

# OPTIMALIZATION OF RNA EXTRACTION FOR PEACH LATENT MOSAIC VIROID DETECTION BY PCR

Optimalizace extrakce RNA při detekci viroidu latentní mozaiky  
broskvoně pomocí metody PCR

Mohamed HASSAN, Pavel RYŠÁNEK  
KOR AF ČZU

---

## Souhrn, klíčová slova

Byla optimalizována metoda extrakce RNK pro stanovení viroidu latentní mozaiky broskvoně pomocí PCR. U mladších listů na počátku vegetace nebyly rozdíly mezi jednotlivými metodami patrné s výjimkou kitu Adgen, u kterého nebyly získány pozitivní výsledky. U starších listů rostlin ze skleníku dávala spolehlivé výsledky pouze metoda extrakce pomocí kitu Qiagen.

PLMVd, extrakce RNK, PCR

## Summary, keywords

Method of RNA extraction from peach leaves was optimized for peach latent mosaic viroid detection by PCR. In RNA extraction from young leaves at the beginning of vegetation no substantial differences were recorded among the extraction methods with the exception of the kit Adgen, where no positive results were obtained. In the case of older leaves from greenhouse grown plants only kit Qiagen gave reliable results.

PLMVd, RNA extraction, PCR

---

## Introduction - Úvod

Viroid latentní mozaiky broskvoně (*Peach latent mosaic viroid*, PLMVd) byl poprvé izolován v roce 1988 (Flores a Llacer, 1988), i když choroba, kterou způsobuje, je známa už od třicátých let minulého století (Desvignes, 1986). Hlavním hostitelem PLMVd je broskvoň, kde se vyskytuje řada příznaků jako je mozaika na listech, pestrokvětost, deformace a praskání plodů (Desvignes et al., 1996). Údaje o výskytu PLMVd na jiných druzích peckovin (meruňky, slivoně, třešně) jsou sice k dispozici (Faggioli et al., 1997, Hadidi et al., 1997), ale jsou v rozporu se staršími pozorováními Desvignese (1986), který byl schopen experimentálně infikovat pouze broskvoně.

PLMVd je pravděpodobně rozšířen na celém světě, neboť byl prokázán v 25 % odrůd pocházejících z Evropy, USA, Číny a Japonska (Desvignes, 1986).

V rámci certifikačních (uznávacích) programů sadby ovocných stromů je třeba mít k dispozici dostatečně citlivé a spolehlivé metody detekce a determinace viroidů, aby bylo možné se za zdravotní stav sadby zaručit.

## Methods - Metody

Čtyři izoláty PLMVd byly získány od Dr. Seria (CNR Bari) ve formě infikovaných výhonů. Izoláty byly přeočkovány (vždy 3 očka na podnož). Část rostlin byla už v prosinci přenesena do skleníku, druhá část byla vysazena venku. Od počátku rašení byly odebírány listy, z nichž byla extrahována RNK.

Extrakce RNK: Byly testovány postupy fenol – chloroformové extrakce podle Robertsona et al. (1991) a Robinsona (1992) a dále byly testovány extrakční kity firem Qiagen a Adgen.

PCR: Pomocí programu Williamstone Enterprises byly na základě publikovaných sekvencí RNK PLMVd navrženy celkem 3 primery, jeden primer reverzní a dva forwardové. První z nich dává s reverzním primerem produkt 100 bází dlouhý, druhý dává produkt 200 bází dlouhý.

Reverzní transkripce probíhala v 25 µl reakční směsi obsahující 5 µl pufru pro AMV transkriptázu, 0,5 µl AMV transkriptázy (5 U), 0,5 µl RNasinu (20 U), 10 pM reverzního primeru, 0,1 mM každého z dNTP a vodu bez Rnáz 1 hodinu

při 42 °C. Poté byla směs převařena 5 minut a ochlazena na ledu.

PCR probíhala rovněž v 25 µl reakční směsi obsahující 2 µl cDNA z transkripční reakce, 2,5 µl pufru pro Dynazyme DNK polymerázu, 1 µl Dynazyme DNK polymerázy, 0,1 mM každého z dNTP a 10 pM obou primerů. Na počátku probíhala 5 min inkubace při 72 °C, dále následovalo 40 cyklů 1 min 94 °C, 30 s 58 °C a 1 min 72 °C a nakonec následovala opět inkubace 5 min při 72 °C. Byl použit termocykler MJ Research PTC 200. Produkty byly vizualizovány po elektroforéze v 1% agarózovém gelu (1 hod při 60 V) pomocí ethidiumbromidu na UV transiluminátoru.

## Results - discussion – Výsledky - diskuse

U mladých listů nebyly žádné podstatné rozdíly mezi jednotlivými způsoby extrakce RNK s výjimkou soupravy Adgen, kde se zatím nepodařilo získat v PCR žádný produkt pravděpodobně pro nedostatečné množství získané RNK.

U starších listů rostlin ze skleníku nedocházelo při použití fenol – chloroformových způsobů extrakce k amplifikaci vůbec, protože extrakty obsahovaly pravděpodobně velké množství fenolických látek, které nebyly v průběhu extrakce odstraněny a které způsobují inhibici enzymatických reakcí v průběhu transkripce i vlastní PCR. Pouze souprava Qiagen, kde RNK je získávána díky její afinitě na kolonu, zatímco fenolické látky jsou eluovány, poskytovala RNK v dostatečném množství a kvalitě potřebné pro RT – PCR. Tyto výsledky jsou obdobné jako výsledky Cambry (osobní sdělení), který testoval olivovník na obsah některých virů a vzhledem k vysokému obsahu inhibitorů i v mladých listech dávala spolehlivé výsledky právě souprava Qiagen. Obdobně i při naší práci s BNYVV (Ryšánek, 1999) docházelo při fenol – chloroformové extrakci RNK ze silně nekrotizovaných kořenů řepy ke kopurifikaci fenolických látek inhibujících RT – PCR.

## References - Použitá literatura

Použitá literatura je k dispozici u autorů.

*Řešeno v rámci grantu NAZV QC 1359 Výzkum a vývoj komplexních postupů diagnostiky hospodářsky významných a karanténních fytopatogenních organismů pro systém certifikace ovocných dřevin.*