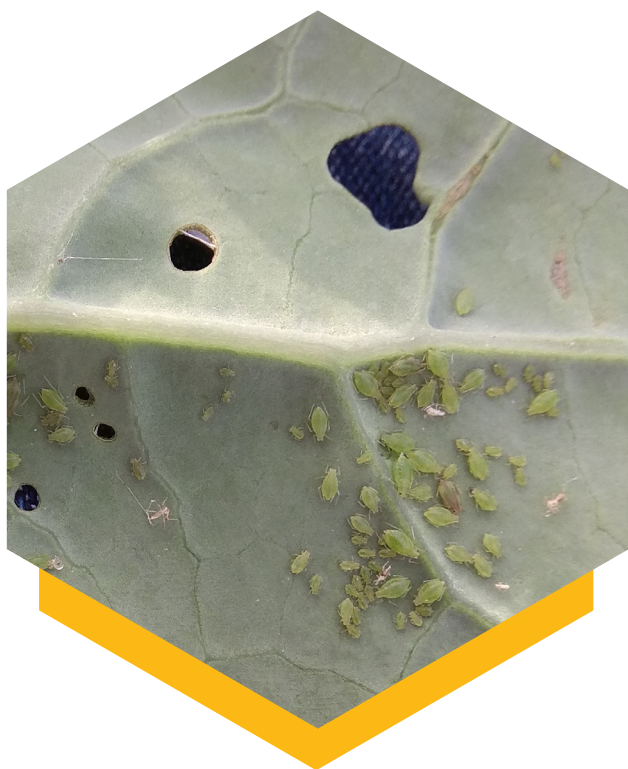


Metodika stanovení odolnosti odrůd ozimé řepky vůči viru žloutenky vodnice

Metodika N_{metS}

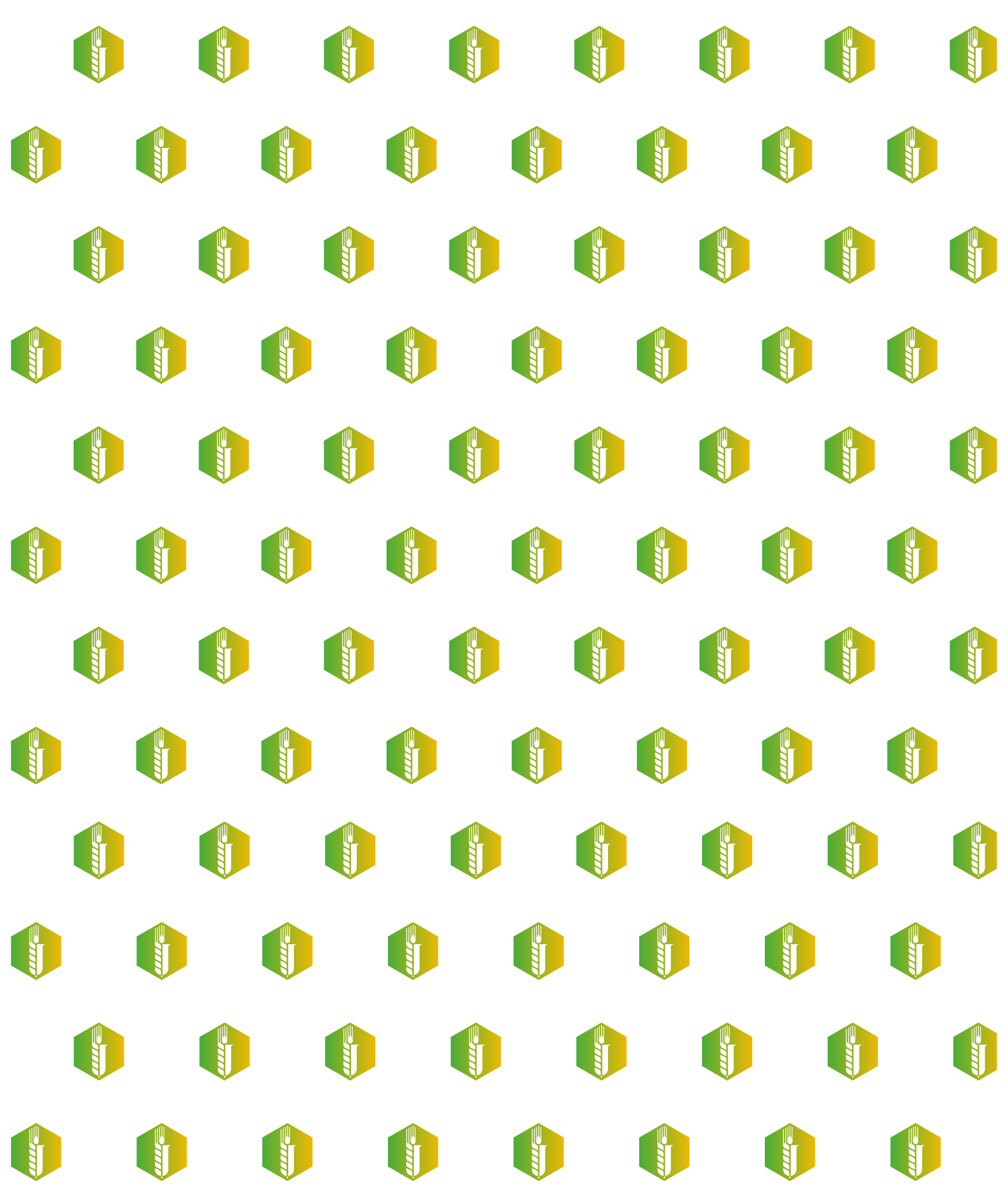
Ing. Bc. Lucie Slavíková, Ph.D.
Ing. RNDr. Emad Ibrahim, Ph.D.
Ing. Jiban Kumar, Ph.D.



Praha 2026



Národní centrum zemědělského
a potravinářského výzkumu



Dedikace: Metodika vznikla za podpory Ministerstva zemědělství ČR, institucionální podpora MZE - RO0426.

Předkladatel výsledku: Národní centrum zemědělského a potravinářského výzkumu, v. v. i. Drnovská 507, Praha 6 – Ruzyně, 161 00

Uznání metodiky: Osvědčení UKZÚZ 137264/2026 o uznání metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací bylo vydáno dne 31. 8. 2026.

Prohlášení: Předkladatel metodiky prohlašuje, že nemá žádný konflikt zájmu, a že zpracovaná metodika nezasahuje do práv jiných osob z průmyslového nebo jiného duševního vlastnictví.

Použitá literatura je dostupná u autorů metodiky.

Metodika neprošla jazykovou korekturou.

© Národní centrum zemědělského
a potravinářského výzkumu, v. v. i.

Praha 2026

METODIKA STANOVENÍ ODOLNOSTI ODRŮD OZIMÉ ŘEPKY VŮČI VIRU ŽLOUTENKY VODNICE

Metodika N_{metS}

Autorský tým:

Ing. Bc. Lucie Slavíková, Ph.D., Ing. RNDr. Emad Ibrahim, Ph.D., Ing. Jiban Kumar, Ph.D.
Národní centrum zemědělského a potravinářského výzkumu, v. v. i.

Foto: Lucie Slavíková (pokud není uvedeno jinak)

Oponenti:

Ing. Petr Svoboda, CSc. – Chmelařský institut, oddělení biotechnologie

RNDr. Anna Kryštofová, Ph.D. – Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, oddělení molekulární biologie Olomouc

Anotace: Virus žloutenky vodnice, jako významný patogen řepky, je na území České republiky poměrně novým, ale významně limitujícím faktorem její produkce. Poprvé byl výskyt tohoto viru ve větší míře v porostech řepky zjištěn v roce 2016, kdy také došlo k silnému přemnožení hlavního přenašeče, mšice broskvoňové. Vyšší početnost populace mšice broskvoňové je zapříčiněna především zákazem insekticidního moření, který je platný od 1. prosince 2013. Tento zákaz v kombinaci s teplým a suchým průběhem podzimu má za následek výrazný nárůst populací mšic.

Předkládaná metodika shrnuje současné poznatky o uvedeném patogenu, jeho příznacích, přenašečích i ochraně proti němu, ale zaměřuje se také na metodický postup stanovení odolnosti jednotlivých odrůd a perspektivních genotypů metodou kvantitativní polymerázové řetězové reakce s reverzní transkripcí. Volba odolných odrůd je dobrou volbou pro uvažované a účelné používání přípravků na ochranu rostlin.

Metodika může sloužit široké zemědělské veřejnosti jako návod pro identifikaci tohoto patogenu s hlavním využitím v laboratořích pro testování odolnosti odrůd ozimé řepky vůči tomuto viru a získané informace o odolnosti či náchylnosti konkrétního genotypu mohou být součástí charakteristiky konkrétního genotypu v registračním procesu. Metoda kvantitativní polymerázové řetězové reakce s reverzní transkripcí je pro stanovení odolnosti či náchylnosti odrůd sériemi několika desítek opakování již standardizována a přesná podoba biologického pokusu i následné hodnocení vzorků pomocí reverzní transkripce – kvantitativní polymerázové řetězové reakce jsou v předložené metodice velmi podrobně popsány.

Abstract: The turnip yellows virus (TuYV), a major pathogen of oilseed rape, is a relatively recent but increasingly important limiting factor for its production in the Czech Republic. The first large-scale occurrence of this virus in oilseed rape fields was reported in 2016, coinciding with a severe outbreak of its principal vector, the peach–potato aphid (*Myzus persicae*). The increase in aphid populations has been primarily attributed to the ban on insecticidal seed treatments, effective since 1 December 2013. This restriction, combined with the warm and dry conditions typical of autumn, has contributed to a marked increase in aphid numbers.

The presented methodology summarises current knowledge on the disease, its symptoms, vectors and control strategies, while also outlining a methodological approach for assessing the resistance of different cultivars and promising genotypes using reverse transcription–quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The deployment of resistant cultivars represents a rational and effective strategy for the targeted and reduced use of plant protection products.

This methodology may serve the broader agricultural community as a guide for the identification of TuYV, but its principal application lies in laboratories engaged in testing cultivar resistance to the virus. The resulting information on the resistance or susceptibility of specific genotypes can subsequently be incorporated into the characterisation of cultivars during and after the registration process. The RT-qPCR assay has already been standardized for evaluating cultivar resistance or susceptibility through multiple series of repetitions. The detailed design of the biological experiment, together with the subsequent evaluation of samples using RT-qPCR, are thoroughly described in the present methodology.

ISBN 978-80-7427-447-3

© Národní centrum zemědělského
a potravinářského výzkumu, v. v. i., Praha, 2026

Obsah

1. Cíl metodiky	6
2. Úvod	6
3. Původ a popis viru žloutenky vodnice	7
4. Přenos a přenašeči viru žloutenky vodnice	8
4.1 Mšice broskvoňová - <i>Myzus persicae</i>	8
4.2 Mšice zelná - <i>Brevicoryne brassicae</i>	13
5. Provázanost ozimé řepky a životního cyklu obou mšic	14
6. Hostitelé viru žloutenky vodnice	14
7. Příznaky infekce virem žloutenky vodnice	16
8. Poškození porostu a ztráty na výnosu	18
9. Hodnocení odrůdové odolnosti vůči viru žloutenky vodnice	19
9.1 Chov infekčních klonů mšice broskvoňové	19
9.2 Biologické testování odolnosti k viru žloutenky vodnice	20
10. Základní zpracování vzorků ozimé řepky pro stanovení odolnosti vůči viru žloutenky vodnice	22
10.1 Homogenizace vzorků	22
10.2 Izolace celkové RNA	22
10.3 Měření čistoty a koncentrace RNA	23
10.4 Příprava cDNA	24
10.5 Příprava kvantifikačního standardu pro RT-qPCR s využitím <i>Escheichia coli</i>	25
11. Hodnocení titru viru u ozimé řepky pomocí qPCR	26
11.1 Podmínky amplifikace	26
11.2 Použité primery	27
11.3 Analýza disociační křivky	27
11.4 Kvantifikace virového titru	27
12. Ochranná opatření proti šíření viru žloutenky vodnice	29
13. Srovnání novosti postupů	32
14. Popis uplatnění metodiky	32
15. Ekonomické aspekty	33
16. Seznam použité související literatury	35
17. Seznam publikací, které předcházely metodice	36


 Ústřední kontrolní
 a zkušební ústav zemědělský
 Držitel certifikátu ISO 9001

Hroznová 2
603 00 Brno

www.ukzuz.gov.cz IČO: 00020338
 ID DS: ugbaq7 DIČ: CZ00020338

vydává

OSVĚDČENÍ

UKZUZ 137264/2026

o uznání metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací, schválené usnesením vlády dne 8. února 2017, číslo 107 a její samostatné přílohy č. 4 schválené usnesením vlády dne 29. listopadu 2017 č. 837.

Název metodiky: Metodika stanovení odolnosti odrůd ozimé řepky vůči viru žloutenky vodnice

Autoři: Ing. Bc. Lucie Slavíková, Ph.D., Ing. RNDr. Emad Ibrahim, Ph.D.,
 Ing. Jiban Kumar, Ph.D.,

Název organizace: Národní centrum zemědělského a potravinářského výzkumu, v.v.i.

Metodika vznikla za podpory Ministerstva zemědělství ČR, institucionální podpora MZE-RO0426.

Místo vydání: Praha

Rok vydání: 2026

Brno 31. 8. 2026

Dokument je podepsán elektronickým podpisem
 Podpisující: Ing. Daniel Jurečka
 Organizace: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
 Sériové č. cert.: 24041124
 Vydatel cert.: PostSignum Qualified CA 4
 Datum a čas: 31.08.2026 13:49:50
 Dílčod:
 Místo:

Ing. Daniel Jurečka

ředitel ústavu

.....
 podpis/elektronický podpis
 zástupce odborného útvaru státní správy

Souhlas ředitele Odboru precizního zemědělství, výzkumu a vzdělávání MZe ČR:

V dne

Mgr. Jan Radoš

Digitální podpis:

10.09.2026 12:24

.....
 podpis/elektronický podpis
 ředitele/ředitelky
 Odboru precizního zemědělství,
 výzkumu a vzdělávání

1. Cíl metodiky

Cílem metodiky je v ucelené formě předložit šlechtitelům, laboratořím, zemědělské veřejnosti i dalším odborníkům na problematiku virových chorob, informace týkající se kvantifikace viru žloutenky vodnice ve vzorcích ozimé řepky a hodnocení odolnosti vůči tomuto virovému patogenu. Metodika zároveň obsahuje také popis choroby, původce, její symptomy, výskyt, hostitelský okruh a možné přenašeče.

Obsahem předložené metodiky je velmi podrobný popis provedení biologických pokusů a hodnocení rostlinného materiálu v laboratoři, od základního zpracování rostlinného materiálu až po hodnocení metodou reverzní transkripce – kvantitativní polymerázové řetězové reakce (RT – qPCR) se specifickými primery.

2. Úvod

Řepka ozimá je České republice průměrně pěstována na ploše okolo 350 tisíc hektarů. Tato plocha je již po dlouhá léta stabilní a dochází jen k velmi drobným výkyvům. Ve struktuře pěstovaných plodin je na druhém místě, hned po ozimé pšenici. Řepka je velmi výhodnou předplodinou pro obilniny, a to hlavně pro dlouhý, křulovitý kořen, kterým rostliny pronikají do hlubších vrstev půdního profilu a vynášejí na povrch živiny, které jsou pro běžné plodiny nedostupné. Tímto kořenem zajišťují také biologickou melioraci půdy a mobilizaci živin, a to hlavně fosforu. Řepku lze úspěšně pěstovat od nížin do nadmořských výšek kolem 700 m.n.m. S nárůstem pěstebních ploch se řepka rozšířila do všech výrobních oblastí ČR. Opakované pěstování řepky na stejném pozemku není doporučováno z důvodu zvýšeného rizika výskytu chorob a škůdců. Současná praxe pěstování ekonomicky výhodných plodin je však taková, že je řepka do osevního postupu řazena jednou za tři roky, a to ještě bohužel nejčastěji po dvou osevech ozimé pšenice. Toto časté řazení do osevního postupu má za následek nárůst výskytu různých škůdců a chorob, včetně virových.

Od 1. prosince 2013 je zakázáno insekticidně mořit osivo řepky. Toto moření na bázi neonikotinoidů poskytovalo porostům v době vzcházení ochranu na několik týdnů. Spektrum účinku bylo široké, mladý porost byl chráněn proti savému i žravému hmyzu. V souvislosti s tímto zákazem došlo k masivnímu nárůstu populací mšice broskvoňové, která má svůj životní cyklus úzce spjatý právě s řepkou ozimou. Ta poskytuje potravu mšicím v době, kdy jsou již ostatní porosty jsou odrostlé a jako potravu 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 a ve stádiu vajíček také v prasklinách kůry broskvoní přezimují.

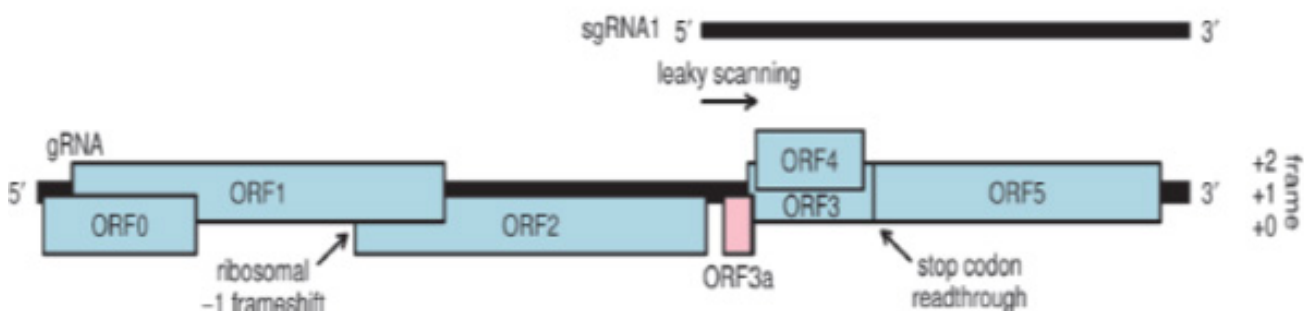
Jednotlivé odrůdy řepky ozimé reagují na infekci virem žloutenky vodnice rozdílně. U některých odrůd není nákaza prakticky ani patrná, jiné, na trhu dostupné odrůdy mají výrazné žloutkové příznaky s významným dopadem na výnos a kvalitativní parametry semene. Na osivářském trhu jsou dokonce k dispozici i odrůdy s genem rezistence.

Cílem předkládané metodiky je popis postupu stanovení odolnosti odrůd řepky ozimé od založení biologických pokusů, odběru vzorků až po laboratorní hodnocení odebraného rostlinného materiálu a jeho hodnocení. Odolnost jednotlivých odrůd a genotypů je hodnocena pomocí reverzní transkripce (RT) kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR), tzv. real – time PCR. Tato metoda poskytuje přesná, měřitelná data o množství viru v konkrétní odrůdě a je doplňkovou charakteristikou. Uvedený postup byl v diagnostické virologické laboratoři v Národním centru zemědělského a potravinářského výzkumu, v.v.i. několikrát ověřen na souboru několika set vzorků různého rostlinného materiálu i původu.

3. Původ a popis viru žloutenky vodnice

Virus žloutenky vodnice (turnip yellows virus – TuYV) je patogen, způsobující chorobu – virovou žloutenku vodnice. Tento virus, považovaný za nejvýznamnějšího patogena ozimé řepky, způsobuje výrazná poškození, kvantitativní ztráty na produkci řepkového semene i kvalitativní dopady s ohledem na obsah degradujících látek v něm. Dříve byl virus žloutenky vodnice ve vzorcích rostlin detekován pod názvem virus západní žloutenky řepy (BWYV – beet western yellows virus), analýzou sekvenčních dat bylo prokázáno, že jedná se o stejný virus. TuYV patří do čeledi Solemoviridae, rodu *Polerovirus*. Podle nové virologické taxonomie je název viru *Polerovirus TUYV*.

Genom viru tvoří jednovláknenná pozitivní RNA o délce 5,6–6 kb. Obsahuje sedm otevřených čtecích rámců (ORF – open reading frames), z nichž každý kóduje specifický protein s určitou funkcí a jednotlivé čtecí rámce fungují jako oddělené úseky RNA. 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 1 a 2 kódují protein související s replikací. Obalový protein (coat protein), který je na povrchu viru, jehož hlavní úlohou je ochrana virové částice před degradací, je kódován třetím čtecím rámcem – ORF3. Ten je také zodpovědný za infekci, systémové šíření v rostlině a pohyb virových částic floémem na dlouhé vzdálenosti. Je významný při navázání viru na vektora a interakci buněčných receptorů. Tento protein 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. Nejvíce variability vykazují čtecí rámce ORF0, ORF3 a read-through doména. Schéma genomu viru žloutenky vodnice včetně překrývajících se čtecích rámců je znázorněno v obrázku 1.



Obrázek 1: genom viru žloutenky vodnice s jednotlivými čtecími rámcí (zdroj: Smirnova et al. 2015)

4. Přenos a přenašeči viru žloutenky vodnice

Virus žloutenky vodnice je přenášen mnoha druhy mšic, hlavními vektory jsou však v podmínkách České republiky mšice broskvoňová a mšice zelná. Způsob přenosu je vždy cirkulativní, perzistentní a nepropagativní, bez ohledu na druh případného vektora. Uvedený způsob přenosu znamená, že aby mohla mšice šířit virus na nové rostliny, je potřeba delší doba sání, dostatečná k tomu, aby virus v těle mšice cirkuloval a byl přes slinné kanálky vylučován (cirkulativní), že virus ve mšici po jejím nabytí zůstává po zbytek jejího života (perzistentní), ale nedochází k jeho množení v těle mšice (nepropagativní). Jiné způsoby přenosu virové žloutenky vodnice, ať už přenos mechanický nebo přenos osivem, zaznamenány nebyly. V tabulce 1 je uveden seznam všech možných vektorů viru žloutenky vodnice.

Tabulka 1: potenciální přenašeči viru žloutenky vodnice (zdroj: Schliephake et al., 1999 b; Stevens et al., 2008)

Český název	Vědecký název
kyjatka hrachová	<i>Acyrtosiphon pisum</i>
mšice bavlníková	<i>Aphis gossypii</i>
mšice skleníková	<i>Aulacorthum circumflexum</i>
kyjatka zemáková	<i>Aulacorthum solani</i>
mšice chřestová	<i>Brachycorynella asparagi</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 nicotianae</i>
mšice meruzalková	<i>Nasonovia ribisnigri</i>
mšice jahodníková	<i>Chaetosiphon fragaefolii</i>
mšice kukuřičná	<i>Rhopalosiphum maidis</i>
mšice střemchová	<i>Rhopalosiphum padi</i>
kyjatka osenní	<i>Sitobion avenae</i>

4.1 Mšice broskvoňová - *Myzus persicae*

Mšice broskvoňová má mezi mšicemi výjimečné postavení. Je schopná sát a žít se na rozsáhlém počtu hostitelských rostlin, který zahrnuje druhy z 40 rostlinných čeledí, zejména pak Brassicaceae, Solanaceae a Asteraceae. Životní cyklus se značně liší v závislosti na přítomnosti chladných zim. Vývoj může být velmi rychlý, často 10 až 12 dní pro úplnou generaci 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 pučet. Vývojovými stádii mšice broskvoňové jsou vajíčka, larvy (nymfy) a dospělci. Larvy i dospělci mají stejnou velikost. Vajíčka jsou 0,6 mm dlouhá a 0,3 mm široká a jsou přezimujícím stádiem v případě holocyklického vývoje. Mají žlutou nebo zelenou barvu, ale velmi rychle během vývoje černají. Mortalita přezimujících vajíček je poměrně vysoká. Nymfy, které se líhnou z vajíček, jsou zpočátku nazelenalé, ale rychle žloutnou a začínají se výrazně podobat dospělcům.

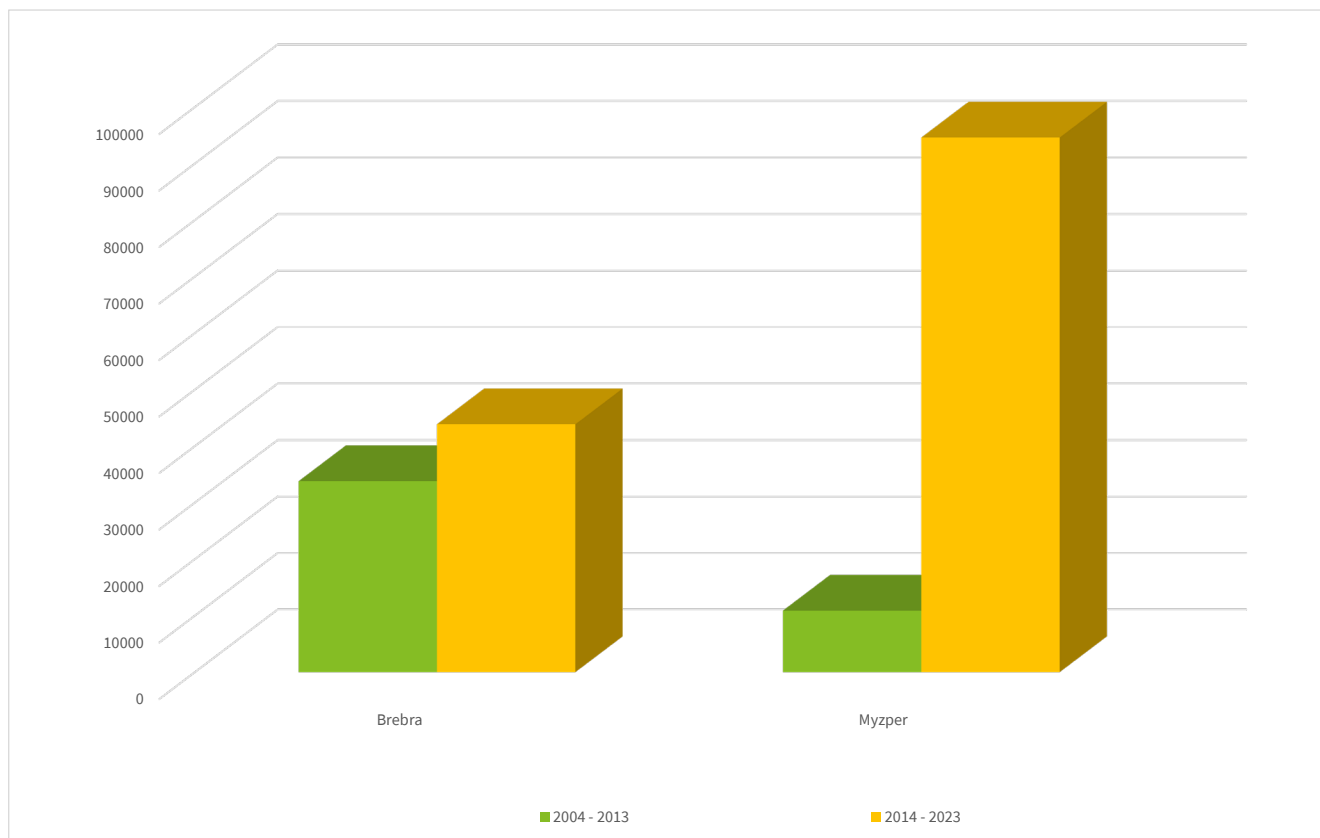
Dospělci mohou být okřídlení nebo bezkřídlí, přítomnost křídelek je závislá na kvalitě rostlinného materiálu. Okřídlené formy mají usnadněný pohyb v porostu a při přesunu na nové lokality.



Obrázek 2: kolonie mšice broskvoňové na spodní straně listu řepky ozimé (zdroj: Lucie Slavíková).

Mšice broskvoňová může mít také anholocyklický vývoj. Anholocyklické populace zahrnují pouze samice s partenogenetickým (nepohlavním) rozmnožováním. Holocyklické populace (všechna vývojová stadia s přezimujícími vajíčky) se vytváří na podzim, hlavně v reakci na rostoucí délku noci společně s klesající kvalitou rostlinného materiálu. V návaznosti na zhoršení těchto podmínek jsou produkovány smíšené populace samečků a samic, dochází k jejich páření a následnému přeletu samic na zimního hostitele, kde samičky kladou vajíčka do trhlín v kůře broskvoní. Přezimující aktivní stadia (anholocyklické populace) mají změněnou toleranci k chladu – lépe přežívají mrazové teploty a v porovnání s jedinci vylíhnutými z přezimujících vajíček jsou schopni se reprodukovat i při nižších teplotách. Nebezpečnost spočívá především v delší přenašečské aktivitě, kdy dochází k sekundárním infekcím v rámci porostu. V posledních letech také dochází ke změnám ve formování samečků v sacích pastech. Změny v poměrech jednotlivých pohlaví společně s výrazným nárůstem samic je zřejmý hlavně v teplejších oblastech ČR. Tento ukazatel je jedním z hlavních indikátorů formování anholocyklie mšice broskvoňové na území České republiky.

Pro jarní migraci okřídlených samic je suma efektivních teplot stanovena na 533,5 °C. Je to suma teplot, nasčítaných od spodního prahu vývoje, obvykle v období druhé poloviny května a při této teplotě dochází k migraci do nových porostů (cukrová řepa, jarní řepky, hořčice, zelinářské porosty). V teplejších porostech se okřídluje třetí generace, v chladnějších oblastech dochází k okřídlení až u čtvrté generace, vždy v návaznosti na teplotní podmínky. Spodní práh vývoje je stanoven na 3,1 °C.



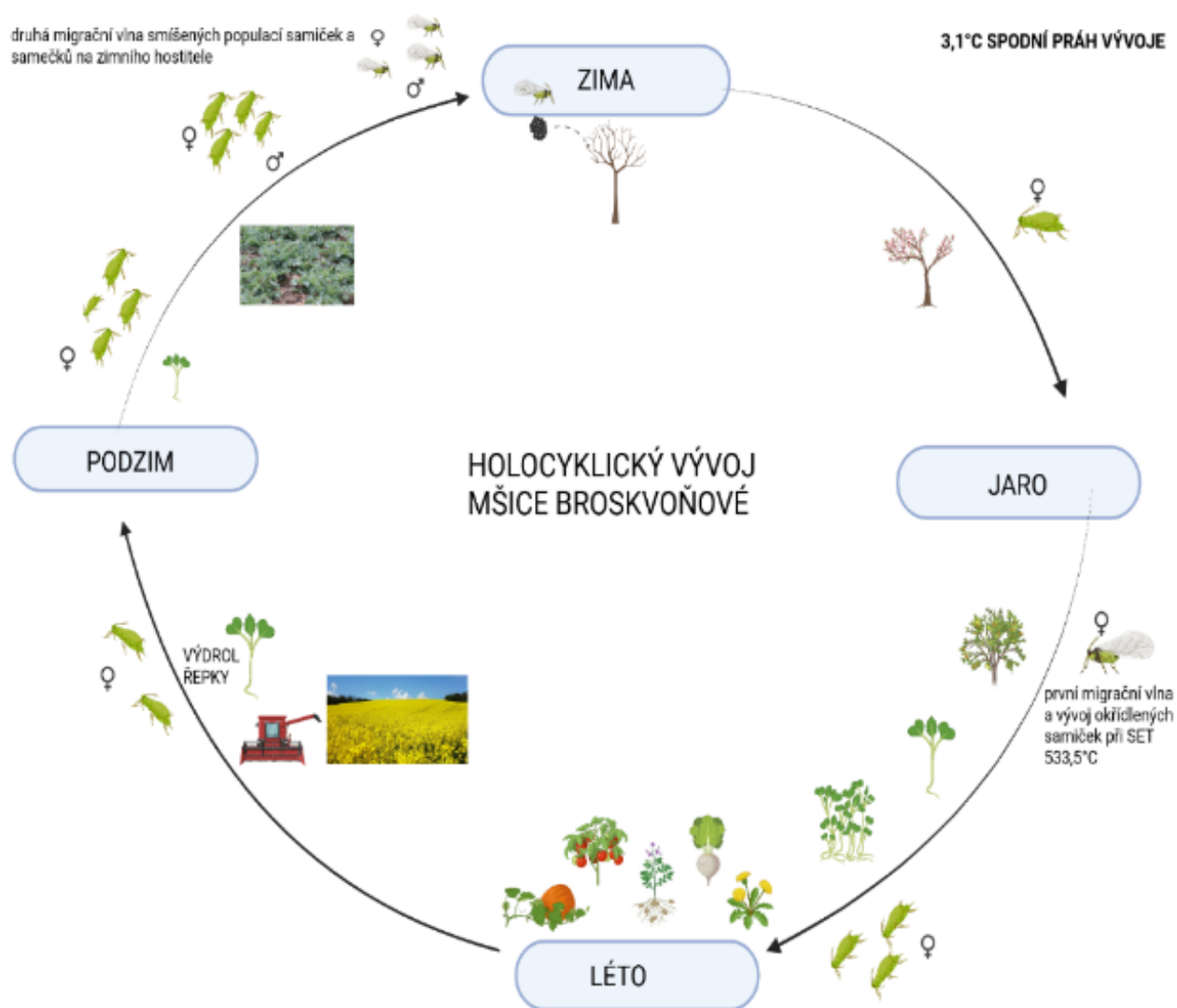
Obrázek 3: Početnost populací mšice zelné a mšice broskvoňové v České republice, zelený sloupec – období moření osiva, žlutý sloupec - období po zákazu používání insekticidního moření (zdroj: Slavíková et al., 2024, upraveno).



Obrázek 4: mšice broskoňová pod digitálním mikroskopem, zelená i červená forma jsou v agroekosystému běžné (zdroj: Lucie Slavíková).



Obrázek 5: Okřídlené formy mšice broskoňové vznikají v důsledku zhoršení kvality potravy nebo zkracování délky dne (zdroj: Lucie Slavíková).



Obrázek 6: holocyklický vývoj mšice broskvoňové (většinou tři populace na zimním hostiteli, s následným početným přeletem na letní hostitele (cukrová řepa, brambory, zelinářské porosty) s pozvolným přesunem na výdrol řepky, další přelet na řepku ozimou, kde se mšice broskvoňová intenzivně množí, dochází k páření a kladení vajíček do trhlinek v kůře broskvoní (zimní hostitel). Druhá migrační vlna zahrnuje přesun na zimního hostitele – broskvoně (zdroj: Lucie Slavíková).

4.2 Mšice zelná - *Brevicoryne brassicae*

Mšice zelná je v podmínkách mírného klimatu druhým významným přenašečem viru žloutenky vodnice a kolonizujícím druhem mšic. Na podzim vytváří početné kolonie bezkřídlých mšic, především na spodní straně listů, ale také na stoncích. Mšice jsou 2–2,6 mm dlouhé, šedozeleně zbarvené, popelavě poprášené a na zadečku mají 2 řady tmavých skvrn. Oproti mšici broskvoňové je odolnější k vysokým letním teplotám (snáší velmi dobře i teploty přes 30 °C), které naopak ještě podpoří její intenzivní množení. Za příznivých podmínek může během vegetačního období vzniknout i přes 10 generací, které se skládají z bezkřídlých i okřídlených jedinců. Na podzim začínají samičky po spáření klást vajíčka na brukvovité rostliny, především do řepky, do trhlinek v jejích stoncích, kde vajíčka přecházejí zimu. Do porostů ozimé řepky nalétává většinou později, až po mšici broskvoňové.

Ačkoliv je mšice zelná také významným vektorem, její účinnost přenosu je významně nižší. Uvádí se okolo 10 %. V rámci šíření viru se spíše uplatňuje při šíření v rámci konkrétního porostu než ve smyslu šíření na nové plochy.



Obrázek 7: kolonie mšice zelné na spodní straně listu ozimé řepky (zdroj: Lucie Slavíková).

5. Provázanost ozimé řepky a životního cyklu obou mšic

Životní cyklus obou uvedených druhů mšic je s řepkou ozimou velmi úzce spjat, a to hlavně v podzimním období. Mšice broskvoňová nalétává do nových porostů velmi brzy, často krátce po zasetí. V případě mšice zelné dochází k přeletům až v průběhu září a října, ze zelinářských porostů brukvovitých rostlin, což je jedním ze zdrojů infekce virem žloutenky vodnice. Mšice broskvoňová přelétává také ze zelinářských porostů (rajčat, paprik, lilků, košťálové zeleniny) ale současně z porostů cukrové řepy, krmné řepy, z výdrolu řepok, meziplodin a plevelů. Především plevelé společně s výdrolu řepok jsou v letním období rezervoárem viru žloutenky vodnice, odkud ho mšice následně přenášejí do nových porostu řepky ozimé.

Ze zkušeností s experimentálním chovem v Národním centru zemědělského a potravinářského výzkumu, v. v. i. je známo, že řepka ozimá je mšicí broskvoňovou velmi silně preferována a partenogenetické množení je na rostlinách řepky výrazně více intenzivní než na jiných rostlinných druzích. Masivní nárůst početnosti populací v podzimním období po zákazu moření (9krát vyšší v období nemoření insekticidy) je zapříčiněn silnou preferencí řepky a zároveň její „vybíravostí“. V době náletu mšice broskvoňové do nových porostů řepky byla koncentrace insekticidu z moření dostatečně vysoká. Mšice zelná naopak vyhledává porosty vzešlé, proto k přeletu do nových porostů řepok dochází později, v době, kdy již insekticidní účinek moření nebyl tak vysoký. Proto u populací mšice zelné před a po zákazu moření není pozorován tak významný nárůst.

6. 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 významných botanických čeledí, rostliny brukvovité – *Brassicaceae*, merlíkovité – *Chenopodiaceae*, bobovité – *Fabaceae*, hvězdnicovité – *Asteraceae*, tykvovité – *Cucurbitaceae*, hluchavkovité – *Lamiaceae*, zemědýmovité – *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. Byla zjištěna možnost experimentálního hostitelství u salátu, mangoldu, rebarbory a brukvovitých druhů zeleniny, současně však také u svazenky vratičolisté, čočky i dalších bobovitých.

Druhovú pestrost hostitelů viru žloutenky vodnice a skutečnost, že hostitelský okruh zahrnuje druhy jarní, letní, ozimé i víceleté, vytváří v agroekosystému tzv. zelený most – možnost, jak přežít na rostlinách i v období, kdy není dostatek kulturních hostitelů. Tyto rostliny jsou nejen způsobem, jak virus přežívá, ale také zdrojem odkud se virus může šířit na nové porosty.



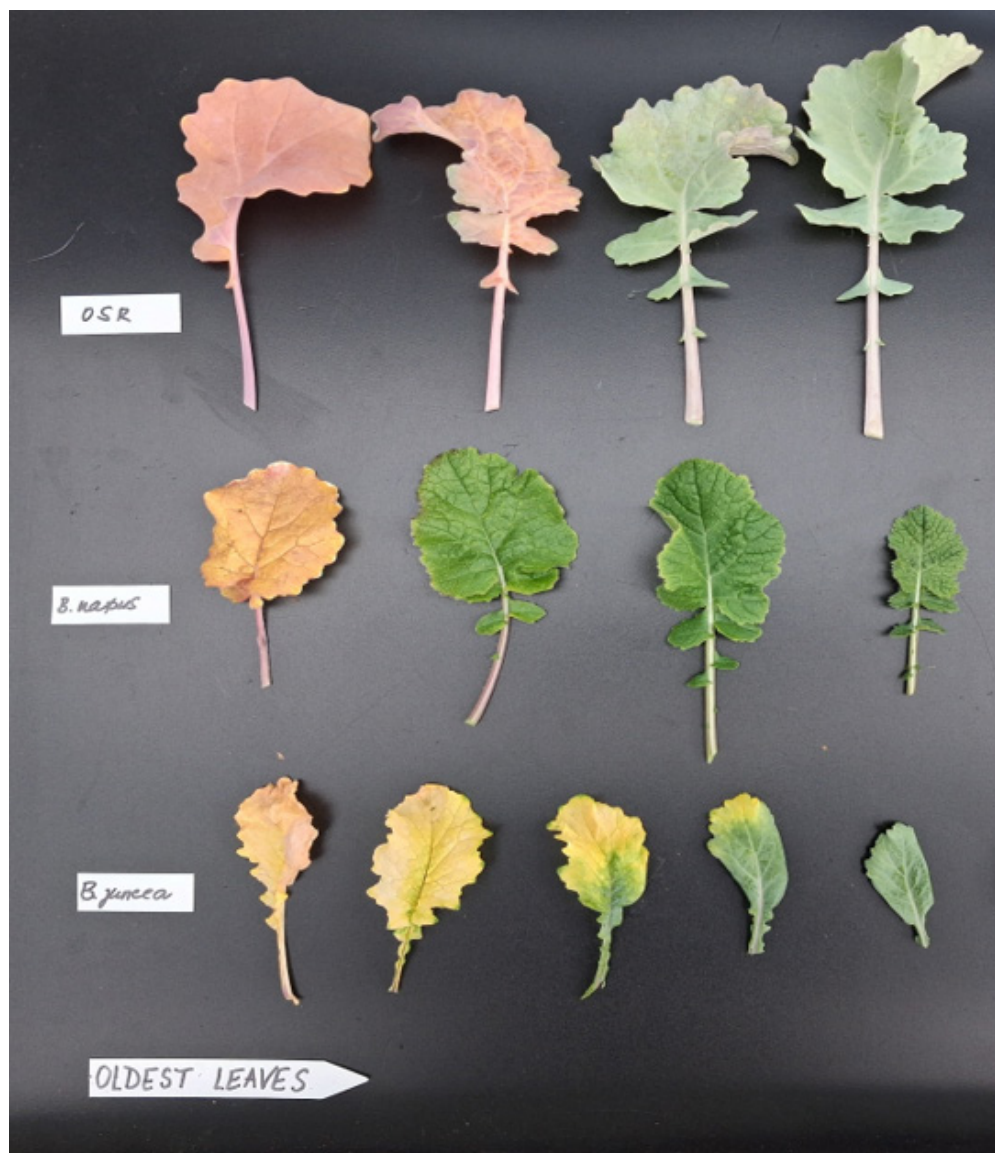
Obrázek 8: zemědělný lékařský i rozrazil perský jsou hostiteli viru žloutenky vodnice (zdroj: Lucie Slavíková).



Obrázek 9: hluchavka nachová pozitivní na TuYV (únor, 2025) (zdroj: Lucie Slavíková).

7. Příznaky infekce virem žloutenky vodnice

Symptomy infekce TuYV jsou často nejednoznačné a mnohdy bývají zaměňovány s nedostatečností ve výživě anebo jsou přičítány různým fyziologickým poruchám. Hlavními příznaky jsou však růstové retardace, listové žloutenky, červenání starších listů, antokyanové zbarvení na bázi listové růžice, 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 šesulí a odlišný počet semen oproti viruprostým rostlinám. Na projevy a dopady infekce virem TuYV má vliv celá řada faktorů. Nejprve bývají infekcí postižené staší listy.



Obrázek 10: rozvoj příznaků infekce virem žloutenky vodnice od nejstarších po nejmladší listy, 3 týdny od umělé inokulace. Horní listy: ozimá řepka, střední listy řepice ozimá, spodní listy: sareptská hořčice (zdroj: Lucie Slavíková).

Významným faktorem v symptomatických projevech je konkrétní druh hostitelské rostliny, protože každá rostlina na infekci TuYV reaguje jinak. Například starší listy u kokošky pastuší tobolky jsou celé žluté, zatímco u zdrojovky jsou červené. Výrazné příznaky infekce vykazují některé brukvovité plevely jako například hořčice rolní a ředkev ohnice. Naopak příznaky infekce jsou téměř nezatelné u pryšce kolovratce, nebo mléče. Míra poškození porostů vlivem infekce TuYV je také velmi variabilní.



Obrázek 11: projevy infekce TuYV u penízku rolníku jsou patrné na starších listech (vlevo), vpravo rostlina ptačince žabince infikovaná TuYV (zdroj: Lucie Slavíková).



Obrázek 12: příznaky žloutenky vodnice na listech řepky po umělé inokulaci, 3 týdny od inokulace (zdroj: Lucie Slavíková).

8. Poškození porostu a ztráty na výnosu

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. Dalším významným faktorem podílejícím se na míře poškození porostů jsou stresové faktory, kterým je porost vystaven. Infikovaný porost může dosáhnout dobrého výnosu, pokud je optimální výživa na jaře a je porost v dobré kondici po přezimování.

V České republice nejsou doposud zpracované údaje o dopadech infekce, je však podle dostupných údajů uváděno průměrné snížení výnosu okolo 15 %. V okolních zemích jsou však s infekcemi virovou žloutenkou vodnice rozsáhlejší 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. Virus byl zjištěn na 97 % pěstovaných ploch a ztráty na výnosu dosahovaly až 46 %. 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. Míra napadení rostlin v porostu však nemusí vždy odpovídat výnosovým ztrátám, neboť existuje variabilita v kompenzačních schopnostech jednotlivých odrůd.

V rámci biologického hodnocení odolnosti odrůd řepky ozimé v Národním centru zemědělského a potravinářského výzkumu, v.v.i. bylo zjištěno, že průměrná redukce biomasy nadzemní plochy dosahuje až 51 % oproti kontrolní – neinfikované variantě (průměrná hmotnost nadzemní hmoty u infikované varianty 12,95 g, u kontrolní 26,29 g) a redukce kořenového krčku u infikovaných rostlin je 37 % (průměr 0,56 cm u infikovaných rostlin, u kontrolních 0,88 cm). Hodnocení výnosových prvků je v rámci biologického pokusu obtížně proveditelné, protože se jedná o ozimou plodinu a je nutná jarovizace. Umělá inokulace polních pokusů je velmi náročná, protože je nutná izolace před nežádoucí infekcí. V rámci, již ukončeného projektu TM01000044 - Analýza rezistence řepky vůči virovým patogenům, řešeného společně s OSEVA, a.s., byly biologické pokusy prováděny a snížení výnosu se pohybovalo okolo 15 %.



Obrázek 13: rozdíly v růstu u odrůdy ozimé řepky Chagall po umělé inokulaci TuYV, vlevo kontrola, vpravo infikovaná varianta (zdroj Lucie Slavíková).

9. Hodnocení odrůdové odolnosti vůči viru žloutenky vodnice

V Národním centru zemědělského a potravinářského výzkumu, v.v.i., v týmu Interakce rostlinných virů s hostiteli a vektory je výzkum virových chorob řepky dlouhodobě zaměřen také na testování odolnosti jednotlivých odrůd vůči TuYV. Laboratoře týmu jsou vybaveny pro provádění nádobových pokusů s umělou inokulací a následně pro hodnocení pomocí molekulárních metod včetně kvantitativní metody RT –qPCR s analýzou a interpretací získaných dat.

9.1 Chov infekčních klonů mšice broskvoňové

Pro účely přenosu různých virových patogenů je v Národním centru zemědělského a potravinářského výzkumu, v.v.i. dlouhodobě udržován chov viruprosté – neinfekční mšice broskvoňové. Pro účely infekce virem TuYV je v uzavřené klimakomoře s řízeným provozem udržován také chov infekčních klonů mšice broskvoňové, nesoucích virus žloutenky vodnice. Mšice jsou chovány na rostlinách řepky (případně hořčice černé), které jsou pro tyto účely pěstovány a od počátku vzcházení jsou drženy pod síťovým krytím, aby bylo zabráněno případné jiné nežádoucí virové infekci anebo přenosu viru na další rostliny mimo tento uzavřený prostor.

Přítomnost viru v těle mšice je pravidelně ověřována odběrem rostlinného materiálu, na kterém mšice sají. S ohledem na perzistentní způsob přenosu TuYV je tato metoda ověření dostatečná.



Obrázek 14: Izolát TuYV, přenášený mšicí broskvoňovou, připravený k inokulaci genotypů řepky ozimé (zdroj: Lucie Slavíková).

9.2 Biologické testování odolnosti k viru žloutenky vodnice

Polní testování odolnosti odrůd řepky ozimé vůči viru žloutenky vodnice

Hodnocení odolnosti jednotlivých odrůd řepky vůči viru žloutenky vodnice v polních podmínkách je sice možné, ale neposkytuje spolehlivé výsledky. Je to hlavně proto, že ve většině polních odrůdových pokusů se hodnotí odolnost k virové infekci přirozenou infekcí. V případě nepříznivého počasí (deštivý a větrný průběh) je počet nalétávajících mšic nízký a porost tak nebude dostatečně infikován. Je také vysoké riziko infekce kontrolních rostlin. Další nevýhodou je dlouhá doba od založení pokusu po jeho vyhodnocení, která obsáhne prakticky celý rok. Tato metoda je však vhodná pro hodnocení jednotlivých odrůd z hlediska výnosových prvků jednotlivých odrůd.

Skleníkový pokus s umělou inokulací virem žloutenky vodnice

Vhodnou možností testování odolnosti jednotlivých odrůd řepky ozimé jsou nádobové pokusy, které jsou vedeny ve sklenících s řízeným teplotním a světelným režimem. Jejich výhodou je rychlá proveditelnost, která umožňuje několik opakování během roku.

Metodika nádobových pokusů je následující:

Do květináčů, předem naplněných zeminou, jsou vyseta semena vybraných genotypů a odrůd řepky ozimé, které jsou následně přikryta zeminou ve výšce 1,5 cm. Do každého květináče jsou vyseta 3 semena. Po vzejití rostlin je provedena redukce počtu jedinců (vyjednání) tak, aby v každém květináči zůstala jen 1 rostlina. Po celou dobu jsou rostliny včetně kontrol udržovány v síťovém krytu, z důvodu nežádoucí virové infekce. Ve stádiu 3–4 pravých listů jsou řepky inokulovány pomocí virunosných mšic z chovu infekčních klonů, který je v CARC, v.v.i. pro tyto účely udržován.



Obrázek 15: Rostliny připravené pro vyjednání a izolaci síťovým krytem (zdroj: Lucie Slavíková).

Inokulace probíhá tak, že na jednotlivé rostliny jsou přeneseny připravené fragmenty infikovaných listů se mšicemi. Na každou rostlinu se přenáší přibližně tři jedinci. Na nové rostliny jsou pinzetou umístěny ústřížky infikovaných listů, z nichž mšice samovolně přecházejí a zahajují sání. Po přibližně jednom dni nabývacího sání dochází k přenosu TuYV. Kontrolní varianta, ponechaná bez inokulace, slouží při hodnocení jako nulová pro daný genotyp či odrůdu.



Obrázek 16: Jednotlivé genotypy ozimé řepky po inokulaci virem žloutenky vodnice (zdroj: Lucie Slavíková).

Mšice jsou na rostlinách ponechány 7 dnů pro dostatečný přenos viru. Poté jsou rostliny se mšicemi ošetřeny insekticidním přípravkem, dochází k úhynu mšic a rostliny jsou opětovně zakryty. Insekticidní postřik bývá přibližně za 5 dní opakován. První příznaky jsou na rostlinách pozorovatelné většinou za 3 týdny. Po 5 týdnech jsou odebrány listy pro laboratorní testování. Pro hodnocení dalšího vývoje infekce virem TuYV je možné odběr listů opakovat za přibližně 1 měsíc.



Obrázek 17: genotyp ozimé řepky náchylný k TuYV, vlevo kontrolní rostlina, vpravo infikovaná varianta (zdroj: Lucie Slavíková).

10. Základní zpracování vzorků ozimé řepky pro stanovení odolnosti vůči viru žloutenky vodnice

Odebrané listy jsou uloženy do uzavíratelných plastových sáčků, jsou označeny (datum odběru, název genotypu a příslušná varianta: I1, I2, I3, I4 – inokulované a K1, K2 – bez inokulace, kontroly) a dále uchovány v mrazících boxech při teplotě -80 °C. Základní zpracování vzorků zahrnuje především homogenizaci a izolaci celkové RNA.

10.1 Homogenizace vzorků

Vzorky se homogenizují v tekutém dusíku. U vzorků uchovávaných při -80 °C je potřeba dbát na to, aby nedošlo k jejich rozmrazení. Vzorky jsou homogenizovány v třecí misce pomocí tloučku a jsou následně odebrány z třecích misek do předem označených mikrozku mávek, které jsou ponořeny do tekutého dusíku. Do mikrozku mávek je pak naváženo 0,1 g zhomogenizovaného rostlinného pletiva. Je velmi důležité nepřesáhnout uvedenou hmotnost, protože v navazujících metodách izolace nukleových kyselin dochází v tomto případě ke sníženému výtěžku i nižší čistotě nukleových kyselin.

10.2 Izolace celkové RNA

Pro izolaci RNA je potřeba 0,1 g homogenizovaného rostlinného pletiva. Existují různé způsoby izolace RNA. Rozhodující je vždy čistota a dostatečná výtěžnost RNA. V laboratoři Národního centra se vzorky řepky (RNA) izoluje především kolonkovým kitem.

Izolace RNA kolonkovým způsobem

Komerční souprava Spectrum™ Plant Total RNA Kit od firmy Sigma pro izolaci celkové RNA zahrnuje několik následných kroků: lyzaci, přečištění, navázání RNA, její promytí a vypláchnutí z kolonky.

Lyzace:

K homogenizovanému materiálu se přidá 500 µl lyzačního roztoku (Lysis solution) s 2-mercaptoetanolem. Vzorek se musí okamžitě a intenzivně promíchat na vortexu po dobu alespoň 30 s, aby se všechny složky promísily.

Vzorky se následně inkubují 3–5 minut při 56 °C, což napomáhá rozpadu buněčných struktur a denaturaci proteinů. U některých druhů vzorků s vyšším obsahem škrobu se doporučuje inkubace při pokojové teplotě, protože vyšší teplota může způsobit gelovitou strukturu a snížit účinnost filtrace.

Přečištění-filtrace:

Po inkubaci se vzorky centrifugují 3 minuty při maximální rychlosti (14 000 × g) přičemž buněčné komponenty vytvoří sediment. Supernatant obsahující RNA se následně přenesení do filtrační kolonky umístěné ve sběrné zku mávce. Při přenášení je důležité zabránit přenesení pevného sedimentu. Filtrační kolonka se centrifuguje 1 minutu opět při maximální rychlosti, tento krok odstraní jemné částice, polysacharidy a viskózní složky, které by mohly zanést vazebnou membránu.

Navázání RNA na silikagelovou membránu:

K vyčištěnému lyzátu se přidá Binding solution (na každý vzorek 500 µl) a směs se následně promíchá opětovným nasátím pipetou či na vortexu. Směs se postupně nanáší na vazebnou kolonku, nanášení probíhá ve více krocích.

V této fázi je také možné zařadit volitelný krok enzymatického odstranění genomové DNA (DNase I digest), který je doporučován zejména pro analýzy RT-qPCR.

Promytí navázané RNA:

Promývání probíhá v několika krocích. Nejprve je použit roztok 1 (Wash solution 1 v objemu 500 µl na jeden vzorek), při této reakci dochází k odstranění proteinů a buněčných metabolitů.

V druhém promývacím kroku je použit promývací roztok 2 (Wash Solution 2), opět v dávce 500 µl, při kterém jsou odstraněny soli a zbytkové kontaminanty.

Nakonec je provedena dodatečná centrifugace po dobu 1 minuty bez přídavku roztoku, aby se odstranily zbytky ethanolu. Tento krok je zásadní, protože ethanol může inhibovat reverzní transkripci a průběh PCR reakce.

Vypláchnutí RNA z kolonky

Kolanka se umístí do nové mikrozkušavky, přičemž do jejího středu se nanese 50 µl vymývacího roztoku (Elution Solution). Po inkubaci 1 minuty při laboratorní teplotě se kolona centrifuguje 1 minutu při maximální rychlosti. Eluát obsahuje purifikovanou celkovou RNA.

Pro zvýšení výtěžnosti lze provést druhou eluci elučním roztokem.

Skladování RNA

- krátkodobě: -20 °C
- dlouhodobě: -80 °C
- doporučuje se aliquotace vzorků.

10.3 Měření čistoty a koncentrace RNA

Čistota RNA se měří spektrofotometricky (např. NanoDrop2000 od Thermo Fisher Scientific). Měří se při vlnových délkách 260, 230 a 280 nm. Hodnoty naměřené přístrojem při těchto vlnových délkách umožňují hodnocení vzorku. Očekávané poměry při uvedených vlnových délkách jsou následující:

- $A_{260}/A_{280} \approx 1,8-2,1$
- $A_{260}/A_{230} > 2,0$

Poměr absorbancí 260/280 menší než 1,75 svědčí pro obsah kontaminujících bílkovin. Poměr A_{260}/A_{230} nižší než 2 svědčí pro obsah sacharidů. Při výpočtu koncentrace hodnota absorbance 1 odpovídá přibližně 40 mg/l pro RNA.

10.4 Příprava cDNA

Komplementární DNA je připravována s použitím reverzní transkripcí za použití komerční sady RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific). Tato sada obsahuje následující komponenty: enzym RevertAid reverse transkriptázu, inhibitor RNázy Ribolock (20 U/µl), 5× reakční pufr, směs dNTP (10 mM), random hexamer primery a vodu zbavenou nukleáz.

Uvedený postup je optimalizován pro potřeby laboratoře CARC a vychází z doporučení výrobce.

Příprava RNA, primerů a denaturace

V prvním kroku se do reakční zkumavky přidá 0,5 µl random hexamer primerů a 9 µl celkové RNA testovaných genotypů ozimé řepky připravené v předchozím kroku a vody zbavené nukleáz tak, aby byl doplněn objem na 9,5 µl. Objem vody a celkové RNA testovaných genotypů je variabilní a závisí na koncentraci konkrétního vzorku naměřeného po izolaci, ke které se upravuje objem vody.

Příklad:

- při koncentraci RNA nad 1000 ng/µl se do reakce přidá 1 µl RNA,
- při koncentraci RNA 200 ng/µl se do reakce přidá 5 µl RNA.

Takto připravené zkumavky jsou vloženy do PCR cycleru do nastaveného programu: 5 minut, teplota 65°C. Vzorky jsou následně zchlazeny na 4°C a další krok probíhá v ledu.

Přidání reakčních komponent a reverzní transkripce

Do každé zkumavky se přidají následující komponenty:

- 3,0 µl 5× reakčního pufru
- 1,5 µl dNTP směsi
- 0,4 µl inhibitoru RNáz RiboLock
- 0,55 µl enzymu RevertAid Reverse Transcriptázy

Reakční směs pro syntézu cDNA je připravena v celkovém objemu 14,95 µl.

Po přidání všech složek se směs jemně promíchá a krátce centrifuguje. Pro samotnou reverzní transkripci se zkumavky vloží do termocykleru a spustí se následující program:

- 25 °C po dobu 5 minut,
- 42 °C po dobu 60 minut,
- 4 °C pro uchování vzorků.

Pro syntézu cDNA lze použít také jiné komerční soupravy pro reverzní transkripci. V takovém případě je nutné postupovat podle pokynů výrobce a upravit reakční podmínky podle konkrétní soupravy.

10.5 Příprava kvantifikačního standardu pro RT-qPCR s využitím *Escherichia coli*

Pro absolutní kvantifikaci virové nukleové kyseliny metodou RT-qPCR je nutné připravit spolehlivý kvantifikační standard, který umožní vytvoření standardní křivky a následný výpočet počtu kopií cílové sekvence v testovaných vzorcích genotypů ozimé řepky. Standard je připraven ve formě plazmidové DNA obsahující cílový fragment genomu viru žloutenky vodnice (*Turnip yellows virus*, TuYV), který přesně odpovídá amplifikované oblasti používané v RT-qPCR reakci.

Cílový fragment zahrnuje amplikon definovaný použitými qPCR primery TuYV_qF1 (TGGGGTCTGACACGCTTATG) a TuYV_qR1 (CAGCAAGGCGAGACAGAAGA) s délkou amplikonu 105 bp. Použité primery jsou přihlášeny u Úřadu průmyslového vlastnictví, pod číslem přihlášky PUV 2026-44044. Použití standardu odpovídajícího přesně

amplifikované oblasti zajišťuje vysokou přesnost kvantifikace a umožňuje přímé srovnání virové nálože mezi jednotlivými vzorky i mezi různými experimenty.

Cílový fragment je získán PCR amplifikací z pozitivního vzorku nebo cDNA a následně purifikován pomocí komerčního kitu pro čištění PCR produktů. Velikost amplikonu je ověřena elektroforézou v agarózovém gelu. Purifikovaný PCR produkt je poté klonován do plazmidového vektoru podle zvoleného klonovacího systému (např. TA klonování).

Rekombinantní plazmid je transformován do kompetentních buněk *Escherichia coli* (např. kmen DH5α nebo TOP10) pomocí tepelného šoku nebo elektroporace. Transformované buňky jsou rozetřeny na selekční agarové médium obsahující příslušné antibiotikum a inkubovány přes noc při 37 °C. Po inkubaci jsou vybrány jednotlivé kolonie a přítomnost inserce je ověřena koloniovou PCR se specifickými primery pro vložku nebo plazmidový vektor.

Pozitivní kolonie jsou následně inokulovány do kapalného LB média s antibiotikem a kultivovány přes noc za třepání. Z bakteriální kultury je izolována plazmidová DNA metodou miniprep podle doporučení výrobce. Správnost vložené sekvence je ověřena sekvenací, pro potvrzení její identity s cílovou sekvencí používanou v RT-qPCR reakci.

Z ověřeného klonu je připravena větší bakteriální kultura, ze které je izolována plazmidová DNA ve vyšší čistotě (midiprep nebo maxiprep). Koncentrace DNA je stanovena spektrofotometricky nebo fluorimetricky a současně je zkontrolována její čistota pomocí poměru absorbancí A260/A280. Pro zvýšení reprodukovatelnosti kvantifikace je vhodné plazmid linearizovat restriční endonukleázou štěpící mimo cílovou vložku a následně DNA znovu purifikovat.

Na základě stanovené koncentrace plazmidu je vypočten počet kopií DNA (v 1 µl):

$$\text{počet kopií/}\mu\text{l} = (\text{koncentrace DNA [g/}\mu\text{l]} \times 6,022 \times 10^{23}) / (\text{délka plazmidu [bp]} \times 660)$$

Na základě vypočtené koncentrace je připravena série desetinných ředění standardu, obvykle v rozsahu 10^7 až 10^1 kopií na reakci, která slouží pro konstrukci standardní křivky RT-qPCR. Ředění jsou připravována v ultra čisté vodě nebo TE pufru, případně za přítomnosti nosičové nukleové kyseliny nebo BSA, která omezuje adsorpci DNA na povrch plastových zkumavek.

Připravené standardy jsou rozděleny do malých aliquotů, aby se zabránilo opakovanému zmrazování a rozmrazování, a skladují se při -20°C. Standardní řada je zahrnuta do každého RT-qPCR běhu, což umožňuje vytvoření standardní křivky a následný výpočet absolutního množství virové RNA ve vyšetřovaných vzorcích.

Kvalita připraveného standardu je hodnocena na základě parametrů standardní křivky RT-qPCR. Optimální účinnost reakce by měla být v rozmezí 90–110 %, lineární korelační koeficient $R^2 \geq 0,99$ a negativní kontrola nesmí vykazovat specifickou amplifikaci. Správně připravený plazmidový standard tak umožňuje přesnou a reprodukovatelnou absolutní kvantifikaci viru TuYV v analyzovaných rostlinných vzorcích a poskytuje spolehlivý nástroj pro hodnocení úrovně infekce a porovnání rezistence jednotlivých genotypů ozimé řepky.

11. Hodnocení titru viru u ozimé řepky pomocí qPCR

Kvantifikace viru žloutenky vodnice (Turnip yellows virus, TuYV) v jednotlivých genotypch ozimé řepky je provedena metodou kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase po reverzní transkripci (RT-qPCR). Analýza byla realizována na přístroji LightCycler® 480 (Roche Diagnostics) s využitím interkalačního fluorescenčního barviva SYBR Green I, které umožňuje sledovat vznik amplifikačního produktu během reakce na základě nárůstu fluorescence úměrného množství vznikající dvouvláknové DNA. Metoda stanovuje absolutní množství cílové virové sekvence TuYV v analyzovaných vzorcích.

Reakce probíhají v 384 jamkových PCR destičkách, přičemž celkový objem reakční směsi v jedné jamce činí 12 µl. Každý biologický vzorek je analyzován ve třech technických opakováních. Současně jsou v každém hodnocení analyzovány plasmidové standardy o známém počtu kopií cílové sekvence, které umožňují vytvoření standardní křivky pro absolutní kvantifikaci.

Před zahájením hodnocení je připraveno pipetovací schéma určující rozmístění vzorků, standardů a negativních kontrol v jednotlivých jamkách destičky. Tento postup minimalizuje riziko pipetovacích chyb a umožňuje jednoznačnou identifikaci reakcí během následné analýzy dat.

Složení reakční směsi

Reakční směs pro qPCR pro kvantifikaci TuYV obsahuje:

- 6,0 µl 2× SYBR Green I Master Mixu (Roche)
- 0,5 µl směsi primerů (10 µM) uvedených v kapitole 9.5
- 4,5 µl nukleázově čisté vody
- 1,0 µl cDNA jednotlivých testovaných vzorků ozimé řepky připravené reverzní transkripcí z celkové RNA izolované z listových pletiv ozimé řepky

Nejprve je do všech jamek napipetován master mix obsahující všechny složky reakce. Tento postup snižuje variabilitu mezi jednotlivými reakcemi. Následně je do každé jamky přidána cDNA jednotlivých vzorků a standardů. Po dokončení pipetování je destička uzavřena fólií, krátce centrifugována (pro odstranění vzduchových bublin) a vložena do přístroje.

11.1 Podmínky amplifikace

Amplifikační reakce probíhá za následujících podmínek:

1. iniciální denaturace: 95 °C po dobu 10 minut
2. 40 amplifikačních cyklů:
 - o denaturace: 95 °C po dobu 5 s
 - o nasedání primerů: 60 °C po dobu 30 s
 - o elongace: 72 °C po dobu 20 s

Fluorescenční signál je zaznamenáván během každého cyklu reakce.

11.2 Použité primery

Pro kvantitativní detekci TuYV byly použity primery, navržené v CARC, v.v.i., chráněné ve formě užitého vzoru zapsaného u Úřadu průmyslového vlastnictví pod číslem 39457.

Primerový pár (amplicon 105 bp)

TuYV_qF1: 5'-TGGGGTCTGACACGCTTATG-3'

TuYV_qR1: 5'-CAGCAAGGCGAGACAGAAGA-3'

Uvedené primery amplifikují krátké fragmenty genomu TuYV optimalizované pro real-time PCR analýzu a vykazují vysokou účinnost amplifikace (přibližně 1,98–2,06). Specifičnost primerů byla ověřena bioinformatickou analýzou dostupných sekvencí TuYV a experimentálně pomocí analýzy disociační křivky.

11.3 Analýza disociační křivky

Po ukončení amplifikace je provedena analýza disociační (melting) křivky, která slouží k posouzení charakteru vzniklého PCR produktu a k detekci případných nespecifických ampliconů nebo dimerů primerů.

Tato analýza spočívá v postupném zvyšování teploty reakce z přibližně 65 °C na 95 °C při kontinuálním měření fluorescence. Při denaturaci dvouvláknové DNA dochází k poklesu fluorescence barviva SYBR Green I, což umožňuje stanovit teplotu tání (T_m) amplifikačního produktu.

Specifická amplifikace cílové sekvence TuYV je charakterizována jedním dominantním píkem disociační křivky. Přítomnost více píků nebo píků při nižší teplotě může indikovat vznik nespecifických produktů nebo dimerů primerů. Hodnota T_m může být ovlivněna délkou ampliconu, koncentrací produktu, iontovým složením reakce nebo parametry použitého přístroje, proto je hodnocena především kvalitativně jako indikátor homogenity amplifikačního produktu.

11.4 Kvantifikace virového titru

Po potvrzení správného průběhu amplifikace jsou z jednotlivých amplifikačních křivek získány C_t hodnoty (cycle threshold). Každý biologický vzorek byl analyzován ve třech technických opakováních a z těchto hodnot je vypočten aritmetický průměr C_t , který je použit pro další výpočet.

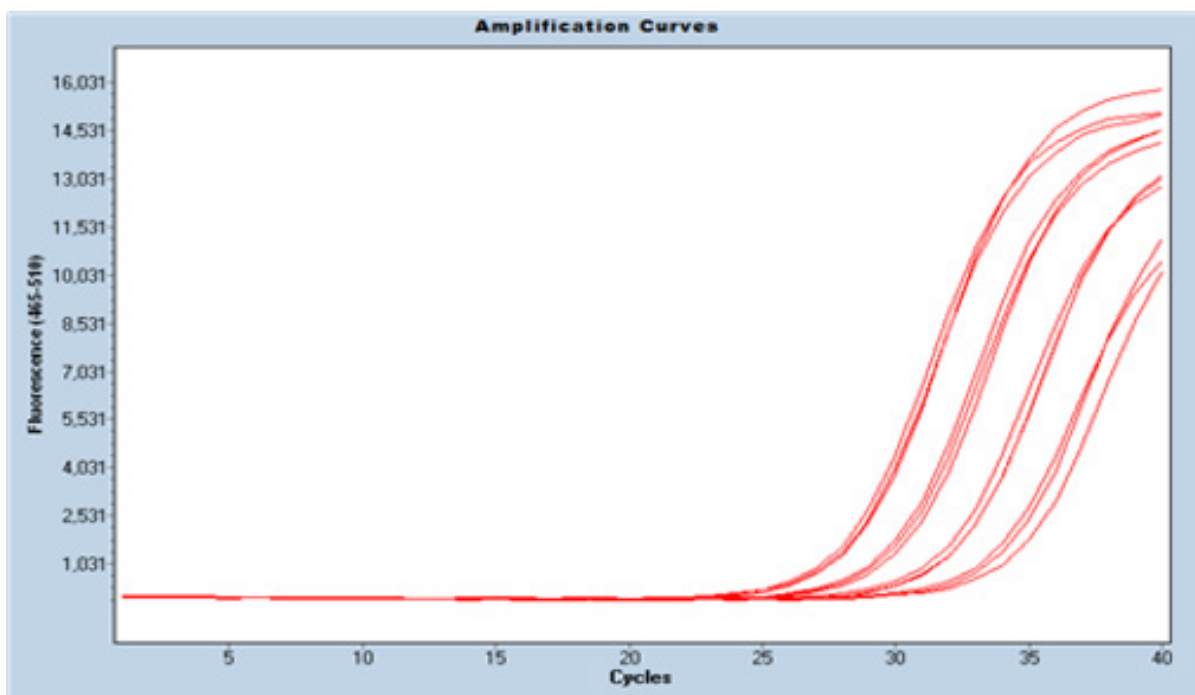
Absolutní množství cílové sekvence TuYV je stanoveno pomocí standardní křivky připravené z plazmidového standardu obsahujícího amplifikovaný fragment genomu TuYV o známém počtu kopií. Standardy byly připraveny v sérii desetinných ředění a analyzovány paralelně se vzorky v každém RT-qPCR experimentu.

Z lineární regrese závislosti C_t hodnot na logaritmu počtu kopií byla stanovena rovnice standardní křivky a účinnost PCR reakce. Na základě této kalibrační křivky byly C_t hodnoty jednotlivých vzorků převedeny na absolutní počet kopií cílové sekvence přítomné v analyzovaném množství cDNA.

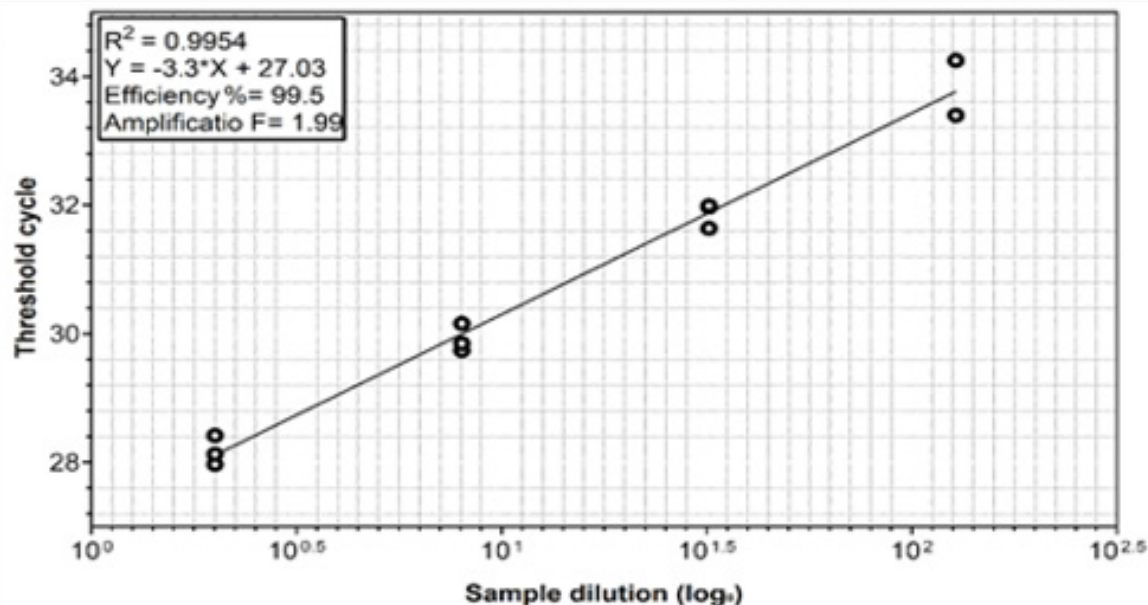
Výsledný titr viru je vyjádřen jako počet kopií cílové sekvence TuYV odpovídající analyzovanému množství cDNA.

Tento postup umožňuje přesné a reprodukovatelné srovnání úrovně infekce mezi jednotlivými genotypy ozimé řepky a minimalizuje vliv technické variability mezi jednotlivými reakcemi RT-qPCR.

A



B



Obrázek 18: A) Amplifikační křivky RT-qPCR získané ze čtyřnásobné série ředění cDNA (1:2 až 1:128, v triplicátech). Fluorescence je vynesena proti počtu cyklů a ukazuje postupné zpoždování hodnot Ct se zvyšujícím se ředěním pro RT-qPCR analýzy založené na detekci pomocí SYBR Green I s primery TuYV_qF1/ TuYV_qR1 a (B). Standardní křivka pro RT-qPCR založenou na SYBR Green I s použitím primerů TuYV_qF1/TuYV_qR1 při čtyřnásobné sérii ředění cDNA viru TuYV (1:2 až 1:128, v triplicátech). Lineární regrese vykazovala směrnici -3,3 ($R^2 = 0,9954$) a účinnost 99,5 % (Zdroj Jiban Kumar).

12. Ochranná opatření proti šíření viru žloutenky vodnice

Virus žloutenky vodnice patří mezi nejvýznamnější virové patogeny brukvovitých plodin a v současnosti představuje jeden z hlavních faktorů ovlivňujících stabilitu produkce řepky ozimé v Evropě. Vzhledem k rozsáhlému pěstování řepky napříč všemi výrobními oblastmi České republiky nelze jeho výskyt geograficky omezit na konkrétní regiony. Monitoring prováděný v posledních letech potvrdil přítomnost viru ve většině pěstitelských oblastí, včetně Českomoravské vrchoviny, jižních Čech, Karlovarska, Příbramska, Písecka, Kladenska a Mělnicka, přičemž pozitivní nálezy byly zaznamenány také na Slovensku. Intenzita výskytu mezi jednotlivými roky kolísá především v závislosti na průběhu počasí a populační dynamice přenašečů.

TuYV je polerovirus přenášený mšicemi perzistentním, cirkulativním způsobem. Mšice zůstávají po nabytí viru během sání infekční po celý svůj život, což výrazně zvyšuje účinnost šíření patogenu v porostech i mezi lokalitami. Hlavní přenašeči jsou široce rozšíření a schopní migrovat na velké vzdálenosti. Významnou roli při šíření viru hrají zejména okřídlené formy, kdy mšice nalétávají do nově založených porostů během podzimního období.

Z epidemiologického hlediska představuje zásadní problém mimořádně široký hostitelský okruh viru. TuYV infikuje nejen řepku ozimou a jarní, ale také další brukvovité plodiny, běžně pěstované druhy hořčice, cukrovou řepu, mák, svazenko či vojtěšku. Významným zdrojem infekce jsou také meziplodinové porosty, výdrol řepky, i zelinářské porosty, které umožňují přežívání viru mezi vegetačními obdobími. Virus je navíc přítomen u celé řady plevelných a planých druhů rostlin, které fungují jako dlouhodobý rezervoár infekce. Díky existenci těchto alternativních hostitelů dochází k nepřetržité cirkulaci viru v agroekosystému během celého roku a k jeho opakovanému zavlékání do nově založených porostů.

Nejvyšší riziko infekce nastává v podzimním období krátce po vzejití ozimé řepky, kdy jsou mladé rostliny k infekci nejcitlivější. Raná infekce vede k systémovému šíření viru v rostlině a k dlouhodobému narušení fyziologických procesů. Napadené rostliny vykazují sníženou intenzitu fotosyntézy, omezený růst kořenového systému, slabší větvení, žloutnutí starších listů a redukci tvorby šesulí, což se následně projevuje snížením výnosu i obsahem oleje v semenech. Mírné podzimy a teplé zimy, jejichž výskyt je v posledních letech častější, podporují přežívání a aktivitu mšic a přispívají ke zvyšování infekčního tlaku.

Součástí ochrany proti TuYV je omezení zdrojů infekce v agroekosystému. Důležitou roli hraje regulace výdrolu řepky po sklizni, důsledná herbicidní ochrana zaměřená na brukvovité plevely a vhodné řízení meziplodin, které omezuje vznik tzv. „zeleného mostu“ umožňujícího přežívání viru i jeho přenašečů mezi vegetačními obdobími. Účinnost těchto opatření je však omezená, protože významná část infekcí vzniká v důsledku migrace okřídlených mšic z okolní krajiny, často i na značné vzdálenosti.

Chemická ochrana zaměřená na regulaci přenašečů představuje důležitý nástroj zejména v raných vývojových fázích porostu. Klíčové je sledování náletů mšic a včasná aplikace insekticidů při překročení prahů škodlivosti. Vzhledem k perzistentnímu způsobu přenosu viru však může mšice virus přenést ještě před svým usmrcením insekticidem, a proto chemická ochrana nedokáže infekci zcela zabránit, ale pouze omezit její další šíření. Možnosti chemické ochrany byly navíc v posledních letech zásadně ovlivněny legislativními změnami v Evropské unii, zejména zákazem používání neonikotinoidních insekticidů pro moření osiva polních plodin. Tyto systémově působící látky poskytovaly v minulosti účinnou preventivní ochranu mladých rostlin proti časným náletům mšic. Po jejich zákazu došlo k omezení ochrany porostů v nejcitlivějších raných fázích vývoje, což se v mnoha evropských regionech projevilo zvýšením abundance populací mšic a prodloužením období jejich aktivity. Vyšší početnost přenašečů následně zvyšuje pravděpodobnost časných infekcí a celkový infekční tlak viru. Současně roste závislost na opakovaných listových aplikacích insekticidů, což zvyšuje selekční tlak na populace mšic a podporuje

vznik rezistence vůči dostupným účinným látkám. Tyto faktory vedou ke snižování účinnosti chemické ochrany a zdůrazňují význam integrovaného přístupu k ochraně porostů.

Často diskutované posouvání termínu výsevu ke konci agrotechnické lhůty se v podmínkách střední Evropy neprokázalo jako spolehlivě účinné opatření. Aktivita hlavních přenašečů zpravidla přetrvává po celé podzimní období, a pozdější výsev proto nezaručuje snížení rizika infekce, přičemž může negativně ovlivnit vývoj porostu a jeho přezimování.

Nejúčinnější a dlouhodobě nejstabilnější možností omezení škod způsobených virem žloutenky vodnice je využívání odrůd s geneticky podmíněnou tolerancí nebo rezistencí k TuYV. Moderní hybridní odrůdy vykazují nižší akumulaci viru v rostlinách, mírnější symptomatické projevy a stabilnější výnos i při vysokém infekčním tlaku. Genetická odolnost se tak stává klíčovým pilířem integrované ochrany porostů řepky a představuje nejefektivnější způsob dlouhodobého omezení ekonomických ztrát při současném zachování vysokého produkčního potenciálu plodiny.



Obrázek 19: Odrůdový skleníkový pokus po odstranění síťového krytu a insekticidním ošetření (zdroj: Lucie Slavíková).



Obrázek 20: Odrůda Sidney, vlevo kontrolní rostlina, vpravo infikovaná (zdroj: Lucie Slavíková).

13. Srovnání novosti postupů

Předkládaná metodika popisuje ucelený přístup k hodnocení odolnosti jednotlivých genotypů ozimé řepky vůči viru žloutenky vodnice pomocí metody real-time PCR. Inovativnost spočívá ve využití sady nově navržených, specifických primerů určených pro kvantitativní detekci TuYV v různých genotypech ozimé řepky. Sekvence těchto specifických primerů jsou chráněné ve formě užitého vzoru pod názvem Reakční směs pro kvantitativní determinaci fragmentu viru žloutenky vodnice v genotypech ozimé řepky pomocí qPCR, zapsaného u Úřadu průmyslového vlastnictví pod číslem 39457.

Navržené primery amplifikují krátké fragmenty virového genomu optimalizované pro real-time PCR analýzu:

- TuYV_qF1: TGGGGTCTGACACGCTTATG
 - TuYV_qR1: CAGCAAGGCGAGACAGAAGA
- (velikost amplikonu 105 bp)

Primery byly navrženy v konzervovaných oblastech genomu TuYV a experimentálně optimalizovány pro kvantitativní detekci viru v rostlinných pletivech. Analýza amplifikační účinnosti prokázala hodnoty 2.06 (pro TuYV_qF1/ TuYV_qR1) což odpovídá téměř ideální efektivitě PCR reakce a potvrzuje vysokou analytickou spolehlivost metody.

Tyto primery společně s navrženým postupem umožňují kvantifikovat virovou nálož ve vzorcích genotypů ozimých řepok. Jedná se o stanovení množství virové RNA (tzv. titru viru) pomocí metody RT-qPCR, jež odráží úroveň odolnosti rostlin vůči infekci virovým patogenem — nižší titr viru značí vyšší odolnost rostliny a naopak.

Významnou výhodou molekulárního přístupu je také možnost rychlého a opakovaného hodnocení infekce během jednoho vegetačního období nebo v kontrolovaných experimentálních podmínkách. Na rozdíl od klasických polních pokusů, které jsou závislé na přirozeném výskytu přenašečů a infekčním tlaku, umožňuje RT-qPCR analýza získat reprodukovatelné výsledky v kratším časovém horizontu a nezávisle na aktuálních klimatických podmínkách.

Cílem předložené metodiky není v žádném případě nahradit odrůdové pokusy. Ty jsou pro hodnocení celkového zdravotního stavu, výnosového potenciálu i z hlediska komplexního agronomického posouzení nenahraditelné. Postup uvedený v metodice však může sloužit jako nástroj pro charakteristiku odrůd s vyšší odolností k TuYV, která je současnými pěstiteli vysoce žádána.

14. Popis uplatnění metodiky

Předkládaná metodika je určena pro hodnocení úrovně odolnosti genotypů a odrůd ozimé řepky vůči infekci virem žloutenky vodnice na základě kvantifikace virové nálož v rostlinných pletivech metodou RT-qPCR. Metodika představuje praktický, diagnostický a hodnoticí nástroj využitelný zejména ve výzkumných laboratořích zabývajících se rostlinnou virologií, zdravotním stavem porostů a molekulární diagnostikou rostlinných patogenů, ale také ve šlechtitelských programech zaměřených na vývoj odrůd se zvýšenou odolností vůči virovým chorobám.

Hlavním přínosem metodiky je možnost objektivního a kvantitativního posouzení míry odolnosti jednotlivých genotypů ozimé řepky vůči TuYV, což umožňuje přesnější selekci perspektivních materiálů již v raných fázích šlechtitelského procesu. Na rozdíl od klasického hodnocení založeného na vizuálním posuzování symptomů nebo dlouhodobých polních pokusech poskytuje metoda RT-qPCR reprodukovatelné výsledky nezávislé na aktuálních klimatických podmínkách a intenzitě přirozené infekce. Metodika tak významně urychluje proces hodnocení

odolnosti vůči viru žloutenky vodnice a umožňuje testování většího počtu genotypů v kratším časovém období.

Uplatnění metodiky je rovněž významné v oblasti monitoringu zdravotního stavu porostů a výzkumu epidemiologie TuYV. Kvantifikace virové RNA umožňuje sledovat dynamiku infekce v průběhu vegetace, hodnotit účinnost ochranných opatření a analyzovat vztah mezi úrovní infekce a výnosovými parametry rostlin. Získaná data mohou sloužit jako podklad pro optimalizaci pěstitelských postupů a pro zpřesnění doporučení týkajících se ochrany porostů.

Metodika má zároveň přímý aplikační dopad na zemědělskou praxi. S rostoucím tlakem virových chorob a současným omezením dostupnosti účinných insekticidů v Evropské unii nabývá význam pěstování odolných odrůd jako klíčového prvku integrované ochrany rostlin. Využití metodiky umožní cílenější výběr odrůd s vyšší úrovní tolerance či rezistence, což může vést ke snížení potřeby insekticidních zásahů proti přenašečům virů, omezení produkčních nákladů a současně ke snížení environmentální zátěže.

V dlouhodobém horizontu metodika přispívá k zavádění moderních molekulárních přístupů do hodnocení zdravotního stavu plodin a podporuje přechod od reaktivní ochrany založené převážně na chemických zásazích k preventivním strategiím využívajícím genetickou odolnost rostlin. Tím napomáhá stabilizaci produkce řepky ozimé, zvýšení ekonomické efektivity pěstování a udržitelnějšímu řízení ochrany rostlin v podmínkách současného zemědělství.

15. Ekonomické aspekty

Řepka ozimá patří mezi ekonomicky nejvýznamnější tržní plodiny a při dobré úrovni agrotechniky, výživy a ochrany dosahuje běžně výnosu 3 t·ha⁻¹ i více. Při průměrné výkupní ceně přibližně 10 000 Kč za tunu představuje 15% snížení výnosu ekonomickou ztrátu přibližně 4 500 Kč na hektar. Další ekonomické ztráty vznikají v důsledku snížení olejnatosti semen a zhoršení kvalitativních parametrů produkce, včetně možného zvýšení obsahu kyseliny erukové, což může negativně ovlivnit realizační cenu komodity. Skutečné ekonomické dopady infekce tak mohou být ve výsledku ještě vyšší.

Zavedení metodiky umožňuje efektivnější selekci odolných odrůd a genotypů již v raných fázích šlechtění, což vede k dlouhodobému snížení produkčních rizik a stabilizaci výnosů. Nepřímým ekonomickým přínosem je rovněž možnost optimalizace ochranných opatření a snížení potřeby opakovaných insekticidních zásahů proti přenašečům viru, jejichž účinnost je navíc v současnosti omezována legislativními restrikcemi v Evropské unii.

Odhad nákladů na zavedení postupů

Zavedení metodiky vyžaduje laboratorní vybavení umožňující molekulární analýzy metodou RT-qPCR, zejména real-time PCR cykler, zařízení pro izolaci nukleových kyselin a standardní molekulárně-biologické vybavení. Pořizovací náklady těchto přístrojů jsou relativně vysoké, avšak většina diagnostických a výzkumných laboratoří již tímto vybavením běžně disponuje. Implementace metodiky proto zpravidla nevyžaduje zásadní dodatečné investice, ale pouze zavedení standardizovaného pracovního postupu.

Odhad nákladů na kvantifikaci viru žloutenky vodnice ve vzorcích ozimé řepky

Náklady na testování odolnosti jednoho genotypu zahrnují experimentální inokulaci, pěstování rostlin, izolaci RNA a následnou kvantifikaci virové nálože metodou RT-qPCR. Každý genotyp je hodnocen ve třech biologických opakováních, přičemž v každém opakování je analyzováno deset infikovaných rostlin a pět kontrolních rostlin.

Celkový počet analyzovaných vzorků tak činí 45 rostlin na genotyp.

Průměrné náklady na analýzu jednoho vzorku (jedné rostliny) metodou RT-qPCR dosahují přibližně 1 150 Kč, což zahrnuje spotřební materiál, reagentie, laboratorní práci a amortizaci přístrojového vybavení. Celkové náklady na kompletní hodnocení jednoho genotypu se proto pohybují přibližně okolo 50 000 Kč.

Přestože jsou vstupní náklady na laboratorní hodnocení relativně vysoké, ve srovnání s dlouhodobými polními pokusy představuje metodika ekonomicky efektivní řešení. Umožňuje rychlou selekci perspektivních materiálů a eliminaci náchylných genotypů již v raných fázích šlechtění, čímž dochází k významné úspoře nákladů spojených s víceletým testováním v polních podmínkách. V dlouhodobém horizontu tak přínosy metodiky převyšují náklady na její aplikaci, zejména díky stabilizaci výnosů, snížení ztrát způsobených virovou infekcí a optimalizaci ochrany porostů.

16. Seznam použité související literatury

1. 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.
2. 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.
3. Farzadfar, S.; Pourrahim, R. (2017): Molecular detection of Turnip yellows virus (TuYV) infection of alfalfa in Iran. *Australasian plant disease notes* 12, 1-4.
4. Hertel, K.; Schwinghamer, M.; Bambach, R. (2004): Virus diseases in canola and mustard- Agnote DPI 495, 1. st edition.
5. 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.
6. Jones, R. A. C. (2006): Control of plant viruses disease. *Advances in Virus Research* 67, 205-244
7. 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.
8. 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.
9. Kazda, J.; Ryšánek, P. (2011): Virové choroby řepky. *Úroda* 59 (1), 24-26.
10. Kazda, J.; Baranyk, P. (2015): Důsledky setí převážně nemořené osiva řepky. *Úroda* 63 (2), 40-44.
11. 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.
12. Newbert, M. (2019): Knowing the enemy- the genetic diversity and host range of turnip yellows virus, an important pathogen of oilseed rape in Europe.
13. Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real – time RT – PCR. *Nucleic Acids Research* 29, e45
14. Shahraeen, N. (2012): An overview of oilseed rape (canola) virus diseases in Iran, *International Research Journal of Microbiology* 3(1), 024-028.
15. Singh, S.K., Slavíková, L., Kumar, J. (2021): Reakční směs pro kvantifikaci viru žloutenky vodnice v kulturních a nekulturních vzorcích pomocí qPCR. Užité vzor zapsaný u UPV pod číslem 35269
16. Slavíková L., Singh S.K., Kumar J. (2021): Reakční směs pro detekci viru žloutenky vodnice v nekulturních a plevelných hostitelích pomocí RT-PCR, užité vzor zapsaný pod číslem 35270
17. Slavíková, L., Fryč, D., Kumar, J. (2024): Analysis of Twenty Years of Suction Trap Data on the Flight Activity of *Myzus persicae* and *Brevicoryne brassicae*, Two Main Vectors of Oilseed Rape Infection Viruses. *Agronomy* 14(9):1931
18. 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.

19. 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.

17. Seznam publikací, které předcházely metodice

Ibrahim, E., Rychlá, A., Alquicer, G., Slavíková, L., Peng, Q., Klíma, M., Vrbovský, V., Trebicki, P., Kundu, J. K. (2023): Evaluation of Resistance of Oilseed Rape Genotypes to Turnip Yellows Virus. Plants 12(13), 2501.

Slavíková, L., Ibrahim, E., Alquicer, G., Tomašechová, J., Šoltys, K., Glasa, M., Kundu, J. K. (2022): Weed Hosts Represent an Important Reservoir of Turnip Yellows Virus and a Possible Source of Virus Introduction into Oilseed Rape Crop. Viruses 14(11), 2511.

Slavíková, L.; Kumar, J. (2020): Virová žloutenka vodnice. Metodika pro praxi. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. 49 s.

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

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

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, 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, 10–14.

Název: Metodika stanovení odolnosti odrůd ozimé řepky vůči viru žloutenky vodnice

Autoři: Slavíková Lucie, Ibrahim Emad a Kumar Jiban

Vydal: Národní centrum zemědělského a potravinářského výzkumu, v.v.i.,
Drnovská 507, 16100 Praha 6–Ruzyně

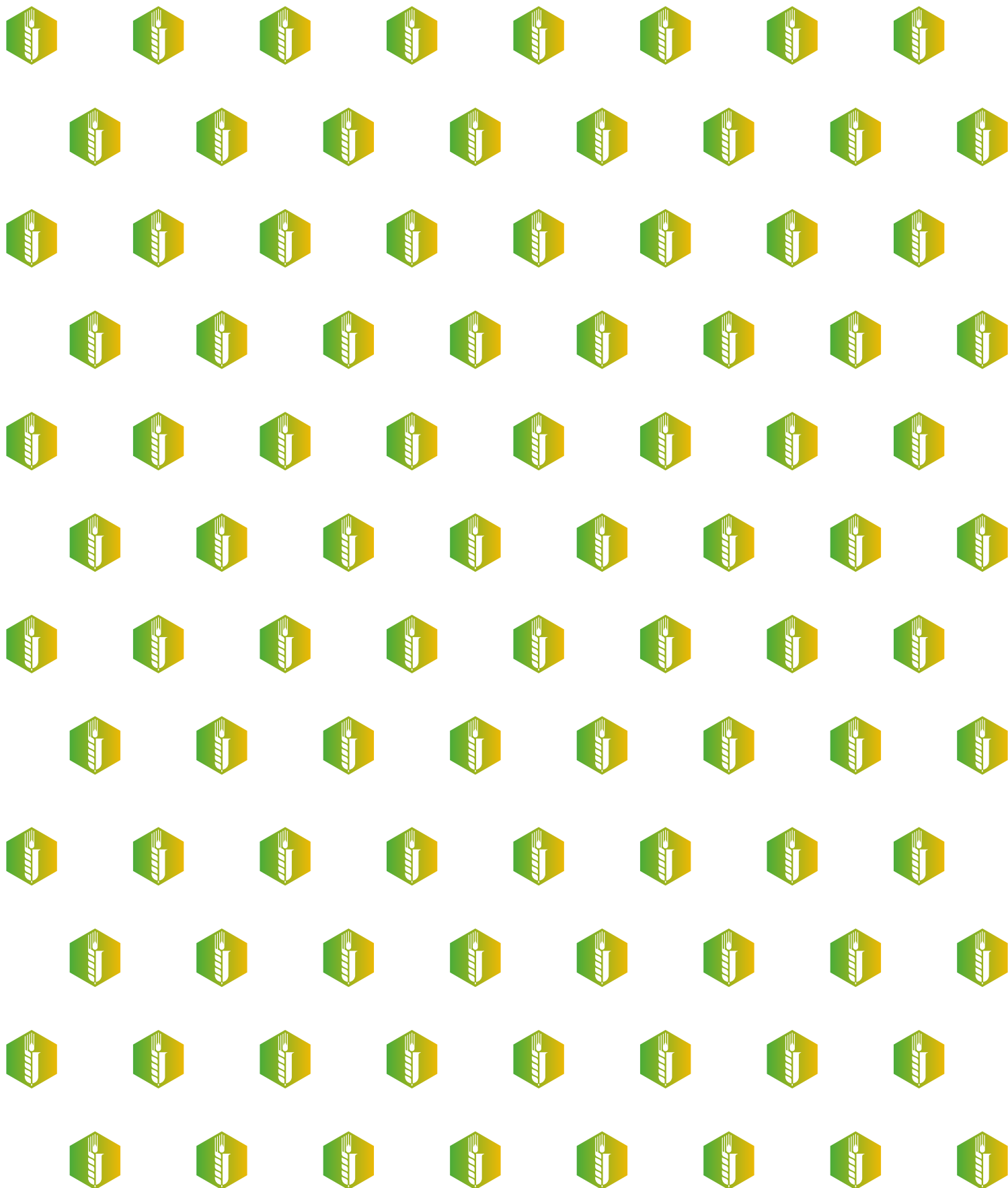
Tisk: 100 ks

Počet stran: 38

Vydání: první

Rok vydání: 2026

ISBN: 978-80-7427-447-3





**Národní centrum zemědělského
a potravinářského výzkumu**

ISBN-978-80-7427-447-3