HISTORIE IDENTIFIKACE A CHARAKTERIZACE VIROVÝCH A VIROIDNÍCH PATOGENŮ BRAMBORU POMOCÍ MOLEKULÁRNĚ HYBRIDIZAČNÍCH TECHNIK

HISTORY OF IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF VIRAL AND VIROID PATHOGENS OF POTATOES USING MOLECULAR HYBRIDIZATION TECHNIQUES

Jiří PTÁČEK[1], Jaroslav MATOUŠEK[2]

[1]*Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o.*
[2]*Biology Centre CAS, IPMB, České Budějovice*

PTÁČEK, J. – MATOUŠEK, J.

HISTORIE IDENTIFIKACE A CHARAKTERIZACE VIROVÝCH A VIROIDNÍCH PATOGENŮ BRAMBORU POMOCÍ MOLEKULÁRNĚ HYBRIDIZAČNÍCH TECHNIK

Vědecké práce – Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, 2020, *26*: 19–28

Využívání molekulárně hybridizačních technik ve VÚB Havlíčkův Brod v oblasti charakterizace virů a viroidu bramboru započalo již před 25 lety. V současnosti již tyto techniky nejsou využívány, avšak cílem této publikace je ukázat vývoj v této oblasti.

DNA; DArT; genotypování; brambor

ÚVOD

Virové choroby v našich klimatických, geografických a půdních podmínkách jsou velmi významné, a to nejen z důvodu jejich škodlivosti, ale i proto, že jsou u nás lepší podmínky pro jejich rozšiřování, ve srovnání se severněji položenými přímořskými státy. Virové choroby jsou způsobeny rostlinnými viry, které jsou přenosné sadbou, některé mechanicky šťávou a řadou živočišných vektorů. Jednotlivé viry vytvářejí kmeny, které se vyznačují různými projevy, agresivitou i škodlivostí. S jejich vizuálním projevem se můžeme setkat zejména na nati (různé formy mozaiky, zkadeření, nekrózy, deformace, stáčení listů, inhibice růstu apod.) a v některých případech i na hlízách (nekrózy slupky, dužniny hlíz atd.). Někdy může vizuální projev chybět. Rozdíly jsou v primárních a sekundárních příznacích choroby. Virové choroby, v závislosti na odrůdě, pěstitelských podmínkách a průběhu počasí, snižují výnosy o 10 až 80 % (RASOCHA *et al.,* 2007)

Přítomnost virů se běžně zjišťuje laboratorními metodami, nejčastěji imunoenzymatickou metodou ELISA, která není vždy přesná a citlivá. Pro doplňková zjištění existuje řada testovacích rostlin a laboratorních metod, založených na molekulární detekci nukleové kyseliny. Metody detekce založené na těchto postupech pomocí polymerázové řetězové reakce jsou řádově citlivější než metody sérologické, avšak kvůli jejich vysoké citlivosti a specifičnosti a vysoké variabilitě virové ribonukleové kyseliny viru Y bramboru však nejsou zcela spolehlivé. Uvedené nedostatky odstraňují hybridizační sondy pro detekci virů či viroidu bramboru, jejíž sekvence jsou komplementární k ribonukleové kyselině daného izolátu viru nebo viroidu bramboru.

MATERIÁL A METODY

Extrakce virové RNA pro DNA-RNA hybridizaci

Extrakce virové RNA byla prováděna s použitím dvou základních typů pufrů. Prvním typem byl AMESS pufr (0,5 M octan sodný o pH 6,0, 10 mM $MgCl_2$, 3% SDS, 20% ethanol a 1 M NaCl), druhým několik variant pufru sestaveného v laboratoři molekulární genetiky ÚMBR AV ČR, který jsme nazvali pracovní zkratkou „E„. Složení pufru E v optimálním variantě: 0,1 M Tris-HCl, (pH 7,5), 50 mM EDTA, 5% SDS, 1% merkaptoethanol.

1. AMESS pufr

Listy brambor byly rozetřeny s pískem a AMESS pufrem (0,6 ml pufru / 0,4 g listů) v předchlazených třecích miskách. Pak bylo přidáno 0,8 ml směsi chloroformu s izoamylalkoholem v poměru 24 : 1 a pokračovalo se v homogenizaci. Poté byl homogenát přelit z misky do mikrozkumavky a odstředěn (5 min, 13500 rpm). Supernatant byl přepipetován do nové zkumavky a přidal se k němu stejný objem směsi formaldehydu (37%) a 20× SSC (3 M NaCl, 0,3 M citrát sodný, pH 7,0) v poměru 2 : 3. Směs se po promíchání nechala denaturovat 15 min v lázni (60 °C). Pak se mikrozkumavka s extraktem prudce zchladila v ledu, v němž pak byla uchovávána i během nanášení vzorků na membránu.

2. pufr E

Listy byly rozdrceny v třecí misce v tekutém dusíku, prášek z listů byl přesypán do nové vychlazené misky s pískem, kde k němu byl přidán pufr E (1,5 - 2 $ml.g^{-1}$ listů), a homogenizace pokračovala. Takto získaný homogenát byl převeden do mikrozkumavky a sedimentován 5 min při 13500 rpm. Poté byl supernatant opatrně odpipetován do nové mikrozkumavky. Po přidání stejného objemu směsi chloroformu s izoamylalkoholem (24 : 1) následovala znovu centrifugace 5 min při 13500 rpm. Supernatant byl opět odpipetován do nové zkumavky a němu přidán stejný objem směsi formaldehydu (37%) a 20× SSC (3 M NaCl, 0,3 M citrát sodný, pH 7,0) v poměru 2 : 3. Po důkladném promíchání byla směs denaturována 15 min v lázni (60 °C). Pak byla mikrozkumavka s extraktem prudce zchlazena v ledu, v němž byla uchovávána i během nanášení vzorků na membránu.

3. Nanášení RNA na membránu

Vzorky byly metodou dot blot naneseny na pozitivně nabitou nylonovou membránu s póry o průměru 2 μm (Nylon 66, Sigma), navlhčenou v roztoku 1× SSC (0,15 M NaCl, 15 mM citrát sodný, pH 7). Poté byla RNA kovalentně navázána na membránu působením UV záření a zapečena 30 min při 80 °C. Do dalšího použití byly membrány uchovávány uzavřené v polyethylenovém sáčku při 4 °C.

Byly optimalizovány tři různé postupy neradioaktivního značení cDNA sond:

1. DIG High Prime Labeling
2. DIG Chem-Link Labeling
3. PCR DIG Probe Synthesis

Naše experimenty ukázaly použitelnost všech tří postupů přípravy cDNA sond pro DNA-RNA hybridizaci na bázi RT-PCR produktů. První dvě metody využívají značení RT-PCR produktů buď pomocí digoxigenin-11-dUTP metodou „random primed" nebo pomocí speciálního produktu na bázi cis-platiny, vytvářející nekovalentní (koordinační) komplex s DNA přes N7 pozici guanosinových a adenosinových bazí. Třetí postup využívá přímé značení DNA fragmentů v PCR reakci zabudováním DIG-11-dUTP. Neradioaktivní značení sond digoxigeninem pro hybridizaci jsme vybrali po našich předchozích dobrých zkušenostech s tímto postupem při detekci PSTVd pomocí DNA-RNA hybridizace.

Těmito postupy byly značeny RT-PCR produkty různé délky, lepší výsledky poskytovaly kratší fragmenty (do 500 bp), ale i delší fragmenty (1000 bp) byly použitelné jako sondy pro DNA-RNA hybridizaci. Pracovní postupy jsou podrobně popsány v těchto komerčních soupravách firmy Boehringer, proto je zde nepopisujeme.

Hybridizace s radioaktivně značenou sondou

Membrána s navázanými vzorky RNA virů byla nejprve inkubována 2 h při 50 °C v pre-prehybridizačním roztoku (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 M NaCl, 1 mM Na_2EDTA, 0,1% SDS). Následovala prehybridizace v roztoku o složení: 50% formamid, 50 mM fosfátový pufr (pH 7,4), 5 mM Na_2EDTA, 750 mM NaCl, 0,1% SDS, 0,3% PVP (polyvinylpyrrolidon), 0,3% BSA (hovězí sérový albumin), 0,3% Ficoll, 200 $\mu g.ml^{-1}$ RNA opět 2 h při 50 °C. Vlastní hybridizace s čerstvě zdenaturovanou (2 min při 98 °C) sondou probíhala přes noc za stejných podmínek jako prehybridizace. Objem hybridizačních roztoků byl 0,3 $ml.cm^{-2}$ membrány. Po hybridizaci byly membrány promyty roztoky: nejprve 2× SSC, 0,1% SDS při 50 °C po dobu 5 min, 1× SSC, 0,1% SDS při 55 °C 10 min, 0,5× SSC, 0,1% SDS při 60 °C 510 min, v některých pokusech ještě navíc promytí 0,1× SSC, 0,1% SDS při 60 °C 5 min.

Membrány pak byly exponovány (většinou přes noc) na přístroji STORM (Molecular Dynamics), z něhož byly pomocí programů Phosphor Imager a Image QuaNT získány obrázky i konkrétní naměřené hodnoty. Hodnoty radioaktivního signálu jsou udávány v jednotkách „spot volume„, které vyjadřují součin absorbance a plochy v mm^2.

Hybridizace s neradioaktivně značenou sondou

Membrány s navázanou RNA byly inkubovány 2 h při 50 °C v pre-prehybridizačním roztoku (50 mM TrisHCl, pH 8,0, 1 M NaCl, 1 mM Na_2EDTA, 0,1% SDS) o objemu odpovídajícímu velikosti membrány (0,3 ml.cm^{-2}). Prehybridizace se prováděla 2 h při 50 °C v roztoku o složení: 5× SSC, 50% deionizovaný formamid, 0,1% Nlaurylsarcosin, 0,02% SDS a 1/5 objemu blokovacího roztoku (10× SSC, 0,15 M citrát sodný, 1,5 M NaCl, pH 7,0, 10% SDS). Vlastní hybridizace s čerstvě denaturovanou (2 min při 98 °C) sondou probíhala přes noc za stejných podmínek a v roztoku o stejném složení jako prehybridizace. Objem hybridizačního roztoku byl 0,025 ml.cm^{-2} membrány. Po hybridizaci byly membrány promyty roztoky: nejprve 2× SSC, 0,1% SDS při pokojové teplotě po dobu 15 min (dvakrát), pak 1× SSC, 0,1% SDS při 50 °C 15 min (rovněž dvakrát) a na závěr byly opláchnuty (3 min) v pufru 1 (0,1 M kyselina maleinová, 0,15 M NaCl, adjustovaný na pH 7,5 při 20 °C krystalickým NaOH).

Při imunologické detekci byla membrána inkubována 30 min při pokojové teplotě v pufru 2 (směs blokovacího roztoku a pufru 1 v poměru 1 : 10) (použitý objem odpovídal 1 ml.cm^{-2} membrány). Dalším krokem byla inkubace (30 min) v roztoku s protilátkami (150 mU.ml^{-1}, použitý objem: 1 ml .cm^{-2}), připraveném rozpuštěním koncentrovaného roztoku anti-DIGAP konjugátu v pufru 2 (1 : 5000). Poté následovalo promytí pufrem 1 (2× 15 min v objemu odpovídajícímu 0,2 ml .cm^{-2}) a inkubace (5 min) v pufru 3 o složení: 0,1 M TrisHCl, 0,1 M NaCl, 50 mM $MgCl_2$, pH 9,5 (20 °C). Následně byla membrána umístěna do čerstvě připraveného roztoku NBT/BCIP (200 µl koncentrovaného roztoku NBT/BCIP rozpuštěného v 10 ml pufru 3), v němž bez přístupu světla probíhala barevná reakce (použitý objem: 0,1 ml .cm^{-2}). Po dosažení požadované intenzity zbarvení byla reakce zastavena pětiminutovým promytím membrány v TEpufru (10mM TRIS, 1mM EDTA, pH 8,0). Membrány byly foceny pomocí scaneru ASTRA 610 S (Umax).

Pro získání DNA-RNA hybridizační diagnostické sondy specifické pro PVY byla klonována cDNA odpovídající proteinu P1 PVY. cDNA viru PVY^{NTN} o délce 394 bp byla připravena standardními metodami s použitím kitů Gene Amp RNA PCR Kit (PerkinElmer) a odpovídala pozici genu pro protein P1 tohoto viru.

Získaná cDNA byla amplifikována PCR s použitím Pwo polymerázy (BIOZYM, Diagnostic GmbH). Primery byly stejné jako při reverzní transkripci, tj. Y_{214234} (5'CCAGATTGGTTCCATTGAATG3') a Y_{607589} (5'CAAAAACATATCGCACGC3'). Ke 3 µl templátu (produktu z RT-PCR) bylo přidáno 8 µl 25 mM $MgSO_4$, 10 µl 10× pufru, 8 µl 2,5 mM směsi deoxyribonukleotidů, 3 µl primeru Y_{214234} (1 µg.ml^{-1}), 3 µl primeru Y_{607589} (1 µg.ml^{-1}), 64,2 µl H_2O a 0,8 µl PWO polymerázy. Po 3 min počáteční denaturaci při 94 °C následoval 35× cyklus: 1 min denaturace při 94 °C, 1 min 20 s „annealing„ při 52 °C, 1 min 20 s prodlužování nového vlákna při 72 °C. Po kontrolní elektroforéze byl PCR produkt (označovaný dále písmenem Q) izolován z agarózového gelu pomocí soupravy Gel Extraction Kit (Qiagen).

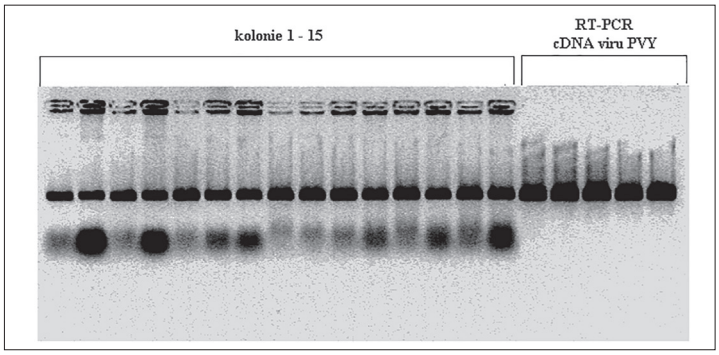
Ke klonování byla použita speciální souprava PCRScriptTM Amp SK(+) Clonning Kit (Stratagene). Ligaci do plasmidu předcházel „polishing„ (začištění konců) polymerázou Pfu: k 10 µl fragmentu Q bylo přidáno 1,3 µl „polishing„ pufru, 1 µl deoxyribonukleotidů a 1 µl Pfu polymerázy. Reakce probíhala 30 min při teplotě 72 °C. Po ní byla cDNA ligována T4 ligázou do plasmidu pCRScriptTM Amp SK(+). Ligační směs se skládala z 1 µl plasmidu, 1 µl 10× pufru, 0,5 µl ATP, 6,5 µl „polishing„ fragmentu, 1 µl T4 ligázy a 1 µl Srf I. Takto upravenými plasmidy pak byly transformovány kompetentní buňky *E. coli*. Transformace probíhala následovně: 100 µl suspenze kompetentních buněk (skladovaných při -70 °C) se nechalo rozpustit na ledu, poté byly přidány 2 µl ligační směsi (obsahující zhruba 100 ng plasmidu) a směs byla 30 min inkubována na ledu. Následoval teplotní šok (42 °C, 90 s) a 2 min v ledu. Poté byly buňky kultivovány 2 h na třepačce při 37 °C v Erlenmayerových baňkách obsahujících 0,9 ml LB media. Získaná suspenze pak byla po 200 µl rozetřena na misky s LB mediem obsahujícím ampicilin (200 ng.ml^{-1}), Xgal (4bromo--5chloro-3indolyl-Dgalaktosid) a IPTG (isopropyl – Dthiogalaktosid) (60 µg .ml^{-1}). Bílé kolonie byly testovány na přítomnost požadovaného inzertu pomocí PCR následované elektroforézou v agarózovém gelu. Reakční směs při PCR s bakteriemi obsahovala: 556 µl H_2O, 80 µl pufru, 48 µl $MgCl_2$, 64 µl směsi všech nukleotidů, po 24 µl každého primeru (primery Y_{214234} a Y_{607589}, viz výše) a 4 µl Taq polymerázy (Promega). Tato směs byla rozdělena po 50 µl do 16 mikrozkumavek a do každé z nich byly špičkou pipety přidány bakterie z jedné kolonie (do poslední směs ze všech kolonií); cyklus byl stejný jako při amplifikaci cDNA polymerázou Pwo (viz výše).

Plasmidy byly z bakterií izolovány s použitím pufrů od firmy Qiagen. Bakterie narostlé přes noc v tekutém LB mediu při teplotě 37 °C za neustálého protřepávání byly třikrát sedimentovány při 3000 rpm 5 min. Poté byly resuspendovány ve 200 µl pufru P1 (pufr s RNázou A) a bylo k nim přidáno 200 µl pufru P2 (pufr pro alkalickou lyzi buněk). Po 5 min byla směs umístěna na led a do každé se přidalo 220 µl pufru P3 (pro renaturaci plasmidu). Následovalo opatrné pomalé promíchání obsahu zkumavek, 10 min inkubace v ledu a centrifugace 5 min při 13500 rpm. Supernatant byl převeden do nové zkumavky a k němu byla přidána v poměru 1 : 1 směs fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu (24 : 24 : 1). Po homogenizaci byly vzorky centrifugovány 5 min při 13000 rpm, vodná fáze byla opět přepipetována do nových zkumavek. Následovala precipitace izopropanolem, který byl přidán v množství 0,7× objem vzorku. Po homogenizaci byla směs ponechána 1 h při pokojové teplotě. Nakonec byl izopropanol důkladně odstraněn, plasmidy byly promyty 70% ethanolem, opatrně vysušeny v exikátoru a poté rozpuštěny v 50 µl TEpufru (10mM TRIS, 0,1mM EDTA, pH 8). Takto připravené plasmidy byly použity jako templát pro reamplifikaci sekvence určené k přípravě sondy. Reamplifikace byly provedena s použitím polymerázy Pwo (BIOZYM, Diagnostic GmbH) výše uvedeným postupem.

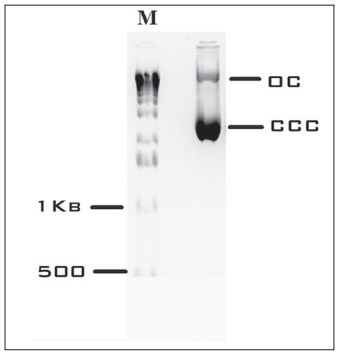
VÝSLEDKY A DISKUSE

cDNA viru PVY^{NTN} o délce 394 bp byla připravena reverzní transkripcí izolované virové RNA a odpovídala genu pro P1 protein tohoto viru (pozice 214 – 607 dle databáze EMBL). Po amplifikaci PCR a začištění konců byla ligována do plasmidu pCRScript, kterým pak byly transformovány kompetentní buňky *E. coli* (Obr. 1). Pro přípravu sondy P1 určené k detekci viru PVY byl použit klon číslo 1, ze kterého byl izolován plasmid (Obr. 2).

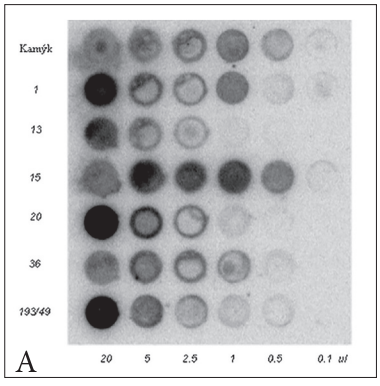
Obr. 1: Elektroforéza PCR produktů v agarózovém gelu. Pomocí PCR bylo testováno 15 klonů *E. coli* transformovaných plasmidem nesoucím cDNA viru PVY. Všechny vybrané klony obsahovaly plasmid s požadovaným inzertem, neboť u všech vznikl PCR produkt správné velikosti, který délkou odpovídá prvotním fragmentům získaným při RTPCR (vpravo).

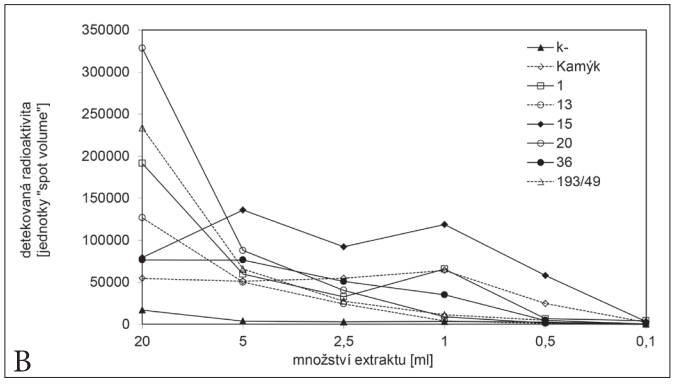


Obr. 2: Elektroforéza izolovaného plasmidu cDNA viru PVY. Vyznačené jsou dvě nejčetnější formy plasmidu. Vlevo 1Kb marker.



Obr. 3: Detekce viru PVY u různých linií transgenních rostlin bramboru infikovaných tímto virem pomocí molekulární hybridizace s radioaktivně značenou P1 cDNA sondou (expozice přes noc) (A). Odrùda Kamýk je netransformovaná kontrola. K extrakci virové RNA jsme použili „E„ pufr, k odstranění proteinů roztok chloroformu s izoamylalkoholem v poměru 24 : 1. 1 µl extraktu byl získán z 0,33 µg listů. B - Kvantitativní vyhodnocení signálů z A. Hodnoty radioaktivního signálu byly stanoveny pomocí programu ImageQuanNT na přístroji STORM.



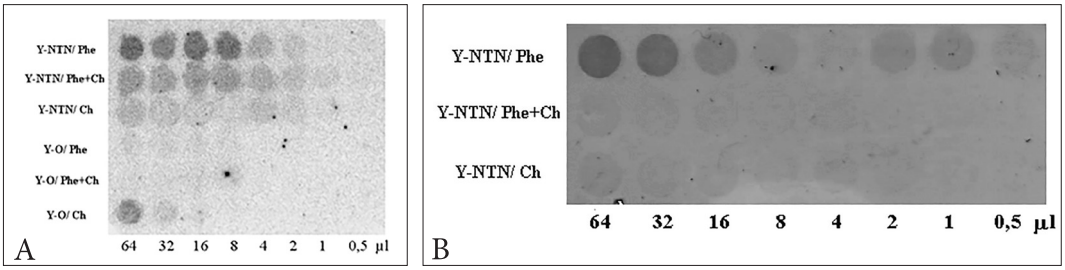


Jedním z důležitých kroků bylo získání vhodného extrakčního pufru. V další práci byla optimalizovaná varianta E pufru ověřována na několika liniích transgenních rostlin brambor infikovaných virem PVY. Při tomto pokuse se ukázalo, že při nejmenších ředěních (nejvyšších koncentracích extraktu) je hybridizace slabší než se dalo očekávat (viz Obr. 3).

Příliš malý nárůst signálu (ve dvou případech dokonce jeho mírný pokles) mohl být způsoben nejpravděpodobněji tím, že v extraktu byly přítomny nečistoty (zejména bílkovinné povahy), které vysytí vazebná místa na membráně a zeslabují tak při vyšších koncentracích efekt hybridizace. Proto jsme se v dalším experimentu zaměřili na nalezení nejvhodnějšího činidla pro odstranění bílkovin.

K odstraňování bílkovin jsme používali směs chloroformu s izoamylalkoholem (24 : 1), dále jsme testovali účinnost dalších dvou činidel, a to jednak roztoku fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu (24 : 24 : 1), jednak samotný fenol. Jak je vidět z Obr. 4, nejlépe se osvědčil fenol, neboť při jeho použití byl signál nejsilnější, a to při obou typech hybridizace. V tomto pokuse jsme používali k extrakci virové RNA z téhož množství listů větší množství pufru (2 ml/ g listů oproti 1,5 ml/ g listů), aby byl extrakt méně koncentrovaný. Celkově slabší signál (ve srovnání s předchozími obrázky) je tedy způsoben jednak nižší koncentrací extraktu, jednak kratší expozicí membrány (pouze 6 h) v případě radioaktivně značené sondy. Na obrázku je dále patrné, že sonda hybridizovala lépe s RNA viru kmene PVY^{NTN} než PVY^{O}.

Obr. 4: Detekce viru PVY^{NTN} (horní tři řady) a PVY^{O} (spodní tři řady) u rostlin bramboru pomocí dot blot molekulární hybridizace s cDNA sondou. K extrakci virové RNA byl použit pufr E, k odstranění proteinů fenol (1. a 4. řada), roztok fenolu s chloroformem a izoamylalkoholem (IAA) 24 : 24 : 1 (2. a 5. řada) nebo roztok chloroformu s IAA v poměru 24 : 1 (3. a 6. řada). A – membrána hybridizovaná s radioaktivně značenou sondou (expozice 6 h), B – membrána hybridizovaná se stejnou sondou značenou digoxigeninem. 1 µl extraktu byl získán z 0,25 µg listů.



Pomocí nového extrakčního roztoku, založeném na slabě alkalickém pufru Tris-HCl s obsahem merkaptoethanolu a se zvýšeným obsahem detergentů jako SDS či Triton X100, bylo dosaženo mnohonásobně citlivější detekce než u extraktů získaných klasickou metodou s použitím pufru AMESS.

Kritickým bodem pro úspěšnou detekci obou virů metodou molekulární hybridizace se ukázaly být podmínky při extrahování virové RNA z infikovaného rostlinného materiálu. Pro extrakci byly používány dva různé pufry lišící se chemickým složením i pH. Při

použití pufru AMESS byl hybridizační signál velmi slabý, přestože byl AMESS popsán jako vhodný k extrakci viroidů i některých virů pro účel molekulární hybridizace. Naopak dobrých výsledků jsme dosáhli s E pufrem. Tento pufr má vyšší pH než AMESS (7,5 oproti 6,0), pufrační látkou je Tris-HCl a nejsou v něm obsaženy žádné soli. Vzhledem k tomu, že se pufry lišily ve více faktorech, není možné bez dalších experimentů rozhodnout, která složka (případně kombinace složek) byla pro úspěšnost extrakce rozhodující. Správnou volbou detergentní složky extrakční směsi a její koncentrací lze tedy kladně ovlivnit kvalitu výsledků. Na zvýšení účinnosti extrakce virové RNA mohlo mít určitý vliv rovněž použití tekutého dusíku při homogenizaci listů.

Dalšího zvýšení hybridizačního signálu bylo dosaženo, když jsme při extrakci místo směsi chloroformu s izoamylalkoholem (24 : 1) použili fenol. Nicméně při delší expozici hybridizačních membrán je i extrakce chloroformem dostatečná pro detekci virů.

Zároveň se při tomto pokusu ukázalo, že při hybridizaci P1 sondy s RNA dvou izolátů patřících k různým kmenům viru PVY byl signál silnější u izolátu viru kmene PVY^{NTN} než PVY^{O}. Tento výsledek lze vysvětlit dvěma způsoby. Může to být důsledek rozdílnosti sekvencí těchto dvou izolátů v ORF pro P1 protein, neboť cDNA pro přípravu sondy byla připravena podle RNA izolátu viru PVY^{NTN} a použité primery byly odvozeny rovněž ze sekvence izolátu tohoto kmene. Variabilita sekvence části P1 proteinu byla pro některé izoláty PVY prokázána v práci TORDO *et al.* (1995). Ovšem nelze vyloučit, že slabší signál při hybridizaci s kmenem PVY^{O} byl důsledkem nižší koncentrace viru v použitém rostlinném materiálu.

Tento úsek virového genomu byl podrobně zkoumán na možnou variabilitu v rámci jednotlivých izolátů pomocí metody TGGE (RIESNER *et al.*, 1989). Byla zjištěna určitá variabilita, avšak nižší než například u PVS. Na základě cDNA sekvence proteinu P1 (ORF P1 PVY z izolátu Nicola) byly připraveny hybridizační sondy pro kvantifikaci PVY – radioaktivně značené ([α-^{32}P]dCTP, Amersham) nebo neradioaktivně značené (DIG, Boehringer), byla ověřena specifita i citlivost hybridizace s těmito sondami, u radioaktivně značené sondy byla zjištěna řádově vyšší citlivost, specifita byla shodná. Z našich dalších výsledků vyplývá, že ze souboru dosud testovaných izolátů tato sonda detekuje RNA izolátů z kmenové skupiny PVY-N, včetně PVY-NTN, slaběji detekuje RNA izolátů z kmenové skupiny PVY-O. RNA získané z izolátů dalších virů bramboru i viruprostých rostlin s touto cDNA sondou nehybridizovaly. Kromě zvýšení citlivosti detekce i možnosti kmenové diferenciace za pomoci specifických primerů vede kombinace obou metod (RT-PCR a dot-blot hybridizace) především ke zvýšení celkové specificity. Pro precizní kvantifikaci viru je však RT-PCR poněkud komplikovanou metodou vyžadující řadu interních standardů. Z tohoto hlediska se jeví klasický postup založený na RNA-DNA hybridizaci jako vhodnější.

Metodou dot-blot RNA-DNA hybridizace pro detekci virů bramboru v infikovaných rostlinách brambor jsme se zabývali pro její možnou aplikaci při testování rostlin v zemědělské praxi. Jejími hlavními výhodami jsou citlivost a specificita, která je zajištěna použitím vhodných primerů při přípravě cDNA sondy a je dána výběrem sekvence určené pro

účel detekce (její variabilitou či konzervativností) a délkou této sekvence. Nanesení vzorků na membránu metodou dot-blot umožňuje zpracování velkého množství vzorků najednou. Hybridizaci lze provádět i s několika sondami (pro detekci různých virů) současně, což je výhodné tehdy, je-li potřeba pouze vyřadit z výběru určenému k dalšímu pěstování rostliny napadené některým z daných virů, bez ohledu na to, jakým. To, že test není třeba provádět pro každý virus zvlášť, ušetří čas i finanční prostředky (SALDARELLI *et al*., 1996). Při hybridizaci s neradioaktivně značenou sondou (například pomocí digoxigenin11dUTP) není zapotřebí ani žádného speciálního vybavení, což ji činí použitelnou v zemědělské praxi, jak již doporučovali např. FOSTER a MILLS (1990), AUDY *et al.* (1991), SALDARELLI *et al.* (1996). Přitom při srovnání s ELISA je hybridizace stejně citlivá či citlivější (FOSTER a MILLS, 1990), a to až desetkrát (AUDY *et al*., 1991). V pokusech jsme prokázali, že je možné viry detekovat spolehlivě i z pouhých 0,15 μg listů při použití libovolného způsobu značení. V případě radioaktivního značení lze dosáhnout ještě vyšší citlivosti zvláště při delší expozici membrány.

Další výhodou je možnost kvantifikace viru na úrovni nukleové kyseliny, a proto je tato metoda nepostradatelná při hodnocení vlivu genů rezistence (např. antisense RNA) na replikaci virů (PRINS a GOLDBACH, 1996).

Ačkoliv jsme se nezabývali přímo kvantifikací virů v rostlinách, může být takto rozpracovaná metoda detekce virů bramboru použitelná i pro relativní porovnávání množství uvedených virů v infikovaných rostlinách. Je ovšem třeba počítat s výše zmíněnou možností variability virových sekvencí (mezi kmeny nebo izoláty), se kterými sonda hybridizuje, a tedy s různou mírou citlivosti pro různé kmeny nebo izoláty při daných podmínkách hybridizace. Je proto vhodné porovnávat pouze rostliny infikované stejným kmenem daného viru. Při porovnávání je dále třeba vhodně uspořádat pokus z hlediska odběru vzorků, neboť množství viru se může velmi značně lišit i mezi různými listy jedné rostliny či dokonce mezi různými částmi téhož listu.

Užitný vzor – 23929 Hybridizační sonda pro detekci viru Y u brambor

PODĚKOVÁNÍ

Práce vznikla i díky institucionální podpoře na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace reg. č. MZE-RO1618.

VYBRANÉ PUBLIKACE

MATOUŠEK, J. – TRNĚNÁ, L. – DĚDIČ, P. – PTÁČEK, J. – KREJČOVÁ, J. (1996): PCR amplification and analysis of potato virus S (PVS) coat protein region as a source for anti-PVS antisense RNA system. Vědecké práce – Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, *12*: 43–52.

PTÁČEK, J. – MATOUŠEK, J. – DĚDIČ, P. (1999): Diagnóza S viru bramboru (PVS) technikami polymerázové řetězové reakce (RT-PCR) a pomocí molekulární hybridizace (cDNA sondy). Vědecké práce – Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, *13*: 103–111.

LITERATURA

AUDY, P. – PARENT, J.G. – ASSELIN, A. (1991): A note on four nonradioactive labeling systems for dot hybridization detection of potato viruses. Phytoprotection, *72*(2): 81–86.

FOSTER, G.D. – MILLS, P.R. (1990): Detection of strains of potato virus S by nucleic acid spot hybridization (NASH). Potato Res., *33*: 487–495.

PRINS, M. – GOLDBACH, R. (1996): RNA-mediated virus resistance in transgenic plants. Archives of Virology, *141*: 2259–2276.

RASOCHA, V. – HAUSVATER, E. – DOLEŽAL, P. (2007): Virové choroby brambor a možnosti jejich omezení. Havlíčkův Brod: Výzkumný ústav bramborářský, 8 s.

RIESNER, D. – STEGER, G. – ZIMMAT, R. – OVWENS, R.A. – WAGENHOFER, M. – HILLEN, W. – VOLLBACH, S. – HENCO, K. (1989): Temperature-Gradient gel electrophoresis of nucleic acids: Analysis of conformational transitions, sequence variations, and protein-nucleic acid interactions. Electrophoresis, *10*: 377–389.

SALDARELLI, P. – BARBAROSSA, L. – GRIECO, F. – GALLITELLI, D. (1996): Digoxigenin-labelled riboprobes applied to phytosanitary certification of tomato in Italy. Plant Disease, *80*(12): 1343–1346.

TORDO, M.J.V. – CHACHULSKA, A. M. – FAKHFAKH, H. – LE ROMANCER, M. – ROBAGLIA, C. – ASTIER-MANIFACIER, S. (1995): Sequence polymorphism in the 5'NTR and in the P1 coding region of potato virus Y genomic RNA. Journal of General Virology, *76*: 939–949.

PTÁČEK, J. – MATOUŠEK, J.

HISTORY OF IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF VIRAL AND VIROID PATHOGENS OF POTATOES USING MOLECULAR HYBRIDIZATION TECHNIQUES

Vědecké práce – Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, 2020, 26: 19–28

The use of molecular hybridization techniques at PRI Havlíčkův Brod in the field of characterization of potato viruses and viroids began 25 years ago. At present, these techniques are no longer used, but the aim of this publication is to show the developments in this area.

DNA; DArT; genotyping; potato

Kontaktní adresa:
RNDr. Jiří PTÁČEK, CSc.
Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o.
Dobrovského 2366, 580 01 Havlíčkův Brod, Česká republika
tel.: +420 569 466 244, e-mail: ptacek@vubhb.cz