce. Řepkové semeno má o 3 % nižší olejnatost a vyšší obsah kyseliny erukové, což hodnotu semene snižuje. Smith et Hinckes (1985) uvádějí výsledky nádobového pokusu s infekcí TuYV. Pokus, kde byly všechny rostliny infikovány (100% infekce) byly porovnávány s pokusem, kde bylo infikováno 18 % rostlin. Rostliny se 100% infekčním poměrem měly o 10 % méně semen, o 13,4 % nižší olejnatost a snížení výnosu se v propočtu na hektar rovnalo propadu 0,3 tuny.

Míra napadení rostlin v porostu však nemusí vždy odpovídat výnosovým ztrátám, neboť existuje variabilita v kompenzačních schopnostech jednotlivých odrůd.



Obrázek 9: rozdíly v růstu u náchylné odrůdy k TuYV, vlevo infikovaná varianta, vpravo kontrola.

7. ODRŮDOVÁ ODOLNOST A REZISTENCE VŮČI TuYV

Mezi jednotlivými odrůdami řepky existuje poměrně velká variabilita v projevech a dopadech infekce virem žloutenky vodnice. Odrůdové zkoušení

však není primárně zaměřeno na odolnost vůči tomuto viru. Do určité míry jsou symptomy infekce TuYV hodnoceny, ale jednotlivé infekce probíhají zcela přirozeně - náletem mšic. Inokulace TuYV není tedy 100%, a pro všechny odrůdy neproběhne ve stejný čas.

Ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v.v.i. se v rámci výzkumu virových chorob řepky zaměřujeme mimo jiné také na testování odolnosti jednotlivých odrůd vůči TuYV. Výzkum byl nedávno zahájen a nyní máme k dispozici výsledky z prvního hodnocení. Do prvotního testování bylo zařazeno 13 odrůd, které jsou v Seznamu doporučeným odrůd pro Českou republiku. Tyto odrůdy byly ve stádiu 3–4 pravých listů uměle inokulovány vironosnými mšicemi, po týdnu byly rostliny insekticidně ošetřeny a dále v pravidelných rozestupech sledovány a hodnoceny. Pro fenotypové hodnocení bylo využito vizuální hodnocení, které se používá i v odrůdových pokusech pro SDO: 9 = zcela nepoškozeno, 1 = vysoce poškozeno.

Mezi jednotlivými odrůdami jsou velké rozdíly v symptomatických projevech. Dále byly z jednotlivých odrůd odebrány listy pro analýzu titru TuYV. První výsledky dopadly velmi dobře. U genotypového i fenotypového hodnocení bylo dosaženo shody a v případě 2 vysoce fenotypově odolných odrůd došlo také k určení nejnižšího titru viru. Na osivářském trhu jsou k dispozici také rezistentní odrůdy (obsahující gen rezistence R54), a to například Temptation (Rapool), Angelica (Saatbau) a Aniston (BOR).



Obrázek 10: odrůda Sidney v jarovizační komoře, vlevo infikovaná varianta, vpravo kontrolní varianta



Obrázek 11: porovnání jednotlivých variant mezi náchylnou a odolnou odrůdou. Vlevo odrůda náchylná k TuYV, dole neinfikovaná kontrola. Snímek vpravo odrůda s odolností vůči TuYV



Obrázek 12: náchylná odrůda řepky ozimé inokulována TuYV (nahore) a neošetřená kontrola (dole)



Obrázek 13: Odrůdový skleníkový pokus prováděný ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v.v.i.



Obrázek 14: izolát TuYV s mšicí broskvoňovou pro následnou inokulaci, rostliny jsou drženy pod izolačním síťovým krytem

8. VÝSKYT VIRU ŽLOUTENKY VODNICE V ČESKÉ REPUBLICE

Vzhledem k rozsahu pěstování řepky ozimé jako hlavního hostitele viru napříč pěstitelskými oblastmi se výskyt viru nedá ohraničit. V rámci monitoringu byly detekovány pozitivní nálezy z Českomoravské vysočiny, jižních Čech, okolo Karlovarska, Příbramska, Písecka, Kladenska, Mělnicka dokonce máme několik vzorků ze Slovenska. Virus žloutenky vodnice je kosmopolitní do té míry, do které je kosmopolitní jeho hlavní vektor – mšice broskvoňová.

Lze však s poměrně vysokou spolehlivostí tvrdit, že jarní infekce ozimé řepky mšicí broskvoňovou v podmínkách holocyklického vývoje je nepravděpodobná.

Brukvovité porosty jařin přesto mohou být virem žloutenky vodnice infikovány. Během monitoringu virových chorob řepky, prováděném ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v.v.i., bylo na přítomnost viru testováno několik vzorků hořčice bílé, seté na jaře jako hlavní plodina. U stejného porostu byla přítomnost TuYV potvrzena také u plevelů: úhorníku mnohodílného a penízku rolního. Infekci těchto jarních porostů s největší pravděpodobností zajišťuje jiný přenašeč, protože mšice broskvoňová v době vzcházení a raného vývoje jarních brukvovitých rostlin tvoří ještě partenogenetické populace na broskvoních.

Společně s hořčicí jsou virovou infekcí ohroženy také porosty jarních řepek, ale výměra jejího pěstování je v České republice nízká (cca 10 tis. ha).

9. DIAGNOSTIKA VIRU ŽLOUTENKY VODNICE

9.1 DETEKCE ŽLOUTENKY VODNICE POMOCÍ DAS-ELISA

Pro detekci viru žloutenky vodnice je využíván systém DAS – ELISA (Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immuno Sorbent Asssay). V laboratoři VÚRV se pro detekci TuYV používají kity od firmy SEDIAG (určené pro detekci TuYV/BWYV – viru západní žloutenky řepy: Beet western yellows virus).

Součástí sérologického kitu jsou následující pufrы:

Potahovací pufr: pH 9,6

V 1000 ml rozpustit 1,59 g Na_2CO_3 + 2,93 g NaHCO_3 + 0,2 g NaN_3 + 5 mg Bromocresol purpure

Promývací pufr: pH 7,4

Do 1000 ml pufru PBS přidat 0,5 ml Tween20

Extrakční pufr: pH 7,3

V 1000 ml pufru PBS 1X se rozpustí 10 g PVP (MW 10000-40000) a 0,5 ml Tween 20)

Konjugační pufr: pH 7,4

V 1000 ml pufru PBS-T se rozpustí 2 g BSA a 40 mg roztok Congo red

PBS pufr: pH 7,4

V 1000 ml destilované vody rozpustit 8 g NaCl + 2,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ + 0,2 g KH_2PO_4 + 0,2 g KCl + 0,2 g NaN_3

Substrátový (pNPP) pufr: pH 9,8

V 1000 ml destilované vody rozpustit 97 ml roztok Diethanolamine a 0,2 g NaN_3

Pracovní postup zahrnuje následující kroky:

1. Potahové protilátky rozpustit v potahovacím pufru podle návodu výrobce kitu. Promíchat a nanést 100 μl do každé jamky. Inkubovat 2 hod při 37 °C.
2. Desky třikrát promýt promývacím pufrem.
3. Homogenizovat 1 g vzorku v 10 ml extrakčního pufru. Nanést 100 μl do každé jamky. Inkubovat po dobu 16 hod (přes noc) při 4°C.
4. Desky třikrát promýt promývacím pufrem.
5. Naředit konjugát protilátek s alkalickou fosfatázou v konjugačním pufru dle návodu výrobce.
6. Desky třikrát promýt promývacím pufrem.
7. Rozpustit 1 mg pNPP/1 ml substrátového pufru těsně před použitím. Promíchat a nanést 100 μl do každé jamky. Inkubovat při teplotě 37 °C ve tmě, kde dochází ke zbarvení obsahu jamky v důsledku reakce enzym (komplex protilátek s fosfatázou) - substrát.

Vyhodnocení výsledků sérologické metody ELISA

Hodnocení výsledků se provádí měřením absorbance vzorku (intenzity zbarvení) na spektrofotometru (TECAN) při vlnové délce 450 nm (1 a 2 hodiny od nanesení substrátu). Naměřená hodnota absorbance v jamkách s kontrolním sérem (dodaným výrobcem kitu) pro pozitivní a negativní kontrolu vymezuje rozhraní negativity a positivity. Hodnocení výsledků analýzy se provádí na základě výpočtu hraniční hodnoty absorbancí negativních kontrol. Nejprve se vypočítá průměrná absorbance negativní kontroly (**X**) a její směrodatná odchylka (**s**). Pro stanovení pozitivního vzorku je potřeba vypočítat prahovou hodnotu negativní kontroly (vzorku) (**A_p**) a to vzorcem: **A_p = X + 3 x s**.

Absorbance vzorku, která je nižší, než je hodnota **A_p** se považuje za negativní. Absorbance vzorku, která je vyšší než **A_p** a nižší než její přibližný dvojnásobek se považuje za sporný výsledek. Vzorky mající hodnotu absorbance přibližně dvakrát vyšší než je hodnota **A_p** jsou hodnoceny jako pozitivní.

9.2 DETEKCE VIRU ŽLOUTENKY VODNICE POMOCÍ RT-PCR

Vzhledem k tomu, že virus žloutenky vodnice je RNA virus, je pro detekci přítomnosti viru v rostlinných vzorcích nutné použít RT-PCR. Detekce TuYV probíhá v několika navzájem navazujících krocích, jakými jsou izolace celkové RNA, syntéza cDNA (reverzní transkripce), amplifikace cDNA (PCR), elektroforetická separace amplifikovaných PCR produktů a vizualizace amplifikovaných produktů PCR (barvením Syber Green).

9.2.1 Homogenizace vzorků

Pro izolaci RNA je potřeba 0,1 g rostlinného pletiva. Vzorky se homogenizují v tekutém dusíku. U vzorků uchovávaných při -80 °C je potřeba dbát na to, aby nedošlo k jejich rozmrazení. Mikrozkušavky je také možno předmrazit krátkým ponořením do tekutého dusíku. Je velmi důležité nepřesáhnout danou hmotnost pletiva, neboť u kolonkových metod izolace nukleových

kyselin dochází v tomto případě ke sníženému výtěžku i kvality nukleových kyselin.

9.2.2 Izolace celkové RNA

Existuje několik způsobů izolace RNA. V laboratoři VÚRV, v.v.i. se RNA ze vzorků řepky izoluje 2 způsoby: tzv. kolonkovým způsobem izolace a pomocí RNA Blue.

• Izolace RNA kolonkovým způsobem

Tato izolační metoda je založena na principu, že nukleové kyseliny v přítomnosti tzv. chaotropních solí přilnou k silikátovému povrchu. Výhodou metody založené na adsorpci na silikát je rychlost a jednoduchost, proto jsou na ní založeny komerční soupravy (kity) pro rutinní extrakce RNA. Kity jsou optimalizovány pro použití na konkrétní typ a množství vzorku a poskytují standardizované výsledky. Snadnost použití kitů je dále zvýšena tím, že obvykle používají nástavce do mikrozku mávek, obsahující jemný filtr, který zadrží silikátové částice. Zpracování pak probíhá tak, že jsou roztoky promývány přes kolonku (filtr se zachycenými částicemi). Namísto tradičního silikátu se u kitů často využívá speciálních pryskyřic, které mají různě upravené složení pufrů tak, že např. preferují při adsorpci molekuly nukleové kyseliny určitého velikostního rozpětí.

Celková RNA byla izolována komerční soupravou Spectrum™ Plant Total RNA Kit od firmy Sigma. Protokol izolace RNA zahrnuje několik navazujících kroků:

Lyzace:

1. Předem si nachystat směs lyzačního pufru s 2 -mercaptoetanolem (na každý vzorek je zapotřebí 500 µl Lysis solution a 5 µl 2-ME)
2. Předem si nachystat mikrozku mávky s kolonkou s modrým kroužkem (Filtration column), s kolonkou s červeným kroužkem (Binding column) a další dvě mikrozku mávky bez kolonek.

3. Do homogenizovaného vzorku (0,1 g) napipetovat 500 µl lyzačního roztoku předem namíchaného s 2-mercaptoethanolem a 2 minuty vortexovat.

Přečištění-filtrace:

4. vzorky vložit do vodní lázně a inkubovat 5 min při 56 °C. Centrifugovat 3 minuty 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 odstranit a připipetovat po 500 µl Binding solution, zvortexovat a 700 µl napipetovat na Binding column. To provést postupně se všemi vzorky.

7. Poté kolonky centrifugovat 1 min při 14000 g. 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.

Poslední dva kroky se dvakrát opakují.

13. Do kolonky znovu napipetovat 500 µl Wash Solution 2 a centrifugovat 30 s při 14000 rpm.

Vypláchnutí RNA z kolonky

18. Přendat kolonku do nové mikrozkuhavky a centrifugovat 1 min při 14000 rpm, aby se kolonka vysušila.

19. Poté kolonku vyjmout a vložit opatrně do nové popsané 2 ml mikrozkuhavky (v 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 mikrozkuhavky a zahodit ji.

20. Změřit koncentraci RNA.

- **Izolace RNA pomocí RNA Blue (Top – Bio)**

Požadované reagens:

chloroform

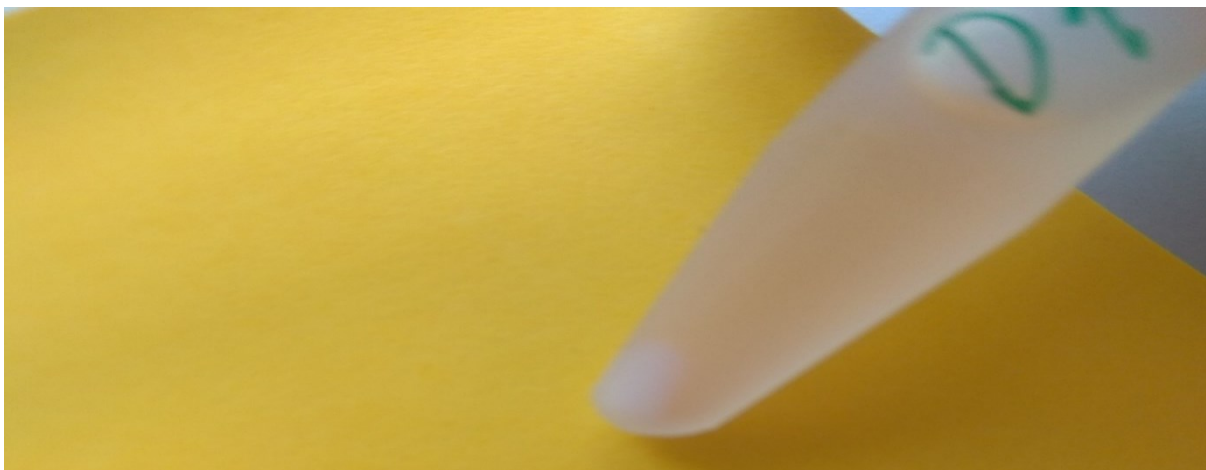
isopropylalkohol

voda, zbavená RNáz

75% ethanol ve vodě, bez RNáz

Homogenizace buněk a fázová separace: k 100 mg rostlinného homogenátu je přidáno 1 ml RNA Blue. Inkubace probíhá 5 min při pokojové teplotě, aby došlo ke kompletnímu rozvolnění nukleoproteinového komplexu. K inkubovanému homogenátu se přidá 0,2 ml chloroformu, zkuhavka se uzavře, 15 sek. třepe na třepačce a inkubuje 15 min. při pokojové teplotě. Poté je vzorek centrifugován při 12 000 rpm, 10 min, 4°C. Po centrifugaci je vzorek separován na horní bezbarvou vodní fázi, interfázi a modrou organickou fázi. RNA se nachází výhradně ve vodní fázi, která představuje asi 60 % objemu RNA Blue reagens použitého pro homogenizaci.

Precipitace RNA: vodní fáze je přenesena do nové zkuhavky a RNA je precipitována přidáním isopropylalkoholu (0,5 ml na 1 ml RNA Blue použitého pro homogenizaci). Vzorek je inkubován 10 min při pokojové teplotě a poté centrifugován při 12 000 rpm, 8 min, 4°C. RNA se nachází na dně a po stranách zkuhavky.



Obrázek 15: pelet RNA při izolaci pomocí RNABlue

Promývání: po odstranění supernatantu se k sedimentu RNA přidá 1 ml 75% etanolu, důkladně se protřepe a RNA sedimentuje centrifugací (7 500 rpm) 5 min při 4 – 25 °C. Pokud má pelet tendenci plavat, centrifuguje se na vyšší otáčky (12 000 rpm)

Rozpuštění RNA: po odstranění supernatantu se vzorek vysuší na vzduchu 5 - 10 min. Důležité je, aby nedošlo k přesušení vzorku, které by snížilo rozpustnost RNA. RNA se rozpustí v PCR Ultra H₂O. Pipetování pomocí pipetovací špičky a zahrnutí na 55 - 60°C napomáhá rozpuštění RNA.

9.2.3 Měření kvality a koncentrace RNA

Kvalita izolované RNA se měří spektrofotometricky (např. NanoDrop2000, ThermoScientific, USA). Měří se při vlnových délkách 260, 230 a 280 nm. Hodnoty naměřené přístrojem při těchto vlnových délkách umožní hodnocení čistoty vzorku. Očekávané poměry pro RNA jsou 2,0. Poměr absorbancí 260/280 menší než 1,75 svědčí pro obsah kontaminujících bílkovin. Absorbance při 230 nm značí nečistoty, jako jsou sacharidy, fenolické sloučeniny nebo aromatické složky. Při výpočtu koncentrace optická hustota 1 odpovídá přibližně 40 mg/l pro RNA.

9.2.4 Syntéza cDNA (reverzní transkripce)

cDNA se syntetizuje za použití komerčně dodávaného kitu pro reverzní transkripci (Thermo Scientific, RevertAid first strand cDNA synthesis).

reagencie:

4 µl 5 X reakční pufr RevertAid RT

1 µl RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl)

1 µl RevertAid M – MuLV reverzní transkriptázu (200 U/µl)

2 µl 10mM dNTP Mix

1 µl Oligo dT primer (nebo specifický Reverse primer), koncentrace 10µM

X µl RNA (X=optimální koncentrace ≥1000 ng/µl RNA, při nižší koncentraci je potřeba použité množství RNA upravit).

Výsledný objem reakce je 20 µl a do tohoto objemu je vzorek doplněn vodou zbavenou nukleázy (dH₂O).

Reakce probíhá v termocycleru za následujících podmínek: inkubace při teplotě 42 °C po dobu 1 hodiny, zastavení reakce zahříváním na teplotu 70 °C po dobu 10 minut a následným ochlazením na ledu.

9.2.5 Primery pro detekci TuYV v rostlinných vzorcích

Pro detekci viru žloutenky ve vzorcích kulturních, plevelných i planých rostlin byly v laboratoři virologie ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v.v.i. navrženy specifické primery pro detekci viru žloutenky vodnice odvozené od genu obalového proteinu, jejichž sekvence jsou uvedené v tabulce 4.

Tabulka 4: primery využívané pro detekci TuYV

název primeru	Sekvence	velikost (bp)	pozice nukleotidů	virové geny	Zdroj
Sense	GCTCTAGAATTGTTAATGARTACGGTCTG	611	skupina pro poleroviry	CP	Abraham et al., 2006
Antisense	CACGCGTCIACCTATTIGGRTTITG				
TuYVF-K1	TACGGTCGTGGGTAGGAGAA	185	3520-3539	CP	vlastní navržené primery
TuYVR-K1	TCGAACCTGCTCCTCTGGTA		3709-3721		

Specifičnost produktu byla ověřena velikostí výsledného fragmentu při elektroforetické separaci a zároveň byla ověřována sekvenací výsledného PCR produktu konkrétní reakce. Získané sekvence analyzovaného PCR produktu byly porovnávány s databází NCBI pomocí programu BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) s již známými sekvencemi TuYV.

9.2.6 Amplifikace cDNA (samotná metoda PCR)

reagencie

7 µl ddH₂O

9 µl DreamTaq Green PCR master mix 2X (složený z DreamTaq™ DNA polymerase, DreamTaq Green buffer, MgCl₂ a dNTPs)

2 µl genově specifických primerů (1 µl sense „F“ a antisense „R“), koncentrace 10 µM

2 µl cDNA příslušného vzorku

Princip reakce: amplifikace cDNA probíhá v opakujících se cyklech: Denaturace (zahřátí na vysokou teplotu, při které dochází k rozvolnění vláken nukleových kyselin)

annealing – pokles teploty a nasedání specifických primerů a syntéza nových řetězců.

Při PCR dochází k namnožení úseku DNA na principu replikace nukleových kyselin. Úseky DNA, které se mají namnožit (amplifikovat), jsou na obou koncích vymezeny primery (krátkými oligonukleotidy DNA)

Reakce v termocycleru za následujících podmínek: počáteční denaturace při 95 °C po dobu 5 minut, následuje 34 amplifikačních cyklů: 95 °C na 30 s; 55 °C na 20 s; a 72 °C na 20 s a konečné prodloužení při 72 °C po dobu 5 min.



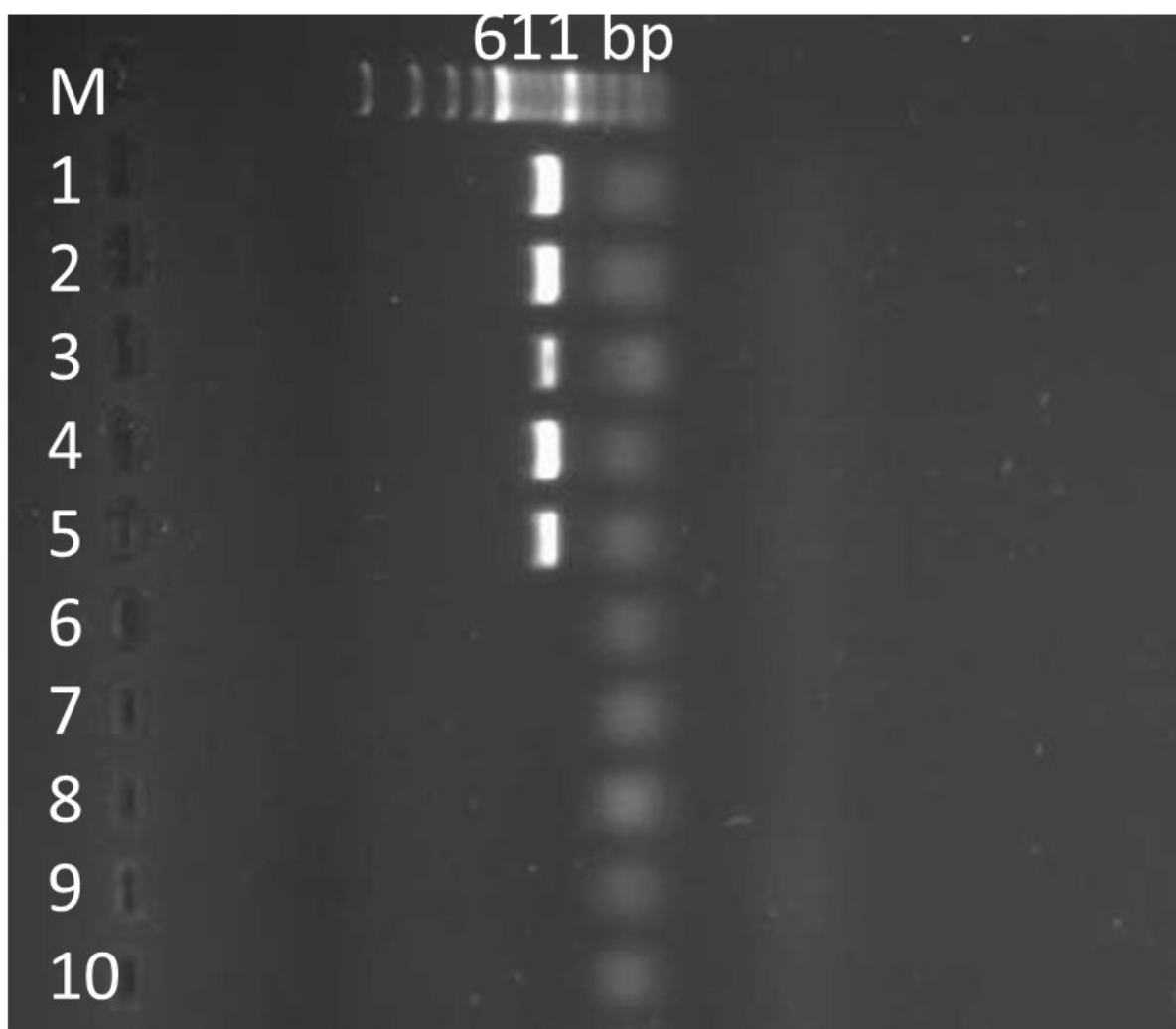
Obrázek 16: termocycler s nastaveným programem pro amplifikaci úseku genu viru žloutenky vodnice

9.2.7 Elektroforéza a vizualizace amplifikovaných produktů PCR

Připraví se 1% agarózový gel v 1x TAE pufru (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH ~8.3), který se rozpustí zahřátím v mikrovlnné troubě. Po mírném vychladnutí se do gelu přidává SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, USA) (do 100 ml gelu 1 µl SYBR safe). Takto připravený gel se SYBR safe se přelije do šablony pro gely, kde je vložen elektroforetický hřeben pro vytvoření jamek v gelu pro nanášení PCR produktů.

Po ztuhnutí je gel přemístěn do elektroforetické vaničky obsahující také TAE pufr. Do první jamky je nanesen marker pro určení velikosti výsledného vizualizovaného produktu v množství 4 µl (GeneRuler 100 bp Thermo Scientific, USA). Dále jsou nanášeny do gelu jednotlivé PCR produkty (7 µl). Takto

připravené vzorky jsou elektroforeticky separovány na 80 V (Voltů) po dobu 40 min. až 1 hod. (doba závisí na velikosti gelu) a následně vizualizovány na UV a hodnoceny pomocí dokumentačního systému GelDoc (Bio-rad, USA).



Obrázek 17: Agarózový gel (1 %) po vizualizaci, pozitivně testované vzorky na TuYV s velikostí fragmentu 611 kb. Dráha M- molekulární marker 100 bp, dráha 1 – pozitivní kontrola, dráha 2 - řepka (Řepín), dráha 3 – úhorník mnohodílný (Dobrovíz), dráha 4 - řepka (Dobrovíz), 5 - pryšec kolovratec (Řepín), dráha 6 - violka rolní (Řepín) - negativní, Řádek 7 - řepka (Kmetiněves) – negativní, dráha 8 – merlík bílý (Stehelčeves) - negativní, dráha 9 – locika kompasová (Kmetiněves) - negativní, dráha 10 – negativní kontrola: vzorek H₂O

Hodnocení elektroforetické vizualizace separovaných produktů RT - PCR

Výsledky PCR reakce jsou vizualizovány pomocí gelové elektroforézy. Elektroforéza využívá rozdílné pohyblivosti jednotlivých fragmentů danou právě jejich rozdílnou velikostí. Nukleová kyselina nese díky záporně nabitým fosfátům záporný náboj, a proto se v elektrickém poli pohybuje od záporného pólu (katody) ke kladnému (anodě). K separaci PCR produktu (DNA) dojde na základě délky a konformace v elektroforéze s použitím fluorescenčního barviva (SYBR green či etidium bromid-EtBr). Takto fluorescenčně zbarvené PCR produkty jsou vizualizovány UV lampou v systému dokumentačního zařízení Gel doc (Biorad, USA). Specificita detekce viru se vyznačuje s tím, že dojde k produkci hledaného úseku genomu (velikost PCR fragmentu bp (párové báze) daného viru v rozhraní dvou primerů. Velkost produktu se měří DNA markerem označujících fragmenty různých velikosti párových bazí.

Citlivost metody

Byla provedena ředící řada z celkové izolované RNA pro syntézy cDNA, u které byla známá koncentrace. Byl použit vzorek o výchozí koncentraci 640 ng/μl (do reakce pro syntézy cDNA byla použita 2 μl RNA).

Byl využit pár primerů specifických pro poleroviry - Sense:**GCTCTAGAATTGTTAATGARTACGGTCG**/Antisense:

CACGCGTCIACCTATTTIGGRTTITG

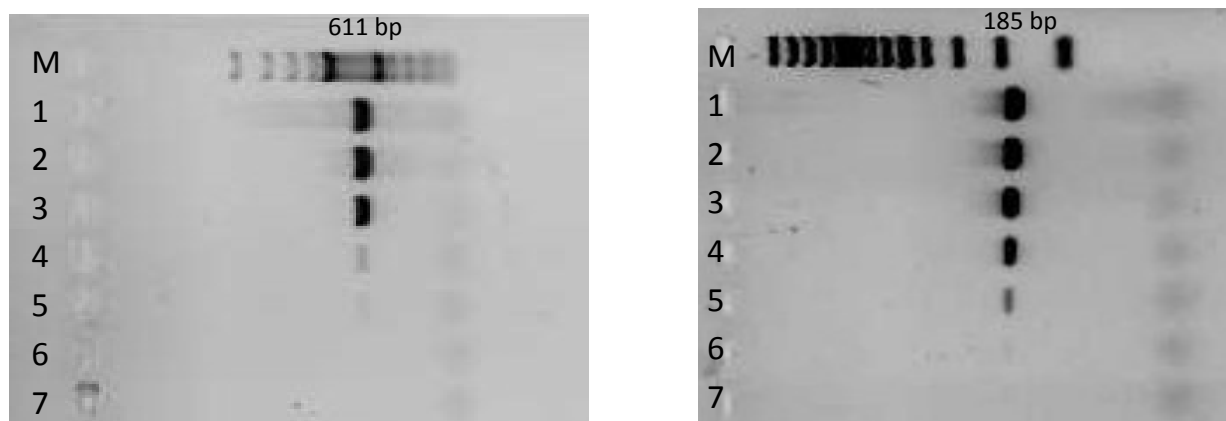
Při ředění celkové RNA pozitivních vzorků o této výchozí koncentraci je pravděpodobnost detekce $\geq 1,28$ ng/μl.

Dále byla stanovena citlivost pro pár primerů specifických pro genom TuYV:

TuYVF-K1:**TACGGTCGTGGGTAGGAGAA**/TuYVR-

K1:**TCGAACCTGCTCCTCTGGTA**.

Při ředění celkové RNA pozitivních vzorků o této výchozí koncentraci je pravděpodobnost detekce $\geq 0,128$ ng/ μ l.



Obrázek 18: Agarózový gel (1 %) po vizualizaci, detekční limit RT-PCR (vlevo- pár primerů sense/antisense a vpravo pár primerů TuYVF-K1/TuYVR-K1).
Dráha M- molekulární marker 100 bp

Dráha 1- původní: 1280 ng/ μ l RNA použito pro syntézu cDNA

Dráha 2- 10^{-1} : 128 ng/ μ l RNA použito pro syntézu cDNA

Dráha 3- 10^{-2} : 12,8 ng/ μ l RNA použito pro syntézu cDNA

Dráha 4- 10^{-3} : 1,28 ng/ μ l RNA použito pro syntézu cDNA

Dráha 5- 10^{-4} : 0,128 ng/ μ l RNA použito pro syntézu cDNA

Dráha 6- 10^{-5} : 0,0128 ng/ μ l RNA použito pro syntézu cDNA

Dráha 7- 10^{-6} : 0,00128 ng/ μ l RNA použito pro syntézu cDNA

10. OCHRANNÁ OPATŘENÍ VŮČI TUYV

Regulace výdrolu a dostatečná herbicidní ochrana má zásadní roli při snížení obsahu viru v agroekosystému stejně jako bezplevelný stav porostu. Virus žloutenky vodnice má však tak široký hostitelský okruh, který zahrnuje kulturní plodiny jako řepku, všechny běžně pěstované druhy hořčice, jarní řepku, cukrovou řepu, mák, svazenku ale také vojtěšku a další mezplodinové porosty, že regulace obsahu viru v agroekosystému je obtížná. Kromě uvedených kulturních plodin je virus také přítomný u celé řady plevelných a planých druhů rostlin. Virus se tak neustále udržuje na živých hostitelích v průběhu celého roku. Přesto je však důležité dodržet některá opatření, kterými lze obsah viru v agroekosystému regulovat:

- **Cílená insekticidní ochrana** proti přenašečům reguluje počet mšic v porostu řepky a jeho šíření. Při aplikaci insekticidního ošetření je vždy dobré provést prohlídku porostů a aplikovat postřik v případě, že je v porostu zvýšení výskytu hmyzích škůdců.
- Termín setí pro řepku je stanoven s ohledem na vytvoření dostatečného počtu listů pro optimální přezimování stanoven agrotechnický termín setí na 31.8. V oblastech s vyšším infekčním tlakem je vhodné **posunout termín setí** až ke konci této lhůty. Dokonce jsou v sortimentu pěstovaných odrůd k dispozici již výkonné odrůdy, které jsou schopny v teplejších oblastech vytvořit optimální počet listů v listové růžici i za kratí dobu.
- **Regulace výdrolu co nejdříve po sklizni** řepky zajistí do určité míry přerušení zeleného mostu. Řepkový výdrol vzcházející v letních měsících je významným zdrojem nákazy a místem intenzivního množení přenašečů TuYV. Kromě toho, v letním období je jednou z mála hostitelů, které jsou vzhledem ke svému životnímu cyklu v tomto období k dispozici. Kromě regulace obsahu viru, zapravení výdrolu či jiný způsob jeho likvidace, omezuje intenzivní množení vektorů – mšic.
- **Volba vhodných odrůd s charakterizovanou odolností proti TuYV** (ideálně ze seznamu doporučených odrůd) poskytuje lepší výnosy. Naproti tomu není vždy použití odrůd řepky obsahující gen rezistence R54 tou nejlepší volbou. Při odrůdových pokusech bylo dosaženo dobrých výsledků také s odolnými odrůdami.
- V blízkosti polí osetých řepkou ozimou **není vhodné pěstovat hořčici** jako přerušovače osevních sledů, protože také hořčice je významným hostitelem TuYV. Stejně jako v případě výdrolu řepky poskytuje útočiště přenašečům v době pozdního léta.

SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Předkládaná metodika v ucelené podobě shrnuje poznatky o viru žloutenky vodnice, přičemž se zaměřuje na původ této choroby, výskyt, přenašeče i hostitelský okruh. Nedílnou součástí jsou i metody diagnostiky, kdy je pozornost věnována především sérologickým metodám a metodám molekulární detekce. Metodika obsahuje nové primery, navržené v laboratoři virologie ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v.v.i., které jsou optimalizovány pro detekci viru nejen ve vzorcích řepky ozimé, ale také u dalších kulturních a nekulturních hostitelů.

Metodika je určena k využití při sledování virových patogenů řepky na porostech a usnadňuje rozhodování o použití přípravků na ochranu rostlin v souladu s pravidly integrované ochrany.

POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Metodika bude sloužit soukromým zemědělcům a agronomům jako pomůcka pro detekci viru žloutenky vodnice na porostu řepky. Poznatky získané uvedenými metodami budou využívány ke zvýšení informovanosti mezi pěstiteli řepky v České republice. V dlouhodobém horizontu přispějí ke snížení a promyšlenému používání insekticidů a využívání alternativních metod ochrany proti virovým chorobám. Při využití dostupných metod ochrany rostlin bude dosaženo snížení nákladů na insekticidní ošetření, zabezpečení stabilní a kvalitativně uspokojivé produkce.

EKONOMICKÉ ASPEKTY

Hlavní ekonomický přínos spočívá v minimalizaci negativních dopadů virové infekce na porosty řepky ozimé. Přesné dopady infekce virem žloutenky vodnice nejsou doposud vyčíslené, ale odhadují se průměrně v rozmezí 10 – 15 %. Řepka ozimá patří mezi intenzivně pěstované plodiny a při dobré úrovni

agrotechniky, výživy a ochrany je schopná dosahovat výnosu na úrovni 3 t z hektaru. Při současných výkupních cenách, které se pohybují kolem 10 000 Kč za 1 tunu, se při výnosovém propadu jedná o 3 000 Kč z 1 hektaru. Při zohlednění celkové výměry řepky pěstované na ploše 400 tisících hektarech se jedná o částku 1200 mil. Kč. A tato částka odpovídá pouze výnosové ztrátě na úrovni 10 %. K dalším ztrátám dochází v důsledku nižší olejnatosti a vyššímu obsahu nežádoucí kyseliny erukové.

Odhad nákladů na zavedení postupů

Náklady na vybavení laboratoří mohou být sice poměrně vysoké, jde však o vybavení, kterým již zavedené laboratoře běžně disponují.

Odhad nákladů na determinaci TuYV (odhad nákladů na jeden vzorek)

Z ekonomického hlediska je výrazný rozdíl v cenách mezi detekcí sérologickou metodou ELISA (cca 200 Kč/ 1 vzorek) a detekcí molekulárními metodami, kde se cena pohybuje okolo 510 Kč za jeden vzorek. Testování pomocí ELISA poskytuje spolehlivé výsledky. V případě výsledků, kde jsou však výrazné příznaky virové infekce anebo podezření na virovou infekci a negativní výsledek v sérologickém testování je doporučeno přetestovat ještě pomocí RT-PCR.

Tabulka 5: odhadované náklady metody ELISA a RT-PCR

Metodiky	Potřebné kity	Cena za kit	Cena na analýzu jednoho vzorku
ELISA	Sérum (Sediag)	10000 Kč/500 reakcí *	40 Kč
	Destičky (Sediag)	3 000 Kč/ 60 destiček	4 Kč
	Krycí fólie (Sediag)	4 500 Kč / 100 ks	1 Kč
	Plast		20 Kč
	Osobní náklady		100 Kč
	Režijní náklady		35 Kč
	CELKEM		200 Kč
RT-PCR	Izolace RNA (Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich)	30 780 Kč / 250 vzorků	123 Kč
	Sada dNTPS (100 mM každý, Promega) – ředění 10 mM	5 518 Kč	4 Kč
	RNasin (Jena Bioscience)	1 220 Kč	5,50 Kč
	Random Hexamers (Jena Bioscience)	680 Kč	5,50 Kč
	M-MLV (10 000 U, Promega)	1 914 Kč	23 Kč
	Go-Taq 2 Polymerase (Promega)		6 Kč
	dNTPs 100 mM každý, Promega) – ředění 2,5 mM	5 518 Kč	4 Kč
	Primery (100 µM)	350 Kč	1 Kč
	Agarózový gel (podrobně rozepsáno u One-step RT-PCR)		18 Kč
	Plast		60 Kč
	Osobní náklady		160 Kč
	Režijní náklady		100 Kč
	CELKEM		510 Kč

* ELISA jeden vzorek se testuje ve dvou opakováních

SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

1. Abraham, A. D.; Menzel, W.; Lesemann, D. E.; Varrelmann, M.; Vetten, H. J. (2006): Chickpea chlorotic stunt virus: a new polerovirus infecting cool season food legumes in Ethiopia. *Phytopathology* 96, 437-446.
2. Brault, V.; Mutterer, J.; Scheidecker, D.; Simonis, M. T.; Herrbach, E.; Richards, K.; Ziegler-Graff, V. (2000): Effects of point mutations in the readthrough domain of the beet western yellows virus minor capsid protein on virus accumulation in planta and on transmission by aphids. *Journal of Virology* 74, 1140-1148.
3. Brault, V.; Uzest, M.; Monsion, B.; Jacquot, E.; Blanc, S. (2010): Aphids as transport devices for plant viruses". *Comptes Rendus Biologies* 333 (6-7), 524-38.
4. Capinera, J.L. (2018): Featured creature Dostupné z http://entnemdept.ufl.edu/creatures/veg/aphid/green_peach_aphid.htm
5. Coutss, B. A.; Hawkes, J. R.; Jones, R. A. C. (2006): Occurrence of Beet western yellows virus and its aphid vectors in over – summering broad – leafed weeds and volunteer crop plants in the grainbelt region of south – western Australia. *Australian Journal of Agriculture Research* 57, 975-982.
6. Dawson, W. O.; Hilf, M. E. (1992): Host range determinants of plant viruses. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43, 527-555.
7. Farzadfar, S.; Pourrahim, R. (2017): Molecular detection of Turnip yellows virus (TuYV) infection alfalfa in Iran. *Australasian plant disease notes* 12, 1-4.
8. Graichen, K.; Rabenstein, F. (1996): European isolates of beet western yellows virus (BWYV) from oilseed rape (*Brassica napus* L. ssp. *napus*) are non-pathogenic on sugar beet (*Beta vulgaris* L. *altissima*) but represent isolates of turnip yellows virus (TuYV). *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 103, 233-245.

9. Gildow, F. E. (1993): Evidence for receptor-mediated endocytosis regulating luteovirus acquisition by aphids. *Phytopathology* 83, 270-277.
10. Heck, M.; Brault, V. (2018): Targeted disruption of aphid transmission: a vision for the management of crop diseases caused by Luteoviridae members. *Current Opinion in Virology* 33, 24-32.
11. Hertel, K.; Schwinghamer, M.; Bambach, R. (2004): Virus diseases in canola and mustard- Agnote DPI 495, 1. st edition.
12. Hampton, R. O., Keller, K. E., Baggett, J. R. (1998): Beet western yellows luteovirus in Western Oregon: pathosystem relationships in a vegetable-sugar beet seed production region. *Plant Disease* 82(2), 140-148.
13. Jay, C. N.; Rossall, S.; Smith, H. G. (1999): Effects of Beet western yellows virus on growth and yield of oilseed rape (*Brassica napus*). *Journal of Agriculture Science* 133, 131 – 139.
14. Jones, R. A. C. (2006): Control of plant viruses disease. *Advances in Virus Research* 67, 205-244
15. Jones, R. A. C.; Coutta, B.; Hawkes, J. (2007): Yield limiting potential of Beet western yellows virus in *Brassica napus*. *Australian Journal of Agricultural Research* 58, 788-801.
16. Juergens, M.; Paetsch, C.; Krämer, I.; Zahn, M.; Rabenstein, F.; Schondelmaier, J.; Schliephake, E.; Snowdon, R.; Friedt, W.; Ordon, F. (2010): Genetic analyses of the host – pathogen system Turnip yellows virus (TuYV) – rapeseed (*Brassica napus* L.) and development of molecular markers for TuYV – resistance. *Theoretical and Applied Genetics* 120, 735-744.
17. Kazda, J.; Ryšánek, P. (2011): Virové choroby řepky. *Úroda* 59 (1), 24-26.
18. Kazda, J. (2014): Škůdci polních plodin, Profi Press, Praha 2014, s. 110.
19. Kazda, J.; Baranyk, P. (2015): Důsledky setí převážně nemořeného osiva řepky. *Úroda* 63 (2), 40-44.
20. Kocourek, F. (2016): Mimořádně silné výskyty škůdců řepky v podzimním období a z toho vyplývající rizika pro jaro, prezentace Praha

- seminář 30. 11. 2016, [online]. [cit. 2017-12-12]. dostupné z <https://www.vurv.cz/sites/File/Prezentace>
- 21. Moreno, A.; De Blas, C.; Biurrun, E.; Nebreda, M.; Palacios, I.; Duque, M.; Fereres, A. (2004): The incidence and distribution of viruses infecting lettuce, cultivated Brassica and associated natural vegetation in Spain. *Annals of Applied biology* 144, 339-346.
- 22. Moreno, A.; Fereres, A. (2012): Virus Diseases in Lettuce in the Mediterranean Basin. *Advances in Virus Research* 84, 247-288.
- 23. Moreno, A.; Tjallingii, F.; Fernandez-Mata, G.; Fereres, A. (2012): Differences in the mechanism of inoculation between a semi-persistent and a non-persistent aphid-transmitted plant virus. *Journal of General Virology* 93, 662-667.
- 24. Newbert, M. (2019): Knowing the enemy- the genetic diversity and host range of turnip yellows virus, an important pathogen of oilseed rape in Europe.
- 25. Polák, J., Májková, L. (1992): Winter oilseed rape as a likely source and reservoir of beet western virus. *Sborník UVTIZ, Ochrana Rostlin*, 28(3), 191-196.
- 26. Shahraeen, N. (2012): An overview of oilseed rape (canola) virus diseases in Iran, *International Research Journal of Microbiology* 3(1), 024-028.
- 27. Smith, H. G.; Hinckes J. A. (1985): Studies on Beet western yellows virus in oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) and sugar beet (*Beta vulgaris*). *Annals of Applied Biology*. 107, 473-484.
- 28. Stevens, M.; Smith, H. G.; Hallsworth, P. B. (1994): The host range of beet western yellowing virus among common arable weed species. *Plant Pathology* 42, 579-588.
- 29. Stevens, M.; Liu, H-Y.; Lemaire, O. (2006): Virus Diseases. In *Sugar Beet*, 256-285.
- 30. Stevens, M.; Mc Grann, G.; Clark, B. (2008): Turnip yellows virus (syn Beet western yellows virus): An emerging threat to European oilseed rape production? *HGCA Research Review* 69, 1-36.

31. Timmerman, E. L.; D'Arcy, C. J.; Splittstoesser, W. E. (1985): Beet western yellows virus in Illinois vegetable crops and weeds. *Plant Disease* 69, 933-936.
32. Walkey, D. G. A., Pink, D. A. C. (1990): Studies on resistance to beet western yellows virus in lettuce (*Lactuca sativa*) and the occurrence of field sources of the virus. *Plant Pathology* 39(1), 141-155.

SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Slavíková, L.; Kumar, J. (2018): Virové choroby řepky a možnosti ochrany. Agromanuál 13 (7), 40 – 42.

Slavíková, L.; Kumar, J. (2020): Virové choroby řepky, jejich výskyt, přenos, přirozené rezervoáry a ochrana. Agromanuál 15 (7), 20 – 22.

Slavíková, L.; Kumar, J.; Červená, Z. (2018): Monitoring virové žloutenky vodnice v roce 2017. Úroda 66(6), 54 – 58.

Slavíková, L.; Kumar, J.; Červená, Z. (2018): Monitoring virových chorob řepky ve vegetačním období 2017-2018. Rostlinolékař 29 (6), 14 – 17.

Slavíková, L.; Kumar, J.; Červená, Z. (2018): Infekce virové žloutenky vodnice a její vliv na biologické a výnosové prvky ozimé řepky. Rostlinolékař 29 (6), 10 – 14.

Klíma, M.; Stará, J.; Pavela, R.; Slavíková, L. (2019): Výzkum řepky olejky ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v.v.i., Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 28 s.

Slavíková, L.; Chrpová, J.; Palicová, J.; Hanzalová, J.; Dumalasová, V.; Rípl, J.; Jarošová, J.; Kumar, J. (2018). Choroby obilnin „od zasetí až do sklizně“ (determinace a možnosti ochrany) Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. 57 s.



(Příznaky virové žloutenky u ozimé řepky)

Název: Virová žloutenka vodnice
 Autoři: Slavíková Lucie a Kumar Jiban
 Vydal: Výzkumný Ústav Rostlinné Výroby, v.v.i.
 Drnovská 507, 16106 Praha 6–Ruzyně
 Tisk: 100 ks
 Počet stran: 49
 Vydání: první
 Rok vydání: 2020
 ISBN: 978-80-7427-337-7