EESTI MAAÜLIKOOL

Põllumajandus- ja keskkonnainstituut

Anette Stražev

KARTULIL ESINEVATE VIIRUSTE DNA/RNA ERALDAMISE MEETODITE VÕRDLUS NING EFEKTIIVSUSE HINDAMINE

Bakalaureusetöö

Põllumajandussaaduste tootmise ja turustamise õppekava

Juhendajad: Piret van der Sman, *MSc*

Kaire Loit, *PhD*

Saku, Tartu 2022/2023

<table>
<tr><td colspan="2">Eesti Maaülikool
Kreutzwaldi 1, Tartu 51014</td><td colspan="2">Bakalaureusetöö lühikokkuvõte</td></tr>
<tr><td colspan="2">Autor: Anette Stražev</td><td colspan="2">Õppekava: Põllumajandussaaduste tootmine ja turustamine</td></tr>
<tr><td colspan="4">Pealkiri: Kartulil esinevate viiruste DNA/RNA eraldamise meetodite võrdlus ning efektiivsuse hindamine</td></tr>
<tr><td>Lehekülgi: 62</td><td>Jooniseid: 9</td><td>Tabeleid: 3</td><td>Lisasid: 9</td></tr>
<tr><td colspan="4">Osakond: Taimetervise õppetool
Uurimisvaldkond: B390 Taimekasvatus, aiandus, taimekaitsevahendid, taimehaigused
Juhendaja(d): Piret van der Sman, MSc; Kaire Loit, PhD
Kaitsmiskoht ja aasta: Tartu, 2023</td></tr>
<tr><td colspan="4">Taimehaigused on peamised faktorid, mis vähendavad saagikust ja mõjutavad saagi kvaliteeti. Kartuli Y-viirus põhjustab olulisi kadusid põllul ning mõjutab mugulate kvaliteeti ning seetõttu on oluline seda ennetada. Antud bakalaureusetöö eesmärgiks oli leida kiireim ja efektiivseim DNA ning RNA eraldamise meetod viiruste tuvastamiseks kartuli mugulatest ja lehtedest ning võrrelda erinevate ekstraktsiooni meetodite efektiivsust erinevate taimsete algmaterjalide puhul (mugul või leht).

Töös analüüsiti seemnekartuli sorte ’Laura’ ja ’Gala’ ning Pärnumaal Tori vallas koduaias kasvatatud sorti ’Teele’. Töö viidi läbi 2021. aastal Maaelu Teadmuskeskuse Taimetervise ja mikrobioloogia laboratooriumis. Uurimistöös rakendati DNA/RNA eraldamiseks Hughes & Galau ning tsetüültrimetüülammooniumbromiid (CTAB) modifitseeritud ekstraktsiooni meetodeid. Ekstraktsioonil saadud nukleiinhappe ekstrakte analüüsiti kasutades TaqMan reaalaja polümeraasi ahelreaktsiooni metoodikat.

Käesoleva bakalaureusetöö tulemusena leiti, et erinev taimne algne materjal mõjutab nukleiinhappe ekstrakti kvaliteeti. Ka viiruse säilivus on mõjutatud ekstraktsiooni meetodist. Leiti, et fosfaatpuhvriga lahjendamine mõjutab pikaajalist säilivust ja see muudab tulemused ebastabiilseks ning seetõttu ka mitteusaldusväärseks ainult lehe materjalist. Mugulas esineva kartuli Y-viiruse tuvastamiseks on efektiivseim meetod</td></tr>
</table>

Hughes & Galau, kuid pikaajaliseks säilitamiseks sobis kõige enam fosfaatpuhver + CTAB meetod. Kartuli lehest on kartuli Y-viiruse tuvastamiseks efektiivseim CTAB pikk NaCl ekstraheerimismeetod naturaalselt positiivsete proovide puhul, kuid positiivset kontrolli sisaldavatel proovidel oli kõige sobilikum meetod CTAB pikk LiCl. Lõplike järelduste hindamiseks oleks vaja läbi viia lisakatsed rohkemate taimeviirustega ja taimsete materjalidega.

Märksõnad: kartuli Y-viirus, kartul, sort, H&G, CTAB

Estonian University of Life Sciences
Kreutzwaldi 1, Tartu 51014

Abstract of Bachelor's Thesis

Author: Anette Straževv

Specialty: Production and Marketing of Agricultural Products

Title: Comparison and evaluation of DNA/RNA extraction methods from potato

Pages: 62	Figures: 9	Tables: 3	Appendixes: 9

Department: Chair of Plant Health
Field of research: B390 Phytotechny, horticulture, crop protection, phytopathology
Supervisors: Piret van der Sman, MSc; Kaire Loit, PhD
Place and date: Tartu, 2023

Plant diseases are the main factors that reduce yields and affect crop quality. Potato virus Y causes significant losses in the field and affects tuber quality, so it is crucial to prevent it. This thesis aimed to find the fastest and most effective DNA and RNA for identifying viruses from potato tubers and leaves and to compare the efficiency of different extraction methods for various plant tissue materials (tuber or leaf).

Seed potato varieties 'Laura' and 'Gala' and the cultivar 'Teele' grown in a home garden in the municipality of Tori in Pärnumaa were analyzed in 2021 at the Plant Health and Microbiology Laboratory of the Centre of Estonian Rural Research. Hughes & Galau and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) modified extraction methods were used for DNA/RNA extraction. Nucleic acid extracts obtained from the extraction were analyzed by TaqMan Real-Time polymerase chain reaction analysis.

The different plant-based material influences the quality of the nucleic acid extract, which means that extraction and identification of potato virus Y leaves is more efficient than from tubers. The extraction method influences the quality of preservation of the various virus RNA/DNA samples. Dilution with phosphate buffer affected the long-term preservability and rendered the results unstable and, therefore, unreliable only in case of leaf material. The Hughes & Galau method was the most effective for extracting potato virus Y from potato tubers for immediate analysis on both naturally PVY-inoculated samples and experiments containing positive controls. For long-term preservation, the

phosphate buffer + CTAB method was most suitable. CTAB NaCl was the most effective extraction method for detecting potato virus Y in naturally infected potato leaves.

Still, CTAB LiCl was the most suitable method for experiments containing positive controls. For the conclusions, to replace old detection methods, more plant viruses and plant-based materials need to be tested in the future.

Keywords: potato virus Y, potato, variety, H&G, CTAB

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID 8
SISSEJUHATUS 10
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE 12
1.1. Kartul 12
1.1.1. Kartuli tähtsus 12
1.1.2. Kartuli tootmine maailmas ja Eestis 12
1.2. Taimeviirused 14
1.2.1. Taimeviiruste tähtsus 14
1.3. Kartulil esinevad viirused 15
1.4. Kartulil esinevate viiruste määramine 17
1.4.1. Hughes ja Galau ekstraktsioon 17
1.4.2. Tsetüültrimetüülammooniumbromiid ekstraktsioon 18
1.4.3. Tsütokroomi oksidaas 19
1.4.4. TaqMan Reaalaja pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsioon 19
2. MATERJAL JA METOODIKA 20
2.1. Katses kasutatav taimne materjal 20
2.2. Kartuli viiruste molekulaarne määramine 21
2.3. TaqMan Reaalaja pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsioon 21
2.4. Statistilised analüüsid 24
3. TULEMUSED 25
3.1. Sisekontrolli analüüs 25
3.1.1. Tsütokroomi oksidaasi ekstraktsioonikontroll mugulast 25
3.1.2. Tsütokroomi oksidaasi ekstraktsioonikontroll lehest 27
3.2. Kartuli Y-viirus 28
3.2.1. Naturaalsed positiivsed proovid mugulast 28
3.2.2. Positiivset kontrolli sisaldavad proovid mugulast 30
3.2.3. Naturaalsed positiivsed proovid lehest 32
3.2.4. Positiivset kontrolli sisaldavad proovid lehest 33
4. ARUTELU JA JÄRELDUSED 36
KOKKUVÕTE 39

SUMMARY 41
KASUTATUD KIRJANDUS 43
LISAD 49
Lisa 1. H&G ekstraktsioonipuhver 50
Lisa 2. CTAB ekstraktsioonipuhver 51
Lisa 3. Fosfaatpuhver 52
Lisa 4. RNA ekstraktsioon Hughes ja Galau (1988) meetodil 53
Lisa 5. RNA ekstraktsioon fosfaatpuhver + Hughes ja Galau (1988) meetodil 54
Lisa 6. CTAB-meetod – pikk meetod NaCl + fosfaatpuhver 55
Lisa 7. CTAB-meetod – pikk meetod NaCl 57
Lisa 8. CTAB-meetod – pikk meetod LiCl 59
Lisa 9. CTAB-meetod – lühike meetod 61
Lisa 9. Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ning juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta 62

KASUTATUD LÜHENDID

COX – Tsütokroomi oksidaas

Ct – tsükli tundlikkuslävi

CTAB – Tsetüültrimetüülammooniumbromiid

DNA - desoksüribonukleiinhape

dsDNA – kaheahelaline desoksüribonukleiinhape

dsRNA – kaheahelaline ribonukleiinhape

ELISA – immunoensüümmeetod

H&G – Hughes & Galau

METK – Maaelu Teadmuskeskus

PLRV – kartuli keerdlehisuse viirus

PSTVd – kartuli värtnakujulisuse viroid

PVA – kartuli A-viirus

PVM – kartuli M-viirus

PVS – kartuli S-viirus

PVX – kartuli X-viirus

PVY – kartuli Y-viirus

RNA – ribonukleiinhape

ssDNA – üksikahelaline desoksüribonukleiinhape

ssRNA – üksikahelaline ribonukleiinhape

TaqMan Reaalaja RT-PCR – TaqMan reaalaja pöörtranskriptaasi polümeraasi ahelreaktsioon

TTML – Taimetervise ja mikrobioloogia laboratoorium

SISSEJUHATUS

Kartul kuulub maavitsaliste (*Solanaceae)* sugukonda ning maavitsa (*Solanum)* perekonda, kuhu lisaks kartulile kuuluvad ka teised tähtsad kultuurid nagu tomat, paprika, baklažaan, tubakas ja vähetähtsam kultuur nagu melon (Loebenstein jt 2001: 20). Kartul on kolmas tähtsaim toiduaine maailmas, seda tänu suurele tootlikkusele vähese maapinna kohta ning vähesele veevajadusele võrreldes mõne teise põllukultuuriga (Birch jt 2012).

Taimehaigused on peamised faktorid, mis vähendavad saagikust ja mõjutavad saagi kvaliteeti. Erinevatest taimehaigustest teatakse vähim viiruste kohta ning samuti on neid kõige raskem tõrjuda. (Salazar 1996: 11) Kartuli tähtsus toidulaual on tänapäeval langenud, kuid taimehaiguste hulk aina kasvab, seetõttu on tähtis ennetada taimepatogeenide levikut. Selleks, et ennetada viirushaiguste levikut, on Euroopa Liidu seadusest tulenevalt kehtestatud supereliitseemnekartuli taimekahjustajate piirmäär. Viirusnakkuste piirmääraks supereliitseemnekartulis on 0,5 % ning seemnekartulis ei tohi esineda ohtlikke taimekahjustajaid nagu näiteks kartuli värtnakujulisuse viroidi. (Euroopa Liidu Teataja 2020, Taimede paljundamise ja sordikaitse seadus 2006, § 3 lg 1) Üks enim mõjutavaim patogeen on kartuli Y-viirus, mis mõjutab kartuli saagikust. Seda laialt levinud viirust on raporteeritud üle kogu maailma. Kartuli Y-viirus põhjustab olulisi kadusid põllul ning mõjutab mugulate kvaliteeti. (Singh jt 2012) Taimeviiruste tuvastamiseks kasutatakse peamiselt kahte meetodit, milleks on ELISA (immunoensüümmeetod) ja reaalaja pöördtranskriptaasi polümeraasi ahelreaktsioon (reaalaja RT-PCR) (Gong jt 2019). Selleks, et taimeviiruste levikut efektiivselt tõkestada peavad reguleeritud laborid rakendama usaldusväärseid ekstraktsiooni meetodeid, mis on lihtsad, kiired, tõhusad ja järjepidevad, samal ajal vähendades ristsaastumise ohtu (Smith jt 2005).

Antud bakalaureusetöös uuriti millised erinevad desoksüribonukleiinhappe (DNA) ja ribonukleiinhappe (RNA) eraldamise meetodid on kõige efektiivsemad tuvastamaks kartulil esinevaid viiruseid. Töös rakendati DNA/RNA eraldamiseks Hughes & Galau ning tsetüültrimetüülammooniumbromiid (CTAB) modifitseeritud ekstraktsiooni meetodeid. Ekstraktsioonil saadud nukleiinhappe ekstrakte analüüsiti TaqMan reaalaja polümeraasi ahelreaktsiooni analüüsiga. Ekstraktsiooni kvaliteedi kontrollimiseks kasutati COX (tsütokroom oksidaas) geeni amplifitseerivaid praimereid, seda seetõttu, et kõik taimne

materjal sisaldab tsütokroomi oksidaas geeni. Kartuli Y-viiruse (PVY) tuvastamiseks kasutati spetsiifilisi PVY praimereid. Uurimises kasutatud taimne materjal pärineb 2021. aastal Maaelu Teadmuskeskuse Taimetervise ja mikrobioloogia laboratooriumis analüüsitud seemnekartuli sortidest ning Pärnumaal Tori vallas koduaias kasvatatud kartulitaimedelt. Kasutatud kartuli sordid olid ’Gala’, ’Laura’ ja ’Teele’.

Uurimistöö eesmärgid:

1. Leida kiireim ja efektiivseim desoksüribonukleiinhappe ning ribonukeliinhappe eraldamise meetod viiruste tuvastamiseks kartuli mugulatest ja lehtedest.
2. Võrrelda erinevate ekstraktsiooni meetodite efektiivsust erinevate taimsete algmaterjalide puhul (mugul või leht).

Uurimistöö hüpoteesid:

1. Erinev algne taimne materjal (mugul või leht) mõjutab nukleiinhappe ekstrakti kvaliteeti.
2. Erinev viiruse säilivus on mõjutatud ekstraktsiooni meetodist.
3. Mugulas esineva kartuli Y-viiruse tuvastamiseks on efektiivseim meetod Hughes & Galau.
4. Kartuli lehest on kartuli Y-viiruse tuvastamiseks efektiivseim tsetüültrimetüülammooniumbromiid pikk naatriumkloriid meetod.

Tänusõnad lähevad Maaelu Teadmuskeskuse Taimetervise ja mikrobioloogia laboratooriumile, kes võimaldasid läbi viia antud bakalaureusetöö. Suured tänusõnad veel ka juhendajatele Piret van der Sman ja Kaire Loit.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Kartul

1.1.1. Kartuli tähtsus

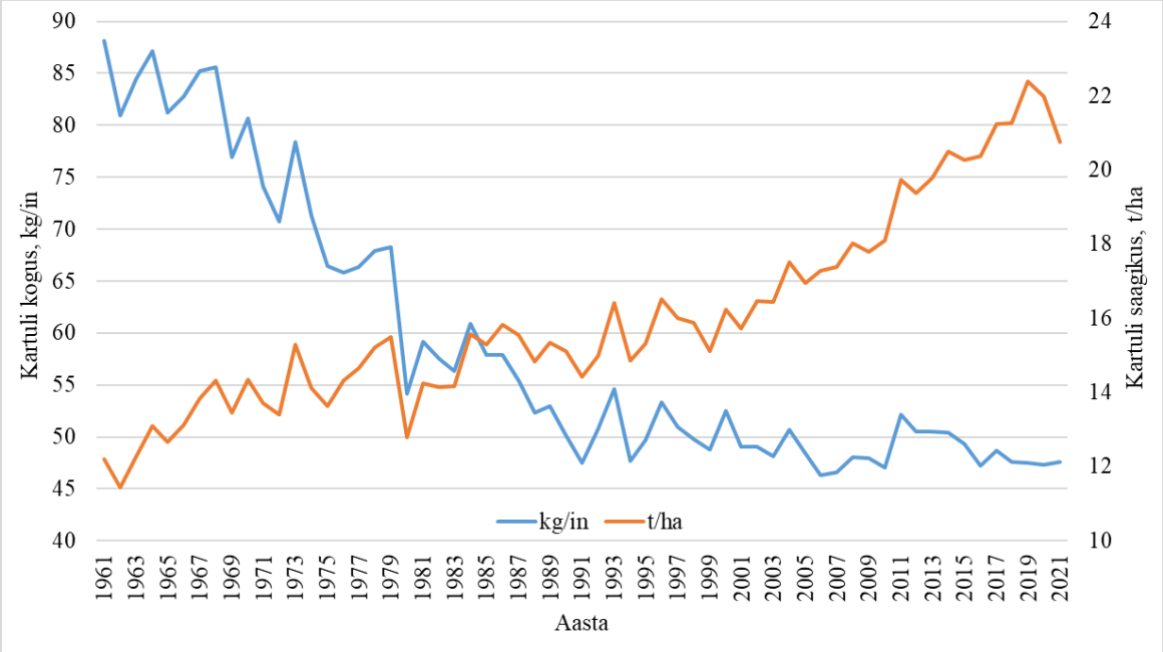
Kartulil (*Solanum tuberosum*) on kõikidest maailma kultuurtaimedest suurim metsikute esivanemate hulk. Kartuli ajalugu sai teadaolevalt alguse 14 000 aastat tagasi Lõuna-Ameerikas, kus elasid jahimehed ja korilased, kes toitusid peamiselt söödavatest looduslikest taimedest ning mille hulgas oli ka 236 erinevat liiki kartuleid. Kõige tähtsamaks kartuli liigiks kujunes välja *Solanum tuberosum*. *S. tuberosum* kodustati Andides elavate põllumeeste poolt 10 000 aastat enne Kristust. Maastikust ja kliimast tulenevalt sai kartulist seal koheselt peamine toiduaine. Katse-eksitus meetodil jõuti järeldusele, et kartulit saab paljundada seemnete või mugulate istutamise teel. (Smith 2011) Tänu Christoph Kolumbusele, kes oli maadeavastaja ja kaupmees, jõudis kartul Euroopasse, esimesena Gran Canariale ehk Hispaaniasse aastal 1567 ja 1574. aastal eksporditi kartul edasi Rouen-isse Põhja-Prantsusmaale (Hawkes, Francisco-Ortega 1993). Eestisse jõudis kartul alles 200 aastat hiljem, kõige pealt levides mõisaaedadesse ja sealt edasi talupõldudele (EE 1989 *s. v.* kartul).

Tänapäeval olenevalt piirkonnast, riigi arengust ja ajaloolistest põhjustest kasvatatakse kartulit peamiselt toiduks, loomasöödaks, tööstuslikuks kasutamiseks ja seemnemugula tootmiseks (Ortiz, Mares 2017). Kartul on hea kiudainete, kaaliumi, magneesiumi, C ja B6 vitamiinide ning antioksüdantide allikas (Zelman 2023). Kartulis sisalduvad kiudained ja kaalium aitavad tõsta vererõhku ning samuti on uuritud, et kartulis olevad orgaanilised komponendid, nagu näiteks karotenoidid, flavonoidid ja kofeiinhape, on tervisele kasulikud (Szalay Gordon 2022).

1.1.2. Kartuli tootmine maailmas ja Eestis

Kartul on ideaalne kultuur näiteks arengumaades, kus on vähe maad, aga suur populatsioon. Seda seetõttu, et kartul võrreldes peamiste teraviljadega, nagu nisu, riis ja mais, annab rohkem saaki ühe pinna- ja ajaühiku kohta. (Raigond jt 2020)

Kartuli saagikus maailmas tõusis 60 aastaga pea kaks korda 12 t/ha pealt 21 t/ha peale, kuid alates 2019. aastast on saagikus langenud umbes kaks tonni ühe hektari kohta. Selline muutlikkus kuni 2019. aastani võib olla tingitud uute kartulisortide aretusest, mis võimaldas ühelt hektarilt saada suuremat saaki kui kunagi varem. Saagikuse languse üks põhjustest võib olla ka taimepatogeenide levik. Taimehaigused nagu näiteks viirused võivad hävitada kartuli saagi täielikult, näiteks kartuli Y-viirus võib põhjustada saagikadu alates 10 % kuni 100 protsendini (Tsedaley 2015). Tarbitav kogus inimese kohta on vähenenud aastatega kokku ligikaudu 40 kilogrammi ehk võrreldes 1961. aasta 87 kg/in on sellest järele jäänud 2021. aastaks vaid 47 kg/in, põhjuseks võib olla teiste toiduainete populaarsuse suurenemine ja populatsiooni kiire kasv (joonis 1.) (FAOSTAT 2023).



Joonis 1. Kartuli tarbitav kogus inimese kohta (kg/in) ja saagikus (t/ha) maailmas (FAOSTAT 2023).

Aastal 2021 oli kartulisaak maailmas kokku 376 miljonit tonni, mida kasvatati 18 miljonil hektaril. Suurimateks tootjateks maailmas olid Hiina (94 miljonit tonni), India (54 miljonit tonni) ja Ukraina (21 miljonit tonni). Aasia moodustas maailma kogutoodangust 52,5 %, Euroopa 27,3%, Ameerika 12,3 %, Aafrika 7,5 % ja Okeaania 0,5 %. (FAOSTAT 2023)

Maailmaga võrreldes on Eestis kasvatatava kartuli keskmine saagikus samaväärne. Eestis kasvas kartul 2021. aastal 3370 hektaril ja keskmine saagikus oli 21 t/ha. 2022. aastal oli kartuli kasvupinnaks 3381 hektarit ja keskmiseks saagiks 23 t/ha. (Statistikaamet PM0281)

1.2. Taimeviirused

1.2.1. Taimeviiruste tähtsus

Viirus on nakkustekitaja, mis võib nakatada erinevaid elusorganisme, sealhulgas baktereid, taimi ja loomi. Kuna viirused on väga väikesed ja silmaga nähtamatud, kasutatakse nende vaatlemiseks elektronmikroskoopi. Viirusel on lihtne struktuur, see koosneb ühest või mitmest nukleiinhappe molekulist, mis on ümbritsetud kaitsva valgulise või lipoproteiinse kestaga (Hull 2004: 11). Viiruseid grupeeritakse vastavalt nende geneetilise materjali järgi, eristatakse DNA (desoksüribonukleiinhape) ja RNA (ribonukleiinhape) viiruseid. Nukleiinhappeid saab korraga olla viiruses vaid ühte tüüpi, kas desoksüribonukleiinhape (DNA) või ribonukleiinhape (RNA) (Loebenstein jt 2001; Smith 1977).

Viirused on võimelised paljunema ainult sobivates peremeesrakkudes (Hull 2004: 11). Viirused saavad peremeestaime rakku tungida ainult passiivsel teel ehk läbi väikese taimeosa kahjustuse või vektorite abil (Takacs jt 2014). Replikatsioon saab alguse siis, kui viirus nakatab peremeestaime, kinnitudes peremeesraku külge, läbides rakuseina ja membraani. (Loebenstein jt 2001)

Viirused vähendavad taime elujõudu ja saagikust ning nende tuvastamine on keeruline, kuna erinevatel viirustel ja nende tüvedel on suur sümptomite varieeruvus (Hooker 1981). Viiruste sümptomiteks on näiteks lehelaiksus, mosaiiksus, rõngaslaiksus, nekroos, kärbumine, triibud, laigud, leherootsu kahvatumine, keerdlehisus ja närbumine (Scholthof jt 2011). Viirushaigused võivad esineda ka latentsena ehk visuaalselt jälgitavaid sümptomeid ei ole. Iga viirusnakkus taimel algab latentse perioodiga ja üldjuhul sellel ajal ei ole taimedel esinev viirus nakkav. Nakkuse faasi jõuab tavaliselt viirus siis kui hakkavad ilmnema sümptomid, kuid osadel juhtudel võib viirus olla nakkav ka esimeses sümptomiteta faasis. (Chan, Jeger 1994)

Taimeviirused levivad selgrootute vektorite kaudu (Scholthof 2005). Looduses levivad viirused näiteks seente, nematoodide, lehetäide, ämblikute, karilaste ja mardikate kaudu (Singh 2020). Selleks, et taimeviirused suudaksid ellu jääda, tuleb neil liikuda edasi nakatatult taimelt tervele taimele. Selline liikumine saab toimuda tänu mehaanilistele vahenditele või vektoritele. 700 või rohkemast taimeviirusest levitavad umbes 70 % neid edasi lülijalgsed, nematoodid või seen-vektorid. Kõige tähtsamad vektorid on lehetäid, kes levitavad edasi rohkem kui 380 erinevat viirust. (Emden, Harrington 2017) Viirused

kanduvad edasi ka läbi vegetatiivsete taimeosade, nagu mugul, risoom, võsund, sibul, pung. Eriti oluline on vastav viiruse ülekandumine, kartulil, suhkrurool, banaanil, bataadil, peedil, (Sastry 2013) Taimeviirused levivad mehaanilisel teel põllumajanduslike tööriistadega või näiteks ka mäletsejalistega (Pagan 2022).

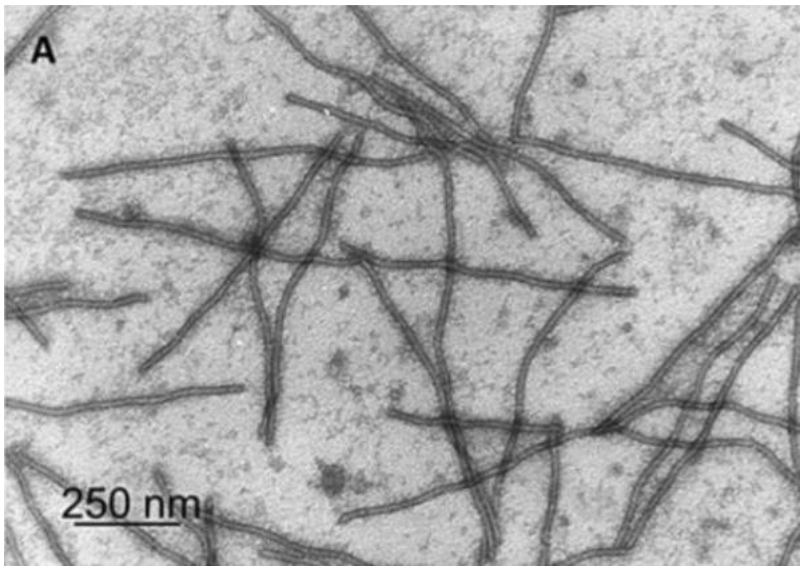
Kõik viirused kaasaarvatud taimeviirused klassifitseeritakse viiruse genoomi alusel dsDNA, ssDNA, dsDNA (RT), dsRNA, ssRNA (-), ssRNA (+) ja ssRNA (RT). dsDNA on kaheahelaline desoksüribonukleiinhappe viirus, ssDNA üksikahelaline desoksüribonukleiinhappe viirus, dsDNA (RT) pöörd-transkripteeritav kaheahelaline desoksüribonukleiinhappe viirus, dsRNA kaheahelaline ribonukleiinhappe viirus, ssRNA (-) on negatiivse polaarsusega üksikahelaline ribonukleiinhappe viirus ja ssRNA (+) on positiivse polaarsusega üksikahelaline ribonukleiinhappe viirus ning ssRNA (RT) pöörd-transkripteeritav üksikahelaline ribonukleiinhappe viirus. (Fauquet jt 2005)

1.3. Kartulil esinevad viirused

Loomuliku nakkuse teel on võimelised kartulit nakatama üle 40 erineva taimeviiruse (Deloko jt 2021). Nende viirusliikide esinemissagedus, mõju ja geograafiline levik on äärmiselt varieeruv ning sõltub suuresti vektorite esinemisest, kliimaoludest ja viirust edasi kandvate peremees põllukultuuride või taimede käitlemisest (Lacomme 2017). Kartuli X-viirus (PVX), kartuli Y-viirus (PVY) ja kartuli keerdlehisuse viirus (PLRV) on tuntud kui viirused, mis võivad tekitada tõsiseid kahjustusi kartulil. (Deloko jt 2021) Eestis määratakse kuute kartuliviirust: kartuli A-viirus (PVA), kartuli Y-viirus (PVY), kartuli X-viirus (PVX), kartuli S-viirus (PVS), kartuli M-viirus (PVM) ja kartuli keerdlehisuse viirus (PLRV) (Taimekaitseseadus 2004, § 12 lg 2). Lisaks määratakse Eestis kartuli värtnakujulisuse viroidi (PSTVd) (Taimede paljundamise ja sordikaitse seadus 2006, § 3 lg 1).

Kartuli Y-viirus on *Potyviridae* sugukonda kuuluv viirus, mis tekitab tõsiseid taimehaiguse sümptomeid ning võib oluliselt mõjutada kartuli saagikust (Tsedaley 2015). PVY on peamine patogeen maavitsaliste sugukonda kuuluvatel põllukultuuridel, nagu näiteks kartul, tubakas ja paprika (Moury 2010). PVY avastati esimest korda 20. sajandi alguses ja on siiani olnud üks enim uuritud taimeviirus. Kartuli Y-viirus tuvastati esimesena 1935. aastal tubaka taimelt, mis kasvas lähestikku eksperimentaalsete kartuli taimedega ning 1941-1942 avastati antud viirus ka Peruu ja Boliivia päritoluga kartulitelt. Euroopas põhjustasid Peruu ja Boliivia kartulid mitmeid epideemiaid 1950. aastatel. PVY kahjustab peale kartuli ja tubaka

veel ka tomatit ning paprikat. (Tsedaley 2015) Kartuli Y-viirus on kepikese kujuga ning selle genoom on positiivse polaarsusega üksikahelaline RNA (ssRNA (+)), mis koosneb 9700 nukleotiidist. Joonisel 2 on kujutatud elektronmikroskoobiga tehtud mikrofotot PVY partiklitest ehk virionidest. (Lacomme 2017)



Joonis 2. Elektronmikroskoobi mikrofoto kartuli Y-viirus osakestest (virionid) (Lacomme 2017).

Kartulil põhjustab kartuli Y-viirus mitmeid haigustunnuseid, mis väljenduvad erinevate sümptomitena. Haiguste sümptomid varieeruvad sõltuvalt viiruslikust tüvest, peremeestaimest ning kliima tingimustest, kuid ka sellest kas nakkus on primaarne või sekundaarne. Primaarne nakatamine toimub vektorite ehk lehetäide kaudu. Primaarse nakatamise tagajärjel tekkivateks sümptomiteks on kõige ülemiste taimeosade kerge kuni tõsine mosaiiksus, mida sageli seostatakse lehtede moondumisega ehk kortsumisega. Kolletumine ja nekroos esinevad sageli alumistel lehtedel. Sümptomiteks võib olla ka keskmiste lehtede varisemine ja pudenemine. Sekundaarne nakkus on siis kui seemnena kasutatav mugul on nakatunud. Sekundaarsed nakatatud taimed on kääbused ja haprad ning kortsus lehtedega. Mugula sümptomiteks on nekroos ja rõngaslaiksus. (Scholthof jt 2011)

PVY levib taimelt taimele lehetäidega, mehaaniliselt või mugulatega. Looduses levib kartuli Y-viirus paljude lehetäi liikide kaudu. Lehetäi liike, mis suudavad viirust erineva efektiivsusega edasi kanda on üle 50. Lehetäid kannavad kartuli Y-viirust edasi mittepersistentsel viisil. See võimaldab paljudel lehetäi liikidel, kes on kartulitaimes vaid juhuslikud külastajad, küllaldaselt viirust edasi kanda. Mehaaniline ülekanne toimub, kui taim on nakatunud ja selle taime kõrval asuv terve taim on saanud tuule või inimese tegevuse

tagajärjel vigastada. Seemnete mehaaniline lõikamine võib samuti kartuli Y-viirust levitada, mistõttu tuleb alati desinfitseerida kõik seadmed erinevate seemnepartiide vahel. (Tsedaley 2015)

Kartuli Y-viirus peamised leviku kontrollimise meetodid on infektsiooni vältimine ehk taimede kasvatamine sel ajal kui vektorid ei ole ilmunud või kui vektorite arvukus on madal. Samuti aitab vältida viiruse levikut samade liikide mittekasvatamine lähestikku. Oluline on hävitada seemnekartuli pealsed enne kasvuperioodi lõppu ning pihustada taimi mineraalsete õlidega, vähendades sellega viiruse edasi kandumise tõenäosust. Väga suurt rolli mängib viiruskindlate sortide aretamine ning kasvatamine. (Brunt jt 1996: 1034) Infektsiooni leviku tõkestamiseks on sätestatud nõue, et kui ettevõttes kasvatatakse lisaks seemnekartulile tarbekartulit, peab ka selle tootmiseks kasutama sertifitseeritud seemnekartulit (Taimede paljundamise ja sordikaitse seadus 2006, § 5 lg 5).

1.4. Kartulil esinevate viiruste määramine

Kartulil esinevate viiruste traditsiooniline määramine on saagikoristusjärgsete mugulate testimine, mille käigus kasvatatakse taim teatud kasvufaasini, et oleks võimalik hinnata visuaalseid sümptomeid. Lisaks visuaalsetele sümptomitele saab PVY viirust määrata kasutades immunoensüümmeetodit ehk ELISA meetodit. (Singh jt 2012) ELISA analüüs on antikehapõhine meetod, millega tuvastatakse ja kvantifitseeritakse taimemahlas olevaid märklaudorganisme. Samuti kasutatakse kartulist DNA ja RNA eraldamiseks nukleiinhappe põhiseid CTAB ekstraktsiooni meetodit ja liitiumkloriidi ehk Hughes & Galau meetodit. (Hema, Konakalla 2021) Ekstraheeritud materjalist kõige parem meetod viiruste tuvastamiseks on reaalaja RT-PCR (Rubio jt 2020).

1.4.1. Hughes ja Galau ekstraktsioon

RNA eraldamisel kasutatakse tavaliselt pindaktiivsed aineid nagu naatrium dodetsüülsulfaati ja orgaanilisi denatureerivaid toimeaineid nagu fenool või guanidiinium isotiotsüanaat, et inhibeerida ribonukleaase ning eemaldada mittenukleiinhappe komponente. Need protsessid on sobilikud paljude taimeliikide jaoks, kuid raskest materjalist nagu näiteks puuvill, ei ole vastavad protsessid sobilikud. (Hughes, Galau 1988)

Ameerika Ühendriikide Georgia ülikooli Botaanika osakonna teadurid D. Wayne Hughes and Glenn Galau töötasid välja meetodi 1988. aastal, millega õnnestus efektiivselt eraldada

puuvillast RNA-d. Edukas protseduur põhineb madalate temperatuuride kasutamises ja fenooli ning teiste orgaaniliste denatureerivate toimeainete vältimises. Hughes ja Galau ekstraktsiooni meetod on optimiseeritud variant kiirest nukleiinhappe eraldamisest, milles kasutatakse liitiumkloriidi, SDS-i (naatriumdodetsüülsulfaat) ja kaaliumatsetaadi ning isopropanooli supernatanti. Liitiumkloriidi kasutatakse, et suurendada dodetsüülsulfaati lahustuvust. (Hughes, Galau 1988) SDS reagent denatureerib sekundaarseid ja mittedisulfiidiga seotuid tertsiaarseid valgu struktuure. Kaaliumatsetaadi ülesandeks on sadestada naatriumdodetsüülsulfaat ja sellega seotud valgud, et võimaldada nende eemaldamine DNA-st. (Lab Reagents...) Isopropanool muudab DNA pelletiks ning sadestab selle lahusest (He jt 2021).

Hughes and Galau ekstraktsiooni puhul on oluline kasutada protseduuril steriilseid tarvikud. Selleks, et ekstraktsioon oleks edukas on oluline homogeniseeriva puhvri kõrge ioonide sisaldus, kõrge pH ja kõigi kolme detergendi olemasolu parimaks nukleiinhappe puhtuseks. (Hughes, Galau 1988) Ekstraheerimiseks kasutatav taimne materjal võib olla nii värske, külmutatud kui ka lüofiliseeritud ehk külmkuivatatud (Hughes, Galau 1988).

1.4.2. Tsetüültrimetüülammooniumbromiid ekstraktsioon

Tsetüültrimetüülammooniumbromiid (CTAB) meetod töötati välja 1980. aastatel ja sellest ajast on seda kasutatud mitmesuguste modifikatsioonidega erinevate taimeliikide jaoks (Till jt 2015). Meetodit kirjeldati esimest korda 1987. aastal Doyle ja Doyle poolt (Healey jt 2014). CTAB meetodist on saanud taimedest DNA ekstraheerimise ja puhastamise peamine meetod. (Tamari jt 2013) Meetodit kasutatakse ka erinevate toiduproovide jaoks (Ali jt 2017).

CTAB ekstraheerimispuhvri põhikoostis sisaldab leeliselise pH juures 2% CTAB-i, kuid nagu paljusid teisi ekstraheerimisprotokolle on ka CTAB-i muudetud vastavalt iga proovi vajadusele. Tsetüültrimetüülammooniumbromiid sadestab nukleiinhapped ja happelised polüsahhariidid madala ioontugevusega lahustes, samas kui valgud ja neutraalsed polüsahhariidid jäävad lahusesse. Järgnevalt lahustatakse CTAB nukleiinhappe sadestunud kompleks kõrge soolasisaldusega, jättes happelised polüsahhariidid sademesse. Sadestamise ja pesemisetappide jaoks kasutatakse erinevaid orgaanilisi lahusteid ja alkohole nagu näiteks fenool, kloroform, isoamüülalkohol ja merkaptoetanool. Analüüsi peamiseks puuduseks on

ajamahukus ning mürgised kemikaalid nagu fenool ja kloroform. Lisaks vajab CTAB meetod ekstraheeritud DNA täiendavat puhastamist, et vältida inhibiitoreid. (Ali jt 2017)

CTAB esimeses etapis tuleb DNA rakulisest materjalist puhastada viisil, mis takistaks nukleiinhappe lagunemist. Järgmises etapis toimub valkude lagundamine ja pindaktiivsete ainete tagajärjel lõhutakse plasma- ja tuumamebraanid, vabastades nukleiinhapped. Ekstraktsioonipuhver, mis sisaldab EDTA-d, lisatakse, et ära hoida nukleiinhapete lagunemine. Polüsahhariidide eemaldamiseks lisatakse kõrge kontsentratsiooniga tsetüültrimetüülammooniumbromiidi. (Tiwari jt 2012)

1.4.3. Tsütokroomi oksidaas

Tsütokroomi oksidaas (COX) on üks kõige tähtsam ensüüm biosünteesis. (Narayanaswamy, Veeraragavan 2020) Tsütokroomi oksidaasi ehk COX-i kasutatakse sisekontrolli analüüsiks. COX analüüsi tegemine kinnitab kas ekstraktsioon toimus edukalt ning kas polümeraasi ahelreaktsioonil DNA amplifitseerus (Hughes jt 2006).

1.4.4. TaqMan Reaalaja pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsioon

Reaalaja pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsioon (reaalaja RT-PCR) on muutunud üheks kõige olulisemaks tehnoloogiaks molekulaarsete teadus- ja arendustegevuste valdkondades (Bustin 2007). TaqMan Reaalaja pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsioon on üks tundlikumaid meetodeid mRNA tuvastamiseks ja kvantifitseerimiseks. Reaalaja RT-PCR saab kasutada madala koopia-arvuga transkriptide esinemise kontrollimiseks taimemahladest ja –kudedest. Reaalaja RT-PCR võimaldab määrata peale mRNA transkripti tuvastamise ka mRNA suhtelist kogust. (Khanna, Paoloni 2007) Antud analüüsi põhimõte on lihtne: pöördtranskriptaasi käigus sünteesitakse RNA pealt cDNA; sobiv keemia võimaldab PCR produktide tuvastamist; instrument jälgib amplifikatsiooni reaalajas; vastav tarkvara analüüsib andmeid. Sihtmärk RNA kvaliteet on kõige olulisem määraja reaalaja RT-PCR-is. Oluline on tagada RNA ekstraheerimise käigus inhibiitorite eemaldamine. (Bustin 2005)

2. MATERJAL JA METOODIKA

2.1. Katses kasutatav taimne materjal

Katsed viidi läbi 2022. aastal Harjumaal, Saku vallas, Sakus endises Põllumajandusuuringute Keskuses (PMK) ja nüüdses Maaelu Teadmuskeskuses (METK) Taimetervise ja mikrobioloogia laboratooriumis (TTML). Katsed tehti eesmärgiga leida efektiivseim ekstraktsiooni meetod kartulil esinevate viiruste tuvastamiseks mugulast ja lehest.

Kartulil esinevate viiruste DNA/RNA eraldamise meetodite võrdluse ja efektiivsuse hindamise jaoks kasutati 2021. aastal inspektorite poolt rutiinse kontrolli käigus kogutud ja laboris analüüsitud seemnekartuli proove ning analüüsiti sorte ‘Gala’ ja ‘Laura’. Lisaks analüüsiti Pärnumaal, Tori vallas, Oore külas koduaias kasvatatud sorti ‘Teele’.

Joonis 3. Oore külas koduaias kasvatatud kartuli asukoht (PRIA veebikaart 2023)

Sortidest ‘Laura’, ‘Teele’ ja ‘Gala’ võeti juhusliku valiku alusel 30 mugulat, mis jagati kolmeks nii, et iga proovi kohta oleks 10 mugulat. Analüüsiks võeti tükid kuupäevadel 26.01.2022 ja 28.01.2022 mugula mõlemast otsast, seega üks proov sisaldas 10 valitud mugula küljest võetud 20 mugulatükki. Samuti pandi karantiinkasvuhoone tingimustes kasvama 18.02.2022 kõikidest väljavalitud mugulatest taimed, mis kasvatati kolmenädala

vanusteks ja seejärel analüüsiti antud taimede lehti. Igast kasvatatud mugulatüki taimest võeti labori töötajate poolt 3 lehte. Mugulatükid ja lehed asetati DNA/RNA eraldamiseks Bioreba ekstraktsiooni kottidesse. Kõik proovid säilitati peale kogumist -20 °C juures kuni edasise analüüsimiseni.

2.2. Kartuli viiruste molekulaarne määramine

Bioreba kottidesse lisati vastavat ekstraktsioonipuhvrit (H&G (Lisa 1), CTAB (Lisa 2) või fosfaatpuhver (Lisa 3)) nii, et proovi ja puhvri suhe oleks 1/10. Proovid homogeniseeriti puhvris kasutades Homex 6 Bioreba homogenisaatorit. DNA/RNA eraldamiseks kartuli mugulatest ja lehtedest kasutati Maaelu Teadmuskeskuse Laboratooriumite Kvaliteedikäsiraamatu TTML tööjuhendeid. Mugulatest nukleiinhappe ekstraktide eraldamiseks kasutati kolme erinevat ekstraktsiooni meetodit, milleks olid H&G (Lisa 4), fosfaatpuhver + H&G (Lisa 5), fosfaatpuhver + CTAB pikk NaCl (Lisa 6). Lehtedest eraldati DNA/RNA neljal meetodil: CTAB pikk NaCl (Lisa 7), CTAB pikk LiCl (Lisa 8), CTAB lühike (Lisa 9), fosfaatpuhver + CTAB pikk NaCl. Eelnimetatud meetodid valiti sellepärast mugulast sellised, et Hughes & Galau ekstraktsiooni meetodit peetakse raskest materjalist nagu mugul nukleiinhapete eraldamisel kõige sobilikumaks, fosfaatpuhver + H&G meetod valiti, et uurida kui lahjendada algselt proove fosfaatpuhvriga, mida on lihtsam ja odavam valmistada, siis kas tulemused on samaväärsed ja võrreldavad. Mugulast DNA/RNA eraldamiseks valiti veel ka fosfaatpuhver + CTAB pikk NaCl meetod, kuna antud meetod on ajamahult kiirem kui Hughes & Galau. Lehest CTAB pikk NaCl ekstraktsioon valiti, sest see on TTML-s enim kasutatav meetod lehe materjalist ekstraktsiooni teostamiseks viiruste tuvastamisel. CTAB pikk LiCl valiti, et võrrelda NaCl ja LiCl ekstraktsiooni tulemuste erinevusi. LiCl on RNA spetsiifilisem, mis tähendab, et see sadestab ja eemaldab nukleotiididest efektiivsemalt väiksed või inkorporeerimata fragmendid (Gautam 2022). CTAB lühike valiti seetõttu, et meetodi ajamahukus on väga väike ja umbes poole lühem kui CTAB pikk ekstraktsioon. Eraldatud DNA/RNA proovid säilitati -20 kraadi juures.

2.3. TaqMan Reaalaja pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsioon

Kartuliproovidest eraldatud nukleiinhappe ekstrakte analüüsiti TaqMan Reaalaja pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsiooni (RT-PCR) meetodil. Vastavalt kartulil esinevate viiruste tuvastamise metoodikale viidi reaalaja RT-PCR läbi 96-kaevulisel PCR

plaatidel üheetapilise reaktsioonina, mahuga 25 mikroliitrit. Tabelis number 1 on välja toodud reaalaja RT-PCR-is kasutatud reaktsioonisegu komponendid ja mahud reaktsioonisegus. Reaktsiooni komponente oli kokku kümme. Esimene komponent oli destilleeritud vesi (ddH_2O), mille maht reaktsioonisegus oli 10,38 µl. Teine kümnekordne Gold puhver mahuga 2,5 µl. Kolmas magneesiumkloriid ($MgCl_2$) mahuga 5,5 µl. Neljas desoksünukleosiid trifosfaat (dNTP), mille maht reaktsioonisegus oli 2,0 µl. Viies ja kuues komponent oli pärisuunaline (F) ja vastassuunaline (R) praimer ning mõlema maht reaktsioonisegus oli 1,0 µl. Seitmendaks reaktsiooni komponendiks oli TaqMan sond mahuga 0,5 µl. Kaheksandaks oli MMLV (RevertAid), mille maht oli 1,0 µl. Üheksas komponent oli AmpliTaq Gold mahuga 0,125. Viimaseks komponendiks oli proovi eraldatud nukleiinhape, mida lisati reaktsioonisegu koostisesse 1 µl.

Tabel 1. Reaalaja RT-PCR reaktsioonisegu koostis.

Reaktsiooni komponent	Maht reaktsioonisegus (µl)	Lõpp kontsentratsioon reaktsioonisegus	Tootja
ddH_2O	10,38		
10x Gold puhver	2,5	1x	Applied Biosystems
$MgCl_2$	5,5	5,5 mM	Applied Biosystems
dNTP	2,0	800 nM	Promega
Pärisuunaline (F) praimer	1,0	300 nM	Sigma-Aldrich
Vastassuunaline (R) praimer	1,0	300 nM	Sigma-Aldrich
TaqMan sond	0,5	100 nM	Sigma-Aldrich
MMLV (RevertAid)	1,0	0,02 U/µl	Applied Biosystems
AmpliTaq Gold	0,125	0,025 U/µl	Applied Biosystems
Proovi nukleiinhape	1		

Reaalaja RT-PCR-il kasutati kahte erinevat praimeripaari (Tabel 2) ja sondi. Esimeses reaktsioonis kasutati kontrollgeeni COX F, COX R ja COX sond praimereid, et kontrollida ekstraktsiooni õnnestumist tsütokroomi oksidaas olemasoluga. Teisena kasutati kartuli Y-viiruse tuvastamiseks järgmiseid praimereid: PVY F, PVY R, PVY sond.

Tabel 2. Reealaja RT-PCR reaktsioonis kasutatud praimerid.

Märklaud-organism	Praimeri nimetus	Nukleotiidne järjestus (5´-3´)
COX	COX F	CGTCGCATTCCAGATTATCCA

	COX R	CAACTACGGATATATAAGRRCCRRAACTG
	COX sond	JOE – AGGGGCATTCCATCCAGCGTAAGCA – TAMRA
PVY	PVY F	GGGCTTATGGTTTGGTGCA
	PVY R	CCGTCATAACCCAAACTCCG
	PVY sond	FAM – TGAAAATGGAACCTCGCCAAATGTCA – TAMRA

TaqMan Reaalaja pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsiooni protsessi esimeseks etapiks oli pöördtranskriptsioon (RNA pealt sünteesitakse DNA), mis viidi läbi temperatuuril 48 °C 30 minutit (Tabel 3). Järgmiseks etapiks oli eelkuumutamine 10 minutit 98 kraadi juures. Eelkuumutamine on oluline, et lõhustada vesiniksidemed ja moodustada üksikahelaline DNA (Polymerase...). Seejärel viidi läbi 40 korduses denaturatsioon 95 °C juures 15 sekundit ning praimerite seondumine ja DNA süntees 60 °C juures üks minut. Igale analüüsile lisati juurde positiivne ja negatiivne kontroll ning üks või kaks rektsioonisegu kontrolli. Positiivse kontrollina kasutati DSMZ kartuli Y-viiruse PV-0025 puhaskultuuri ning negatiivse kontrollina Bioreba viirusvaba kontrolli.

Tabel 3. Reaalaja RT-PCR reaktsiooni protsess.

Reaktsiooni etapp	Temperatuur	Etapi pikkus	Korduste arv
Pöördtranskriptsioon	48	30 minutit	1
Eelkuumutamine	95	10 minutit	1
Denaturatsioon	95	15 sekundit	40
Praimerite seondumine ja DNA süntees	60	1 minut	40

Reaalaja RT-PCR-id viidi läbi QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System masinaga. Tulemused mõõdeti QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System tarkvaraga ning on esitatud Ct väärtustena, mis näitab reaalaja RT-PCR eksperimentides programmi tsüklite tundlikkusläve, mille juures fluorestsents on tuvastatav. Tundlikkuslävi on joon, mis määrab ära amplifikatsioonikõvera Ct väärtuse. Käesoleva meetodi puhul on Ct väärtuse ülemiseks läveks 40. Kui eksperimendis 40 tsükli jooksul fluorestsentsi tõusu ei tuvastata on proov puhas ja märklaudorganismi proovis ei esine. Enamustes reaalaja RT-PCR testides kasutatakse Ct piirväärtusena 35 – 40 tsüklit, seega kõik proovid, mille Ct väärtus jääb alla selle, loetakse positiivseks (Tennessee Depart...). METK Taimetervise ja mikrobioloogia

laboratooriumis on määratud piirväärtuseks 36. Mida madalam on tsüklite arv, seda suurem on proovis märklaudorganismi DNA/RNA koopiate arv.

2.4. Statistilised analüüsid

Katseandmed töödeldi MS Excel-is ja programmiga Statistica 13. kasutades ANOVA, Fisher LSD testi ühefaktorilist dispersioonanalüüsi. Tulemused visualiseeriti samuti MS Excel-i ja Statistica 13 programmi abil. Töös esitatud standardhälve väärtused on arvutatud MS Excel programmiga.

3. TULEMUSED

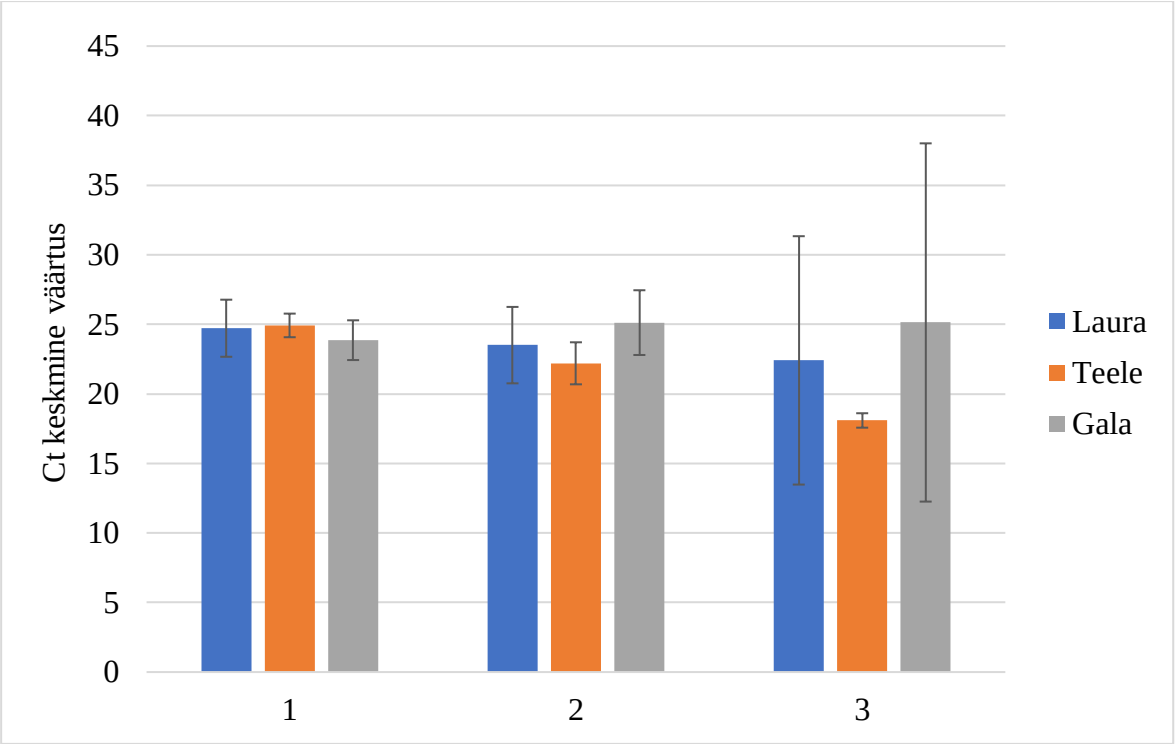
3.1. Sisekontrolli analüüs

3.1.1. Tsütokroomi oksidaasi ekstraktsioonikontroll mugulast

Ekstraktsiooni õnnestumist kontrolliti COX praimeritega, mis näitab kas proov sisaldab tsütokroomi oksidaasi geeni järjestust. Nukleiinhappe ekstraktsioon mugulast viidi läbi kolmel erineval meetodil. Esimene meetod oli Hughes & Galau, teine meetod fosfaatpuhver + Hughes & Galau ning kolmas meetod fosfaatpuhver + CTAB pikk NaCl. Saadud tulemused analüüsiti sordi põhiselt ning arvutati iga sordi kolme proovi keskmine.

Tulemuste analüüsimisel võrreldi tsütokroomi oksidaas geeni Ct väärtusi (Joonis 4). Esimese ekstraktsiooni meetodi tulemustes on näha, et kõige madalam Ct väärtus oli sordil ’Gala’ (23,9 ± 1,4), teiste sortide ’Laura’ ja ’Teele’ tsüklite arv jäi 24,7 ± 2,1 ja 24,9 ± 0,8 juurde. Teises meetodis oli kõige madalam COX tulemus sordil ’Teele’ (22,2 ± 1,5), kõige kõrgem sordil ’Gala’ (25,1 ± 2,3) ning nende vahele jäi ’Laura’ (23,5 ± 2,7). Kolmanda ekstraktsiooni meetodiga olid tulemused samas järjestuses nagu ka teise meetodiga, ’Teele’ (18,1 ± 0,5), ’Laura’ (22,4 ± 8,9) ja ’Gala’ (25,1 ± 12,9).

Tõenäosuse analüüsimiseks arvutati standardhälve, mis näitab tulemuste juhuslikkust. Kõige väiksem standardhälve meetodi kohta on esimesel meetodil, mis tähendab, et COX analüüsimiseks on antud meetod parim. Samuti on esimese meetodiga sortide vahelised tulemused kõige stabiilsemad. Suurim juhuslikkuse näit on kolmanda ekstraktsiooni meetodiga, kus sortidel ‘Laura’ ja ‘Gala’ ulatub see number üle kaheksa, mis tähendab, et tulemused varieeruvad liiga suurel määral.



Joonis 4. COX proovide Ct keskmised väärtused mugulatest. Meetod 1 – Hughes & Galau; meetod 2 – fosfaatpuhver + Hughes & Galau; meetod 3 – fosfaatpuhver + CTAB pikk NaCl. Vertikaaljooned tähistavad standardhälvet.

Kõikide katsete puhul (väljaarvatud sort ‘Gala’ üks kordus) olid kõik COX proovide Ct väärtused alla 36 tsükli, mis näitab, et katsete ekstraktsioon toimis ning toimus COX geeni amplifikatsioon. Meetodite keskmised väärtused olid vahemikus 18 – 25. Fosfaatpuhver + CTAB meetodi puhul on näha, et tulemuste varieeruvus sortidel ‘Laura’ ja ‘Teele’ on suhteliselt suur. Sort ‘Laura’ puhul olid kolme katse Ct väärtused 16, 17 ja 32 ning sort ‘Gala’ puhul 17, 17, 40. Põhjus nii suurele varieeruvusele võis tuleneda inimlikust eksimusest või vähesest proovide segamisest.

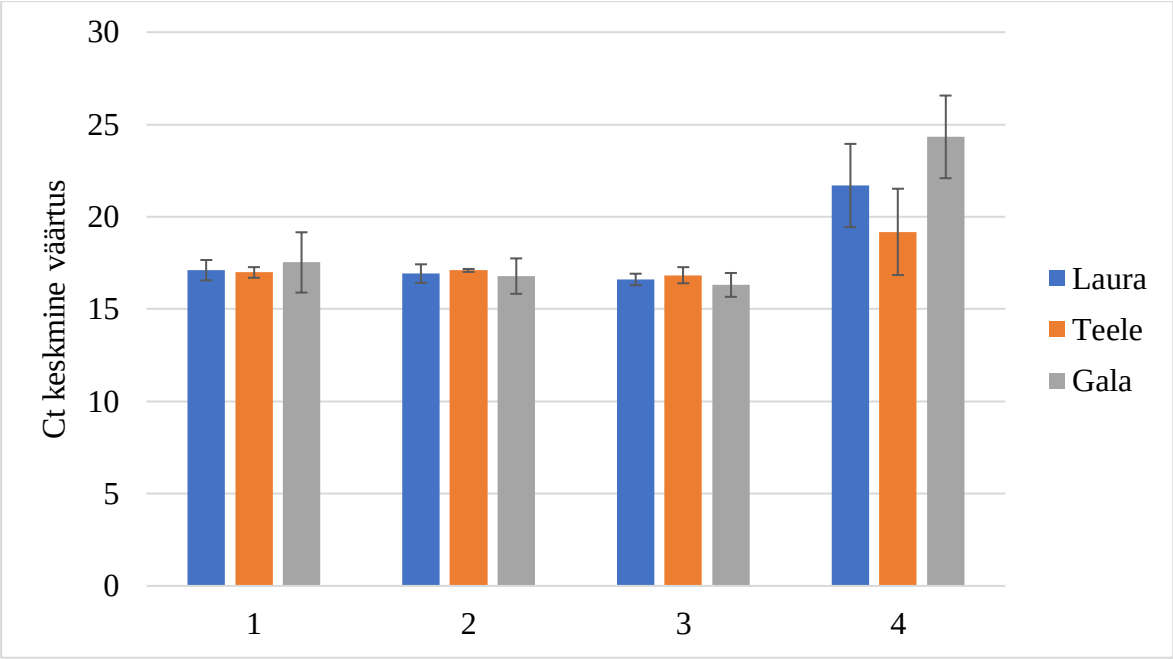
Tulemustes on ka näha sortide vahelisi Ct väärtuste erinevusi. Erinevused sortide vahel võivad olla tingitud inhibiitoritest, mida esineb igas sordis erinevalt. Kolme sordi võrdluses on ‘Teele’ Ct väärtuste varieeruvus kõige suurem tulenevalt kasutatud meetodist, mis tähendab, et antud sordis võib esineda reaalaja pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsioonil segavaid faktoreid rohkem kui sortides ‘Laura’ ja ‘Gala’. Kõige vähem esineb segavaid faktoreid sordis ‘Gala’.

3.1.2. Tsütokroomi oksidaasi ekstraktsioonikontroll lehest

Tsütokroomi oksidaasi kontroll kartuli lehe proovidest andis oodatud tulemuse. Kõikide meetoditega õnnestus ekstraktsioon ja DNA amplifikatsioon. Lehematerjalist tehti katsed neljal erineval meetodil. Esimeseks meetodiks oli CTAB pikk NaCl. Teiseks meetodiks CTAB pikk liitiumkloriidiga, kolmandaks CTAB lühike ning neljandaks ekstraktsiooni meetodiks fosfaatpuhver + H&G.

Joonisel 5 on toodud COX kontrolli tulemused lehest. Esimese meetodi tulemused kolme sordi võrdluses on sarnased. Sort Laura COX geeni Ct keskmiseks väärtuseks oli 17,1 ± 0,6, 'Teele' Ct väärtus oli parim (17,0 ± 0,3), 'Gala' tulemuseks oli 17,5 ± 1,6. Teise meetodi puhul olid Ct keskmised väärtused järgmised: sordil 'Laura' 16,9 ± 0,5, 'Teelel' 17,1 ± 0,1 ja 'Galal' 16,8 ± 1,0. Kolmanda meetodi väärtusteks olid 'Laural' 16,6 ± 0,3, 'Teelel' 16,8 ± 0,4 ning 'Galal '16,3 ± 0,6. Viimase ehk neljanda meetodi puhul on märgata kõige suuremaid erinevuseid, 'Laura' Ct keskmiseks väärtuseks oli 21,7 ± 2,3, 'Teelel' 19,2 ± 2,3 ja 'Galal' 24,3 ± 2,4.

Standardhälbe väärtus oli suurim neljandal meetodil ehk fosfaatpuhvri ja CTAB ekstraktsiooni meetodil, mis näitab, et antud meetodi tulemused on pigem juhuslikud. Kõige vähem varieerusid ekstraktsiooni meetodite tulemused kõiki sorte võrreldes kolmandal meetodil. Sortide vaheline varieerumine on minimaalne, millest saab järeldada, et kõik meetodid sobivad tsütokroomi oksidaasi tuvastamiseks kartuli lehtedest, kuid fosfaatpuhvriga lahjendamine põhjustab tulemuste suuremat varieeruvust ja kõrgemat Ct väärtust, mis võib viidata ekstraktsiooni kaasa tulevatele inhibiitoritele.



Joonis 5. COX proovide Ct keskmised väärtused lehtedest. Meetod 1 – CTAB pikk NaCl; meetod 2 – CTAB pikk LiCl; meetod 3 – CTAB lühike; meetod 4 – fosfaatpuhver + CTAB pikk NaCl. Vertikaaljooned täistavad standardhälvet.

Kõikide katsete leheproovide COX analüüsi Ct keskmised väärtused jäid alla 25, mis näitab, et kõikides proovides sisaldus tsütokroomi oksidaasi ehk proovide ekstraktsioon õnnestus. Keskmiste väärtuste vahemik sordil ‘Laura’ sõltuvalt ekstraheerimise meetodist oli 16 – 22, sordil ‘Teele’ jäi Ct väärtused vahemikku 16 – 20 ning sordil ‘Gala’ 16 – 25.

Lehe analüüsimisel sordist tingituid erinevusi nii palju ei esine kui mugulast, eriti stabiilsed on tulemused esimese kolme meetodiga ning nende meetoditega erinevused olid minimaalse ja väheolulised.

3.2. Kartuli Y-viirus

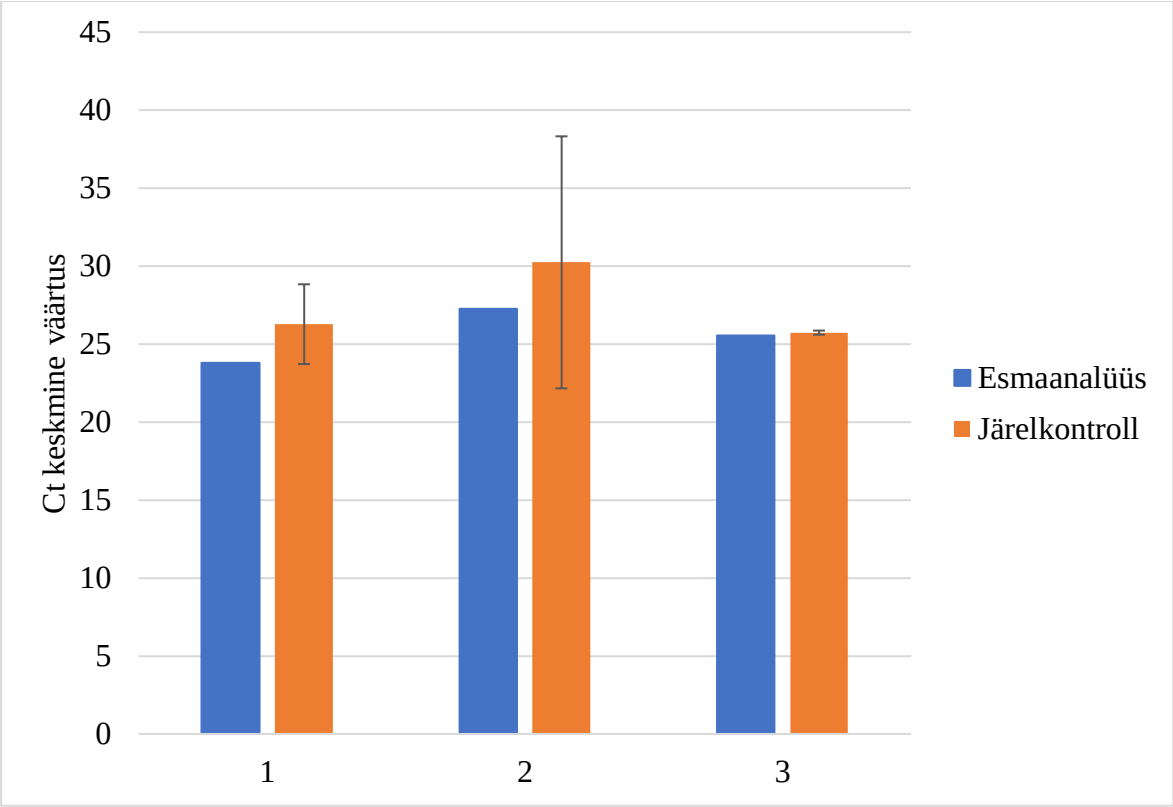
3.2.1. Naturaalsed positiivsed proovid mugulast

Analüüsiti üheksat proovi kolmest sordist, millest üks kolmest ’Laura’ sordist olev mugulaproov sisaldas loomulikku nakkust kartuli Y-viirusega. Proove analüüsiti kolmel meetodil, millest igal korral oli proovi tulemus positiivne. Esimese meetodina kasutati Hughes & Galau ekstraktsiooni meetodit, teisena modifitseeritud Hughes & Galau meetodit, kus esmalt proov homogeniseeriti fosfaatpuhvris ning kolmandana fosfaatpuhver + CTAB pikk NaCl meetodit. Proove analüüsiti antud meetoditega kahel erineval korral. Esimesel

korral viidi läbi esmaanalüüs, et tuvastada võimalikud naturaalse nakkusega positiivsed proovid. Teine kord sooritati analüüs mõned kuud hiljem kolmes korduses, et uurida kas eraldatud RNA-st on võimalik veel viiruse olemasolu tuvastada.

Esmaanalüüsi tulemused võrreldes järelkontrolli tulemustega olid madalama Ct väärtusega, mis viitab, et aja käigus viirusliku RNA hulk väheneb proovis sõltuvalt ekstraktsioonimeetodist (joonis 6). Esimese meetodi esmaanalüüsi Ct tulemuseks saadi 23,8 ning järelkontroll oli 26,3 ± 2,6. Teise meetodi esmaanalüüsi Ct väärtus oli 27,3, kuid paari kuu möödudes on tulemuste varieeruvus suur (30,2 ± 8,1) ning üks kolmest proovist oli negatiivne. Kolmanda meetodi analüüsimisel oli Ct väärtus esmaanalüüsil 25,6 ning järelkontrollil 25,7 ± 0,1. Kolmanda meetodi tulemused näitasid väga head stabiilsust ja ka visuaalselt ilusaid graafikuid.

Standardhälbe tulemuste analüüsimisel selgus, et viimane ehk kolmas meetod on kõige väiksema varieeruvusega, millest saab välja lugeda, et tulemusi saab usaldada ja analüüs toimib. Küll aga ei saa lugeda teist meetodit siiski usaldusväärseks, kuna mõned kuud hiljem tehtud analüüsi tulemused varieeruvad liigsel määral. See näitab, et antud meetodit võib kasutada koheseks analüüsiks, kuid meetod ei sobi, kui on soov viiruslikku RNA-d säilitada.



Joonis 6. Sort ’Laura’ naturaalse positiivse kartuli Y-viirus mugulaproovi esmaanalüüside ja järelkontrollide Ct väärtuste võrdlus. Meetod 1 – Hughes & Galau; meetod 2 – fosfaatpuhver + Hughes & Galau; meetod 3 – fosfaatpuhver + CTAB pikk NaCl. Vertikaaljooned tähistavad standardhälvet.

Esmaanalüüsil kõik ekstraktsiooni meetodid suutsid tuvastada sordist ’Laura’ naturaalse positiivse proov. Naturaalsest positiivsest kartuli Y-viiruse proovist toimis esmaanalüüsil kõige efektiivsemalt esimene ehk H&G meetod ning järelkontrollil kolmanda meetodi ekstraktsioon. Teise meetodiga oli proovide vaheline erinevus kõige suurem. Esmaanalüüsil toimis fosfaatpuhver + H&G ekstraktsiooni meetod, kuid mõned kuud hiljem tehtud kontrollkatsetel oli tulemuste varieeruvus suur ning üks katse kolmest oli negatiivse tulemusega. Sellised tulemused võisid tuleneda ka inimlikust veast. Kuigi kolmanda meetodi esmaanalüüs ja järelkontroll tulemused olid kõige stabiilsemad, siis esmase analüüsi tulemus oli esimesel meetodil tundlikum (madalam Ct).

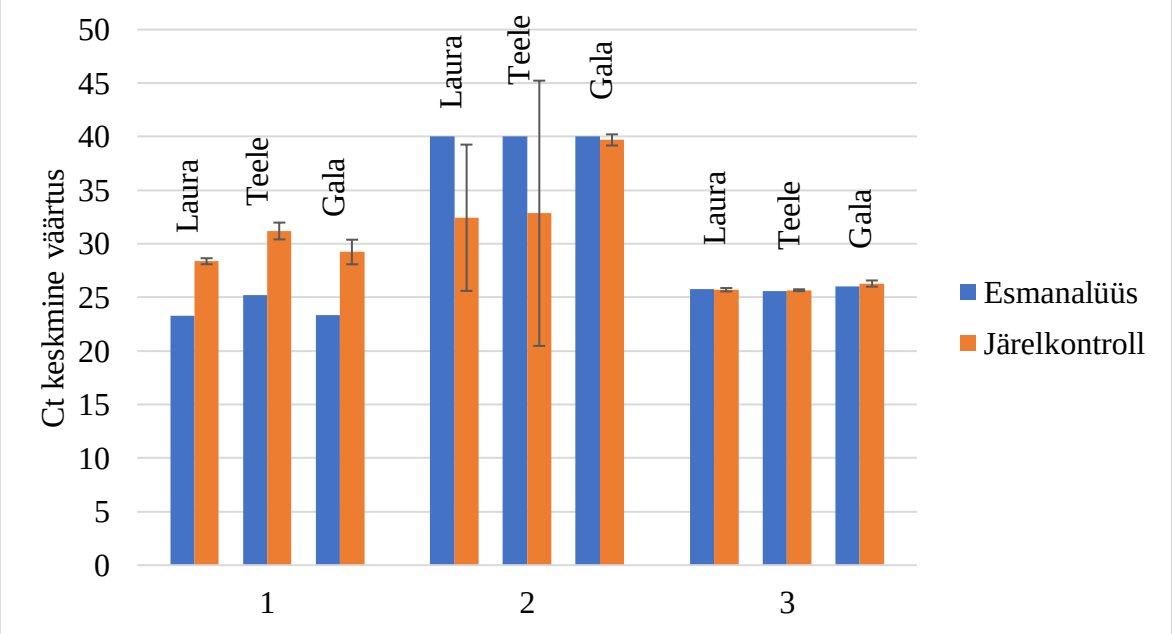
3.2.2. Positiivset kontrolli sisaldavad proovid mugulast

COX analüüsitud proovide hulgast valiti igast sordist üks proov kuhu lisati kaks mikroliitrit positiivset PVY kontrolli. Seejärel analüüsiti kolme proovi kolme erineva ekstraktsiooni meetodiga. Esimeseks meetodiks oli Hughes & Galau. Teise meetodina kasutati

fosfaatpuhver + H&G ekstraktsioon ning kolmandana fosfaatpuhver + CTAB pikk NaCl. Proovidele tehti neli kordust. Esimene katse tehti esmaanalüüsina ehk analüüsiti ühe proovi põhjal, kuidas meetodid töötavad ja ülejäänud kolm korraga mõned kuud hiljem.

Esimese meetodi ‘Laura’ esmaanalüüsi Ct väärtus oli 23,3 ja järelkontrolli 28,4 ± 0,3 (Joonis 7). ‘Teele’ tulemus esmaanalüüsis oli 25,2 ning järelkontrolli 31,2 ± 0,8. ‘Gala’ tulemused olid vastavalt 23,3 ja 29,2 ± 1,1. Teise meetodi ‘Laura’ esmaanalüüsi Ct väärtus oli 40,0 ja järelkontrolli 32,4 ± 6,8, ‘Teele’ esmaanalüüsi Ct oli 40,0 ja järelkontrolli 32,9 ± 12,4 ning ‘Gala’ esmaanalüüsi tulemus oli 40,0 ja järelkontrolli 39,7 ± 0,5. Kolmanda ekstraktsiooni meetodi tulemused olid järgmised: ‘Laura’ esmaanalüüsi 25,8, ‘Laura’ järelkontrolli 25,7 ± 0,2, ‘Teele’ esmaanalüüsi 25,6, ‘Teele’ järelkontrolli 25,7 ± 0,1, ‘Gala’ esmaanalüüsi 26,0 ‘Gala’ järelkontrolli 26,3 ± 0,3.

Standardhälve oli kolmandal meetodil peaaegu olematu ehk meetod toimis nii esmaanalüüsil kui ka järelkontrollil. Esimese meetodi tulemuste varieeruvus on samuti väike, mis näitab, et meetod on sobilik ja suudab efektiivselt tuvastada proovis sisalduvat kartuli Y-viirust. Teine ehk fosfaatpuhver + H&G ekstraktsiooni meetodi tulemuste erinevus oli liiga suur, mille põhjal saab väita, et tulemused olid juhuslikult sellised ja meetod ei ole usaldusväärne.



Joonis 7. Sortide ‘Laura’, ‘Teele’ ja ‘Gala’ kartuli Y-viiruse Ct väärtused mugulast kolmel erineval ekstraktsiooni meetodil. Meetod 1 – Hughes & Galau; meetod 2 – fosfaatpuhver + Hughes & Galau; meetod 3 – fosfaatpuhver + CTAB pikk NaCl. Vertikaaljooned tähistavad standardhälvet.

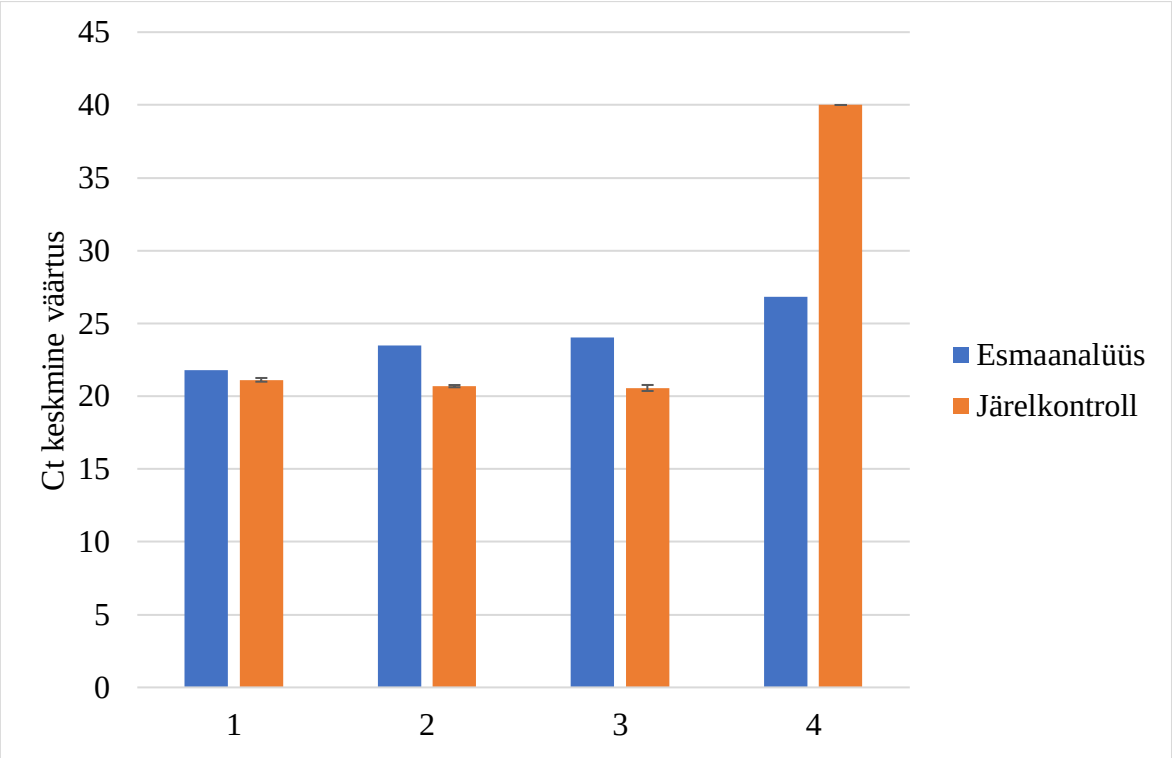
Kolmanda meetodi puhul olid erinevused vaevu märgatavad ning saab järeldada, et ekstraktsioon toimis kõikidest sortidest samaväärselt ning peale mõnda kuud olid katse tulemused sama head kui esmaanalüüsis. Esimeses meetodis esmaanalüüsi tulemused olid paremad võrreldes järelkontrolliga, mis võib olla põhjustatud sellest, et viiruslik RNA oli hakanud lagunema. Sõltumata nende tulemuste erinevusest on esimene meetod suuteline efektiivselt tuvastama viiruse olemasolu proovidest. Teise meetodi esmaanalüüsi tulemustest saab välja lugeda, et ekstraktsiooni meetod ei toiminud. Järelkontrolli tulemused näitavad samuti, et teine meetod ei ole sobilik PVY tuvastamiseks mugulast.

3.2.3. Naturaalsed positiivsed proovid lehest

Leheproovidest sisaldas naturaalselt kartuli Y-viirust sama proov, mis mugulast. Naturaalne positiivne proov pärines sordist ‘Laura’. Lehest analüüsiti PVY olemasolu neljal meetodil. Esimeseks meetodiks valiti CTAB pikk NaCl, teiseks meetodiks fosfaatpuhver + CTAB pikk NaCl, kolmandaks CTAB pikk LiCl ning neljandaks ekstraktsiooni meetodiks oli CTAB lühike.

Joonisel 8 on nelja erineva ekstraktsiooni meetodi Ct väärtuste tulemused naturaalsest positiivsest kartuli leheproovist. Esimese meetodi esmaanalüüsi tulemus oli 21,8 ning järelkontrolli 21,1 ± 0,1. CTAB pikk LiCl ehk teise meetodiga saadi esmaanalüüsi Ct tulemuseks 23,5 ja järelkontrolli 20,7 ± 0,1. Kolmanda meetodi esmaanalüüsi ja järelkontrolli tulemused olid vastavalt 24,0 ning 20,6 ± 0,2. Neljanda meetodi tulemused olid järgmised: esmaanalüüsi 26,8 ja järelkontrolli 40 ± 0.

Standardhälve oli kõikide meetodi puhul minimaalne, mis näitab, et tulemused ei olnud juhuslikud ja tulemused on usaldusväärsed. Kõigi nelja meetodi standardhälve jäi alla 0,2. Kuigi standardhälve tulemustest saab välja lugeda, et meetodid on usaldusväärsed, ei saa kasutada neljandat ehk fosfaatpuhvri ja CTAB pikk NaCl ekstraktsiooni meetodit analüüsideks kui soovitakse viiruslikku RNA-d säilitada.



Joonis 8. Sort ‘Laura’ naturaalse positiivse kartuli Y-viirus leheproovi esmaanalüüside ja järelkontrolli Ct väärtuste võrdlus. Meetod 1 – CTAB pikk NaCl; meetod 2 – CTAB pikk LiCl; meetod 3 – CTAB lühike; meetod 4 – fosfaatpuhver + CTAB pikk NaCl. Vertikaaljooned täistavad standardhälvet.

Esimese meetodi Ct väärtused jäid vahemikku 21 – 22, mis näitab, et CTAB pikk NaCl ekstraktsiooni meetod sobib kasutamiseks nii koheselt kui ka säilitatud viirusliku RNA analüüsimiseks. Samuti on esimese meetodi tulemused ka kõige paremad. Neljanda meetodi puhul on oluline märkida, et esmaanalüüs toimis, kuid järelkontrollis viirust tuvastada ei olnud võimalik. Selle põhjuseks võib olla, et RNA säilitamisel hakkab RNA lagunema ning hilisem perioodil ei saa antud meetodit viiruste tuvastamiseks kasutada.

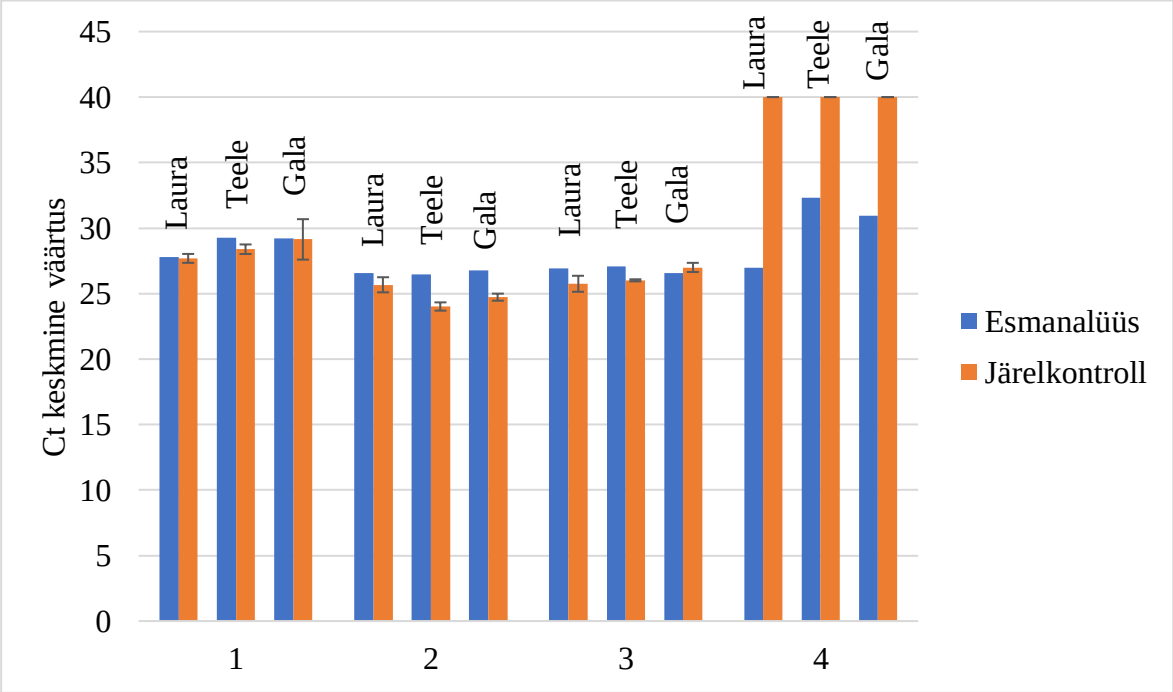
3.2.4. Positiivset kontrolli sisaldavad proovid lehest

Kartuli lehtedele lisati samadesse proovidesse kaks mikroliitrit PVY positiivset kontrolli nagu mugulatelegi. Proove analüüsiti nelja erineva ekstraktsiooni meetodiga. Esimene meetod oli CTAB pikk NaCl, teine meetod fosfaatpuhver + CTAB pikk NaCl, kolmas CTAB pikk LiCl ning neljas ekstraktsiooni meetod CTAB lühike.

Järgneval joonisel number 9 on kujutatud nelja erineva ekstraktsiooni meetodi Ct väärtuseid kolmest sordist. Leheproovidele viidi läbi ühe sordi põhjal esmaanalüüs kui ka järelkontrolli

katse. Esimese meetodi sort ‘Laura’ esmaanalüüsi Ct väärtuseks saadi 27,8 ja järelkontrolli 27,7 ± 0,3, ‘Teele’ esmaanalüüsi Ct väärtus oli 29,2 ja järelkontrolli 28,4 ± 0,4, ‘Gala’ esmaanalüüsi ja järelkontrolli tulemused olid vastavalt 29,2 ja 29,1 ± 1,5. Teise meetodi tulemused olid järgmised: ‘Laura’ esmaanalüüsi 26,6, ‘Laura’ järelkontrolli 25,7 ± 0, ‘Teele’ esmaanalüüsi 26,5, ‘Teele’ järelkontrolli 24,0 ± 0, ‘Gala’ esmaanalüüsi 26,8 ja ‘Gala’ järelkontrolli 24,7 ± 0. Kolmanda meetodi ‘Laura’ esmaanalüüsi tulemuseks oli 26,9 ja järelkontrolliks saadi 25,8 ± 0,6. ‘Teele’ ja ‘Gala’ esmaanalüüsi kolmanda ekstraktsiooni meetodiga olid üsna samaväärsed, ‘Teele’ Ct väärtus oli 27,0 ning ‘Gala’ Ct oli 26,5. ‘Teele’ järelkontrolli tulemus (26,0 ± 0,3) oli samuti peaaegu sama, mis sordil ‘Gala’ (27,0 ± 0,3). Viimase ehk neljanda meetodi tulemused sordi põhiselt olid järgmised: ‘Laura’ esmaanalüüsi 26,9 ja järelkontrolli 40,0 ± 0,6, ‘Teele’ esmaanalüüsi 32,3 ja järelkontrolli 40,0 ± 0,1, ‘Gala’ esmaanalüüsi 31,0 ja järelkontrolli 40,0 ± 0,4.

Standardhälbe väärtused jäid vahemikku 0 – 1,5, mis näitab, et katse tulemused on usaldusväärsed. Kõige suurem standardhälbe väärtus 1,5 oli esimese ehk CTAB pikk NaCl meetodiga sordil ‘Gala’ ning kõige väiksemad tulemused olid neljanda meetodiga analüüsides, kuna kõik analüüsitud proovid olid negatiivsed.



Joonis 9. Sortide ‘Laura’, ‘Teele’ ja ‘Gala’ kartuli Y-viiruse Ct väärtused mugulast neljal erineval ekstraktsiooni meetodil. Meetod 1 – CTAB pikk NaCl; meetod 2 – CTAB pikk LiCl; meetod 3 – CTAB lühike; meetod 4 – fosfaatpuhver + CTAB pikk NaCl. Vertikaaljooned täistavad standardhälvet.

Kõige efektiivselt suudab kartuli Y-viirust tuvastada teine CTAB pikk LiCl ekstraktsiooni meetod. Samuti on sobilikud PVY analüüsimiseks esimene ja kolmas meetod. Neljanda meetodi tulemustest saab järeldada, et meetod sobib koheseks analüüsimiseks, kuid kui on soov viirusliku RNA säilitada ja hiljem proove analüüsida, siis fosfaatpuhver + CTAB pikk NaCl ei ole selleks sobilik.

4. ARUTELU JA JÄRELDUSED

Kartuli Y-viirust peetakse kõige kahjulikumaks viiruseks kartulil, mis võib põhjustada märkimisväärset saagikadu ning seetõttu on oluline välja töötada erinevaid seiremehhanisme, et vältida viiruse levikut ja selle tekitatud kahjulikke mõjusid (Li jt 2023). Reguleeritud laborid peavad rakendama usaldusväärseid ekstraktsiooni meetodeid. DNA/RNA ekstraheerimismeetodid peavad olema lihtsad, kiired, tõhusad ja järjepidevad, samal ajal vähendades ristsaastumise ohtu. Lisaks on oluline ohutus ja maksumus. (Smith jt 2005) Antud bakalaureusetöös võrreldi ja hinnati erinevate DNA/RNA eraldamise meetodite efektiivsust kartulil esineva PVY viiruse tuvastamiseks.

Varasemalt kasutati kartuli viiruste määramiseks enamasti koristusjärgseid meetodeid, nagu mugulaproovide väljakasvatamine, millele lisandusid veel ka laboratoorsed testid (ELISA). Need meetodid on aeganõudvad ja ei anna tulemusi kui mugul on puhkeolekus. (Nie, Singh 2001) Seetõttu on oluline PVY leviku takistamiseks kasutada pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsiooni (RT-PCR), sest seda peetakse äärmiselt tundlikuks ja laialdaselt kasutatavaks analüüsiks (Zhang jt 2015). Selleks, et tuvastada reaalaja RT-PCR kõige efektiivsemalt kartulil esineva PVY viirust, võeti võrdluseks erinevad modifitseeritud ekstraktsiooni meetodid ja lisaks tehti igale proovile sisekontrolli analüüs, et kontrollida, kas ekstraktsioon toimus edukalt. DNA/RNA kvaliteet on enamiku amplifikatsioonipõhiste analüüside jaoks kriitiline faktor, sest inhibiitorid, mis pärinevad algsest taimsest materjalist või ekstraktsiooni kemikaalidest mõjutavad DNA/RNA amplifikatsiooni, mis võivad vähendada reaalaja RT-PCR tulemuste efektiivsust (Smith jt 2005).

Sisekontrolli analüüsil kontrolliti tsütokroomi oksidaasi geeni olemasolu, mis näitas, kas ekstraktsioon õnnestus või mitte. Tulemused näitasid, et COX geeni mugulast suudab kõige stabiilsemalt tuvastada Hughes & Galau ekstraktsioonimeetod ning lehest olid kõige stabiilsemad tulemused CTAB lühikest meetodit kasutades. COX Ct väärtused jäid olenemata sordist ja taimsest algsest materjalist alla 26. Qu jt (2007) leidsid samuti, et kartuli COX tulemused jäävad vahemikku 24,18 – 25,14. Kõige ebastabiilsem meetod nii mugulast kui ka lehest oli modifitseeritud CTAB meetod, mille puhul esmane proovi lahjendamine tehti fosfaatpuhvris. Kui mugula puhul antud meetodi tulemused varieeruvad väga suurel

määral, siis lehe tulemuste põhjal võib väita, et antud meetodi ebastabiilsus on piisavalt väike ning seda meetodit võib kasutada esmasel analüüsimisel.

Naturaalne PVY positiivne proov nii mugulast kui lehest oli sordil ’Laura’. Lisaks analüüsiti veel nii mugula kui ka lehe proove, millele lisati teatud kogus PVY positiivset kontrolli. Mugulast esmaanalüüsimisel naturaalsest positiivsest proovist ja positiivset kontrolli sisaldavast proovist oli kõige sobilikum meetod Hughes & Galau, kuid järelkontrollil näitasid kõige paremaid tulemusi fosfaatpuhver + CTAB pikk NaCl ekstraktsioonimeetod. Sipahioglu jt (2007) leidsid samuti, et kohesel analüüsimisel on kõige efektiivsem viiralse RNA eraldamiseks H&G meetod, kuid selle meetodi miinuseks on ajamahukus. Halvimad tulemused kajastusid kasutades fosfaatpuhver + H&G meetodit. Lehe naturaalsel positiivsel proovi puhul oli kõige efektiivsem meetod nii esmaanalüüsil kui ka järelkontrollil CTAB pikk NaCl, kuid positiivset kontrolli sisaldavate proovide puhul oli parimaks meetodiks CTAB pikk LiCl. Kui lehest toimisid esmaanalüüsimisel fosfaatpuhver + CTAB pikk NaCl, siis järelkontrollil olid kõik tulemused negatiivsed.

Kui võrrelda omavahel loomulikku ehk naturaalset nakkust ja positiivset kontrolli sisaldavat proove meetodi põhiselt siis CTAB pikk LiCl, CTAB lühike ja fosfaatpuhver + CTAB pikk NaCl tuvastavad loomulikku nakkust efektiivsemalt. CTAB pikk NaCl tuvastab naturaalset kui ka positiivset kontrolli sisaldavat proovi samaväärselt ja kõige efektiivsemalt.

Võrreldes mugula järelkontrolli ekstraheerimismeetodeid mõjutatuna sordist, on Hughes & Galau meetodit kasutades parimad tulemused sordil ’Laura’, siis sordil ’Gala’ ja halvimad sordil ’Teele’. Fosfaatpuhver + H&G meetodi tulemused oli sortidel ’Laura’ ja ’Teele’ võrdväärsed, kuid sordi ’Teele’ Ct väärtused olid ebastabiilsemad ning ’Gala’ tulemused olid kõik negatiivsed. Fosfaatpuhver + CTAB pikk NaCl tulemused sordipõhiselt olid parimad sordil ’Teele’, siis ’Laura’ ja halvim sordil ’Gala’. Nende tulemuste põhjal saab järeldada, et mugulal mõjutab tulemusi olenemata ekstraktsiooni meetodist kõige vähem sort ’Laura’. Lehe materjalist olid tulemused kõikide meetodite puhul erinevad. CTAB pikk NaCl ja CTAB lühike meetodit kasutades oli kõige parem tulemus sordil ’Laura’, siis sordil ’Teele’ ning viimasena sordil ’Gala’. CTAB pikk LiCl meetodil olid tulemused järgmised: parim sordil ’Teele’, järgmisena sordil ’Gala’ ja halvim sordil ’Laura’. Fosfaatpuhver + CTAB pikk NaCl tulemused olid kõik samaväärsed. Kuna ei saa välistada võimalikku sordi eripärast tulenevat erinevat ekstraktsiooni kvaliteeti, siis tuleks täpsemate järelduste

tegemiseks analüüsida samaasegselt rohkemaid sorte ning samuti lisada rohkem korduskatseid.

Kui võrrelda, kuidas mugulal sordi kohta on tulemused mõjutatud meetodi valikust, siis on kõige efektiivsem kõikide sortide puhul fosfaatpuhver + CTAB pikk NaCl meetod, millele järgneb Hughes & Galau ning fosfaatpuhver + H&G meetod. Lehest on kõige paremad tulemused CTAB pikk LiCl meetodit kasutades, millele järgneb CTAB lühike, CTAB pikk NaCl ja viimasena fosfaatpuhver + CTAB pikk NaCl.

Antud katsetest saab järeldada, et tulemusi mõjutab nii taimne algne materjal, säilivus kui ka sordi omadused. Viiruse tuvastamise tundlikkus on lehtedel suurem kui mugulatel (Peiman, Xie 2006). Selleks, et teha järelkontrolle on vaja säilitada viraalne RNA -20 °C juures, kuid tulemustest saab järeldada, et säilivus sõltub suuresti ekstraktsiooni meetodist. Fosfaatpuhvriga proovide lahjendamisel H&G meetodil tuleb arvestada, et meetod on ebastabiilne ja ei pruugi anda usaldusväärset vastust. Lehtede analüüsimisel ei sobi meetod fosfaatpuhver + CTAB pikaajaliseks säilitamiseks, kuna kõik tulemused olid negatiivsed. Sordi omadused võivad mõjutada ekstraktsiooni efektiivsust olulisel määral, sest erinevad sordid sisaldavad erinevas koguses inhibiitoreid. Suurem osa kartulimugula kuivainest koosneb sellisest inhibiitorist nagu tärklis (Grommers, van der Krogt 2009).

Katsed viidi läbi METK TTML laboratooriumis, mis tähendab, et oluline on valida labori jaoks kõige efektiivsem meetod, kuid ka kõige jätkusuutlikum ehk oluline on ekstraktsiooni meetodite maksumus. Ühe proovi hind sisaldades kemikaale ja tarvikuid on H&G-l 1,66 €, CTAB pikk NaCl maksab 0,61 € ja CTAB lühike 0,94 €. Fosfaatpuhvriga proovide lahendamine muudab H&G ning CTAB pikk NaCl meetodi odavamaks, sest ekstraktsioonipuhvri mahtu vähendatakse poole võrra. Fosfaatpuhvri maksumus proovi kohta on umbes paar eurosenti. Kuna enamus kartulianalüüse TTML laboris sooritatakse mugulast ja mugulaanalüüsil kõige stabiilsemaks tulemuseks osutus fosfaatpuhver + CTAB ning ka hinna poolest on see variant kõige soodsam, siis tasub kaaluda sellele meetodile üle minekut.

KOKKUVÕTE

Antud bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida milline kartulil esinevate viiruste desoksüribonukleiinhappe ja ribonukleiinhappe eraldamise meetod on efektiivseim ja kiireim sõltuvalt algsest taimsest materjalist, sordist ja säilivusest. Katsetes, mis teostati 2022. aastal, analüüsiti kolme erinevat kartuli sorti: ’Laura’, ’Teele’ ja ’Gala’. Mugulatest viidi läbi kolm erinevat ekstraktsiooni meetodit: Hughes & Galau, fosfaatpuhver + Hughes & Galau ja fosfaatpuhver + CTAB pikk NaCl. Lehti analüüsiti neljal erineval meetodil, milleks olid CTAB pikk NaCl, CTAB pikk LiCl, CTAB lühike ja fosfaatpuhver + CTAB pikk NaCl.

Käesoleva töö alguses püstitati neli hüpoteesi. Esimene hüpotees oli, et erinev algne materjal mõjutab nukleiinhappe ekstrakti kvaliteeti. Antud hüpotees sai kinnitust ja tulemustest selgus, et kartuli lehtedest on kartuli Y-viiruse ekstraheerimine ja tuvastamine efektiivsem kui mugulast.

Teine hüpotees, et erineva viiruse säilivus on mõjutatud ekstraktsiooni meetodist, leidis kinnitust. Leiti, et lehtedest ekstraktsioonil fosfaatpuhvriga lahjendamine mõjutab pikaajalist säilivust. See muudab tulemused ebastabiilseks ja ei ole seetõttu usaldusväärsed, kuid samal ajal mugulas sellist efekti ei esinenud.

Kolmas hüpotees oli, et mugulas esineva kartuli Y-viiruse ekstraheerimiseks on efektiivseim meetod Hughes & Galau. Antud hüpotees sai osalise kinnituse. Hughes & Galau meetod oli kõige efektiivsem koheseks analüüsimiseks nii naturaalselt positiivsetel proovidel kui ka positiivset kontrolli sisaldavatel proovidel, kuid pikaajaliseks säilitamiseks sobis kõige enam fosfaatpuhver + CTAB meetod.

Neljas hüpotees, et kartuli lehest on kartuli Y-viiruse tuvastamiseks efektiivseim tsetüültrimetüülammooniumbromiid pikk naatriumkloriid meetod, sai osaliselt kinnitust. CTAB pikk NaCl ekstraheerimismeetod oli efektiivseim naturaalselt positiivsete proovide puhul, kuid positiivset kontrolli sisaldavatel proovidel oli kõige sobilikum meetod CTAB pikk LiCl.

Lõplike järelduste hindamiseks oleks vaja läbi viia edasised uurimised, et kinnitada saadud tulemusi ja hinnata, milline ekstraktsiooni meetod on efektiivseim. Samuti kui on Maaelu Teadmuskeskuse Taimetervise ja mikrobioloogia laboratooriumil soov tulevikus minna üle uutele meetoditele on vajalik teha suuremahulised katsed rohkemate taimeviirustega ja taimsete materjalidega, sest tegu on akrediteeritud laboriga ning iga muudatus tööprotsessis peab olema valideeritud/verifitseeritud.

SUMMARY

The aim of this thesis was to investigate which method of deoxyribonucleic acid and Ribonucleic acid isolation from potato viruses is the most efficient and rapid depending on the original plant-based material, variety and preservability. The experiments, carried out in 2022, analysed three different potato varieties: ’Laura’, ’Teele’ and ’Gala’. Three different extraction methods were performed on the tubers: Huges ja Galau, phosphate buffer + Hughes ja Galau and phosphate buffer + CTAB NaCl. Leaves were analysed by four different methods: CTAB NaCl, CTAB LiCl, short CTAB and phosphate buffer + CTAB NaCl.

At the beginning of this thesis, four hypotheses were put forward. The first hypotheses was that different plant-based materials affect the quality of the nucleic acid extract. This hypotheses was confirmed and the results showed that extraction and identification of potato virus Y from potato leaves is more efficient than from tubers.

The second hypothesis, that the different virus preservability is influenced by the extraction method, was confirmed. It was confirmed that dilution with phosphate buffer from leaves sampled affects long-term preservability. This renders the results unstable and therefore unreliable, but the same affect was not confirmed in tubers.

The third hypothesis was that Hughes ja Galau’s method is the most effective for the extraction of potato virus Y from tubers. This hypothesis was partially confirmed. The Hughes ja Galau method was the most effective for immediate analysis on both naturally positive samples and samples containing positive controls, but for long-term preservation the phosphate buffer + CTAB method was the most suitable.

The fourth hypothesis, that the Cetyltrimethylammonium bromide sodium chloride method is the most effective method for the identification of potato virus Y from potato leaves, was partially confirmed. The CTAB NaCl extraction method was the most effective for naturally positive experiments, but for experiments containing positive controls, CTAB LiCl was the most appropriate method.

To assess the final conclusions further studies would be needed to confirm the resultants and to evaluate which extraction method is the most effective. Also, if the Centre of Estonian Rural Research and the Knowledge Laboratory of Plant Health and Microbiology have the desire to move to new methods in the future, it will be necessary to carry out large-scale experiments with more plant viruses and plant-based materials, because of the lab accreditation all the changes in work procedures have to be validated and/or verified.

KASUTATUD KIRJANDUS

Ali, N., Rampazzo, R. C. P, Costa, A. D. T., Krieger, M. A. (2017). Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. – *National Library of Medicine*. [e-ajakiri] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5529626/ (17.04.2023)

Aphids as Crop Pests. (2017). /Ed. H. F. van Emden, R. Harrington. Wallingford: CAB International. [*on-line*] ebrary https://books.google.ee/books?hl=en&lr=&id=tH46DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA323&dq=transmission+of+plant+viruses&ots=QAZ3qMxlyq&sig=YR1v2_yOduNOk92qWqqoU0y8Fwk&redir_esc=y#v=onepage&q=transmission%20of%20plant%20viruses&f=false (18.05.2023)

Bioreba. (s.a). BIOREBA Homogenizers and Extraction Bags. [veebileht] https://www.bioreba.ch/saas/CustomUpload/374O357O340O370O356O369O350O321O360O366O369O356O353O352O350O320O326O/Homogenizers_and_Extraction_Bags.pdf (13.04.2023)

Birch, P. R. J., Bryan, G., Fenton, B., Gilroy, E. M., Hein, I., Jones, J. T., Prashar, A., Taylor, M. A., Torrance, L., Toth, I. K. (2012). Crops that feed the world 8: Potato: Are the trends of increased globaal production sustainable?. – *Food Security*. Nr. 4. [e-ajakiri] (14.03.2023)

Brunt, A. A., Grabtee, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J., Watson, L. (1996). Viruses of Plants. New York: CABI Publishing. 1034 lk. (17.04.2023)

Cambio. (s.a). Lab Reagents: Smart Buffers and Reagents. [veebileht] https://www.cambio.co.uk/1283/77/products/potassium-acetate/ (11.05.2023)

Chan, M.-S., Jeger, M. J. (1994). An Analytical Model of Plant Virus Disease Dynamics with Roguing and Replanting. – *Journal of Applied Ecology*. Nr. 3. [e-ajakiri] https://www.jstor.org/stable/pdf/2404439.pdf (24.04.2023)

Compendium of Potato Diseases. (1981). /Ed. W. J. Hooker. USA: The American Phytopathological Society. [*on-line*] ebrary (23.03.2023)

European Pharmaceutical Review. (s.a). The real-time reverse transcription polymerase chain reaction – treat with caution. [veebileht] https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/2122/the-real-time-reverse-transcription-polymerase-chain-reaction-treat-with-caution/ (17.04.2023)

Farkas, D. H., Holland, C. A. (2009). Overview of Molecular Diagnostic Techniques and Instrumentation. – Cell https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/reverse-transcription-polymerase-chain-reaction (17.04.2023)

Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L. A. (2005). Virus Taxonomy. London: Elsevier Academic Press. (04.04.2023)

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (s.a). Crops and livestock products. [veebileht] https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL (14.03.2023)

Gautam, A. (2022). Lithium Cloride-Based Isolation of RNA. – *DNA and RNA Isolation Techniques for Non-Experts*. [e-ajakiri] https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-94230-4_8 (25.04.2023)

Gene-Quantification. (s.a). Real-Time Reverse Transcription PCR. [veebileht] bustin-qrt-pcr-review-2005.pdf (gene-quantification.de) (17.04.2023)

Gong, H., Igiraneza, C., Dusengemungu, L. (2019). Major In Vitro Techniqques for Potato Virus Elimination and Post Eradication Detection Methods. – *American Journal of Potato Research*. Nr 96. [e-ajakiri] https://link.springer.com/article/10.1007/s12230-019-09720-z (14.03.2023)

Grommers, H. E., van der Krogt, D. A. (2009). Chapter 11 – Potato Starch: Production, Modification and Uses. – *Starch*. Nr. 3. [e-ajakiri] https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780127462752000112 (16.05.2023)

Hawkes, J. G., Francisco-Ortega, J. (1993). The early history of the potato in Europe. – *Euphytica*. Nr 70. [e-ajakiri] https://link.springer.com/article/10.1007/BF00029633 (13.03.2023)

He, S., Cao, B., Yi, Y., Huang, S., Chen, X., Luo, S., Mou, X., Guo, T., Wang, Y., Wang, Y., Yang, G. (2021). DNA precipitation revisited: A quantitative analysis. – *Wiley Online Library*. Nr. 3. [e-ajakiri] https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/nano.202100152 (11.05.2023)

Healey, A., Furtado, A., Cooper, T., Henry, R. J. (2014) Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. – *Plant Methods*. Nr. 21. [e-ajakiri] https://plantmethods.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-4811-10-21 (21.04.2023)

Hema, M., Konakalla, N. C. (2021). Chapter 16 – Recent developments in detection and diagnoosis of plant viruses. – *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*. Nr. 2. [e-ajakiri] https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128214060000163?via%3Dihub (24.04.2023)

Hughes, D. W., Galau, G. (1988). Preparation of RNA from cotton leaves and pollen. – *Plant Molecular Biology Reporter*. Nr. 6. [e-ajakiri] https://link.springer.com/article/10.1007/BF02670385 (21.04.2023)

Hughes, K. J. D., Tomlinson, J. A., Griffin, R. L., Boonham, N., Inman, A. J., Lane, R. (2006). Development of as One-Step Reaö-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Diagnosis of *Phytophthora ramorum*. – *Physical Review Journals*. [e-ajakiri] https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-96-0975 (21.04.2023)

Hull, R. (2004). Plant Virology. San Diego: Elsevier Academic Press. 11 lk. (23.03.2023)

Hyndland Science Faculty. (s.a). Polymerase Chain Reaction. [veebileht] https://blogs.glowscotland.org.uk/gc/hyndsecbiohu1/polymerase-chain-reaction/ (01.05.2023)

Kartul. – EE kd. 4. Tallinn: Valgus, 1989, lk 353 (13.03.2023)

Komisjoni rakendusdirektiiv (EL) 2020/177. (2020). Supereliitseemnekartuli suhtes kohaldatavad miinimumtingimused. Tallinn: Euroopa Liidu Teataja. [veebileht] https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ET/TXT/HTML/?uri=CELEX:32020L0177#d1e524-1-1 (24.04.2023)

Li, K., Chen, R., Tu, Z., Nie, X., Song, B., He, C., Xie, C., Nie, B. (2023). Global Screening and Functional Identification of Major HSPs Involved in PVY Infection in Potato. – *Genes*. Nr. 13. [e-ajakiri] https://www.mdpi.com/2073-4425/13/4/566 (15.05.2023)

Low-Cost Methods for Molecular Characterization of Mutant Plants. (2015). /Ed. B. J. Till, J. Jankowicz-Cieslak, O. A. Huynh, M. M. Beshir, R. G. Laport, B. J. Hofinger. Vienna: International Atomic Energy Agency. [*on-line*] ebrary https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-16259-1_1 (21.04.2023)

Maaelu Teadmudkeskus. (s.a). Taimetervise ja mikrobioloogia labori teenused. [veebileht] https://metk.agri.ee/taimetervise-ja-mikrobioloogia-labor (15.04.2023)

Moury, B. (2010). A new lineage sheds light on the evolutionary history of *Potato virus Y*. – Molecular Plant Pathology. Nr 11. [e-ajakiri] https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1364-3703.2009.00573.x (16.04.2023)

Narayanaswamy, R., Veeraragavan, V. (2020). Bioactive Natural Products. – *Studies in Natural Products Chemistry*. [e-ajakiri] https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/cyclooxygenase (21.04.2023)

Nie, X., Singh, R. P. (2001). A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves, and tubers. – *Journal of Virological Methods*. Nr. 91. [e-ajakiri] https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093400002421?casa_token=TAX0fc8ZCT8AAAAA:qMmSgfkIrhwu3nGpL3hGNWb4zupXAShsoR72UEubp5iqOoL_JzQnEjCTJ2xcVGGYODnB2mbweA (15.05.2023)

Nouayti, F., Tahiri, A., Madani, I., Blenzar, A., Lahlali, R. (2018). Comparison of RNA extraction methods for the detection of BNYVV rhizomania virus from roots of sugar beet. – *Comptes Rendus Biologies*. Nr. 341. [e-ajakiri] https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1631069118301161 (24.04.2023)

Ohtlike taimekahjustajate ja nende peremeestaimede Eestisse toimetamise ja riigisiseselt edasitoimetamise ning sordiaretuses, katsetes ja muus teadustöös kasutamise nõuded ja eriloa

väljastamise kord. (vastu võetud 30.03.2007, viimati jõustunud 07.04.2007). – *Riigi Teataja*. https://www.riigiteataja.ee/akt/12814297 (22.04.2023)

Ortiz, O., Mares, V. (2017). The historical, Social, and Economic Importance of the Potato Crop. – The Potato Genome. [e-ajakiri] https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-66135-3_1 (14.03.2023)

Pagan, I. (2022). Transmission through seeds: The unknown life of plant viruses. – *PLoS Pathogens*. Nr. 18. [e-ajakiri] https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1010707 (16.04.2023)

Peiman, M., Xie, C. (2006). Sensitive detection of potato viruses, PVX, PLRV and PVS, by RT-PCR in potato leaf and tuber. – *Australasian Plant Disease Notes*. Nr. 1. [e-ajakiri] https://link.springer.com/article/10.1071/DN06017 (16.05.2023)

Plant Viruses. (1979). /Ed. K. M. Smith. USA: Halsted Press. [*on-line*] ebrary (23.03.2023)

PM0281: Põllumajandusmaa ja -kultuurid maakonna järgi. – *Eesti Statistika andmebaas*. https://andmed.stat.ee/et/stat/majandus__pellumajandus__pellumajandussaaduste-tootmine__taimekasvatussaaduste-tootmine/PM0281/table/tableViewLayout2 (21.03.2023)

Potato virus Y: biodiversity, pathogenicity, epidemiology and management. (2017). /Ed. C, Lacomme, L. Glais, D. U. Bellstedt, B. Dupuis, A. V. Karasev, E. Jacquot. Cham: Springer International Publishing AG. [*on-line*] ebrary (16.04.2023)

Potato Viruses and Their Control. (1996). /Ed. L. F. Salazar. Peru: Peru International Potato Center. [*on-line*] ebrary (13.03.2023)

Potato: a global history. (2011). /Ed. A. F. Smith. London: Reaktion Books Ltd. [*on-line*] ebrary (13.03.2023)

Potato: Nutrition and Food Security. (2020). /Ed. P. Raigond, B. Singh, S. Dutt, S. K. Chakrabarti. Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd. [*on-line*] ebrary (21.03.2023)

Põllumajanduse Registrite ja Informatsiooni Amet. (s.a). PRIA Veebikaart. [veebileht] https://kls.pria.ee/kaart/ (13.04.2023)

Qu, X., Wanner, L. A., Christ, B. J. (2007). Using the TxtAB Operon to Quantify Pathogenic Streptomyces in Potato Tubers and Soil. – *National Agricultural Library Digital Collections*. Nr. 4. [e-ajakiri] https://naldc.nal.usda.gov/download/61434/PDF (21.04.2023)

Rubio, L., Galipienso, L., Ferriol, I. (2020). Detection of Plant Viruses and Disease Management: Relevence of Genetic Diversity and Evolution. – *Front Plant Sci*. Nr. 11. [e-ajakiri] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7380168/ (24.04.2023)

Sastry, K. S. (2013). Plant Virus Transmission Through Vegetative Popagules (Asexual Reproduction. – *Seed-borne plant virus diseases.* [e-ajakiri] https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-81-322-0813-6_9 (18.05.2023)

Scholthof, H. B. (2005). Plant virus transport: motions of functional equivalence. – *Trends in Plant Science*. Nr. 10. [e-ajakiri] https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1360138505001512 (16.04.2023)

Scholthof, K-B. G., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jaquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C., Foster, G. D. (2011). Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. – *Mol Plant Pathol*. Nr. 12. [e-ajakiri] https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22017770/ (23.03.2023)

Seemnekartuli kategooriad ning seemnekartuli tootmise ja turustamise nõuded. (vastu võetud 03.05.2006, viimati jõustunud 01.01.2022). – *Riigi Teataja.* https://www.riigiteataja.ee/akt/110082012009?leiaKehtiv (24.04.2023)

Singh, M., Singh, R. P., Fageria, M. S., Nie, X., Coffin, R., Hawkins, G. (2013). Optimization of a Real-Time RT-PCR Assay and its Comparsion with ELISA, Conventional RT-PCR and the Geow-out Test for Large Scale Diagnosis of Potato virus Y in Dormant Potato Tubers. – *American Journal of Potato Research*. Nr. 90. [e-ajakiri] https://link.springer.com/article/10.1007/s12230-012-9274-z (24.04.2023)

Singh, S., Awasthi, L. P., Jangre, A. (2020). Transmission of plant viruses in fields through various vectors. – Applied Plant Virology. [e-ajakiri] https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128186541000244 (16.04.2023)

Sipahioglu, H. M., Ocak, M., Usta, M. (2007). Comparsion of Three Conventional Extraction Methods for the Detection of Plant Virus/Viroid RNAs from Heat Dried High-phenolic Host Leaves. – *Asian Journal of Plant Sciences*. Nr. 6. [e-ajakiri] https://www.researchgate.net/publication/26555759_Comparison_of_Three_Conventional_Extraction_Methods_for_the_Detection_of_Plant_VirusViroid_RNAs_from_Heat_Dried_High-phenolic_Host_Leaves (16.05.2023)

Smith, D. S., Maxwell, P. W., De Boer, S. H. (2005). Comparsion of Several Methods for the Extraction of DNA from Potatoes and Potato-Derived Products. – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Nr. 53. [e-ajakiri] https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jf051201v?casa_token=ON4Rkfsop34AAAAA%3AI-BbSh6DcvwMG2HZG3sbsqXyztWUZAS8Joalm1n4MXiNv7A4hmt4t9OLYz12pJPf5OZRXfrtvIFd40k (16.05.2023)

Szalay, J., Gordon, J. (2022). Potato nutrtion facts & health benefiits. – Live Science. [e-ajakiri] https://www.livescience.com/45838-potato-nutrition.html#section-potato-health-benefits (14.03.2023)

Zhang, J., Nie, X., Boquel, S., Al-Daoud, F., Pelletier, Y. (2015). Increased sensitivity of RT-PCR for *Potato virus Y* detection usin RNA isolated by a procedure with differential centrifugation. – *Journal of Virological Methods*. Nr. 225. [e-ajakiri] https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093415002414?casa_token=W22P8D

VZeCcAAAAA:v2VvwG62r33iW8u0jGBnM4cHahz2CMNPuSY1vU5Kjz12gwBv3ljcMClf-qXKDo4r8L7pmlHgUw (15.05.2023)

Takacs, A., Horvath, J., Gaborjanyi, R., Kazinczi, G., Mikulas, J. (2014). Hosts and non-hosts in plant virology and the effects of plant viruses on host plants. – Plant Virus-Host Interaction. [e-ajakiri] https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124115842000056 (16.04.2023)

Tamari, F., Hinkley, G. S., Ramprashad, N. (2013). A Comparsion of DNA Extraction Methods using *Petunia hybrida* Tissues. – *Journal of Biomolecular Techniques*. Nr. 24. [e-ajakiri] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3647704/ (21.04.2023)

Tennessee Departments of Helath Division of Laboratory Services. (s.a). Information on Cycle threshold (Ct) values for SARS-CoV-2. [veebileht] https://www.tn.gov/content/dam/tn/health/documents/cedep/novel-coronavirus/Ct_Fact_Sheet.pdf (25.04.2023)

Thermo Fisher Scientific. (s.a). Pharmaceutical Analytics QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Sustem, 384-well. [veebileht] https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A31676 (13.04.2023)

Tiwari, K. L., Jadhav, S. K., Gupta, S. (2012). Modified CTAB Technique for Isolation of DNA from some Medicinal Plants. – *Research Journal of Medicinal Plants*. Nr. 6. [e-ajakiri] https://scialert.net/fulltext/?doi=rjmp.2012.65.73 (21.04.2023)

Tsedaley, B. (2015). A Review Paper on Potato Virus Y (PVY) Biology, Economic Importance and its Managements. – *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*. Nr 9. [e-ajakiri] https://core.ac.uk/download/pdf/234660999.pdf (15.04.2023)

Virus and Virus-like Diseases of Potatoes and Production of Seed-Potatoes. (2001). /Ed. G. Loebenstein, P. H. Berger, A. A. Brunt, R. H. Lawson. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. [*on-line*] ebrary (24.03.2023)

WebMD Editorial Contributors. (2023). Health Benefits of Potatoes. – *Nourish*. [e-ajakiri] https://www.webmd.com/diet/health-benefits-potatoes (14.03.2023)

LISAD

Lisa 1. H&G ekstraktsioonipuhver

1. 1,5 % LiDS
2. 200 mM Tris-HCl, pH 8,5
3. 10 mM EDTA
4. 300 mM NaCl
5. 1 % Na deoxycholate
6. 1 % Ipegal CA-630
7. 10 mM DTT
8. 5 mM Thiourea
9. ddH_2O

Lisa 2. CTAB ekstraktsioonipuhver

1. 2 % CTAB
2. 100 mM Tris-HCl, pH 8,0
3. 20 mM EDTA
4. 1,4 M NaCl
5. 1 % Na_2SO_3
6. 2 % PVP-40
7. ddH_2O

Lisa 3. Fosfaatpuhver

1. Na_2HPO_4
2. KH_2PO_4
3. ddH_2O

Lisa 4. RNA ekstraktsioon Hughes ja Galau (1988) meetodil

1. Kaalu 0.5 – 1 g proovi kilekotti
2. Hõõru läbi kile proov (nt. leht) puruks, kasutades matseraatorit – rullikut või tambi haamriga mugulate puhul. Lisa 2.5 – 5 ml H&G ekstraktsiooni tööpuhvrit ja hõõru matseraatoriga
3. Vala saadud lahus nummerdatud 15 ml tuubi
4. Lisa sama kogus 6M KOAc, sega tuubi üles-alla keerates
5. Aseta jääle 15 minutiks
6. Tsentrifuugi max kiirusel 15 minutit
7. Mõõda 700 µl saadud lahust 1,5 ml tuubi
8. Lisa 700 µl 4M LiCl, sega tuubi võrekesil
9. Inkubeeri +4 ◦C juures üleöö
10. Tsentrifuugi max kiirusel (13400 rpm) 25 minutit +4 ◦C juures
11. Ettevaatlikult eemalda vedelikuosa, vigastamata pelletit
12. Resuspendeeri pellet 200 µl TE-puhvris, mis sisaldab 1% SDS. Lisa 100 µl 5M NaCl ja 300 µl jääkülma isopropanooli
13. Sega tuubi üles-alla keerates ja inkubeeri -20 ◦C juures 20 minutit
14. Tsentrifuugi +4 ◦C juures 10 minutit max-kiirusel, et nukleiinhape põhja sadestada
15. Eemalda pealt soola/isopropanooli lahus (viska jääkide anumasse)
16. Pese pelletit lisades 400 – 500 µl 70% etanooli, nipsuta tuubi
17. Tsentrifuugi 5 minutit +4 ◦C juures max-kiirusel
18. Eemalda pealt etanool, vigastamata pelletit
19. Kuivata pellet, tuubi õhu õhu juures avatuna hoides
20. Resuspendeeri pellet 50 µl ultra puhtas steriilses vees, sega vortexil
21. Jäta seisma toatemperatuuril 5 minutiks
22. Saadud lahus sisaldab RNA/DNA ja seda võib kasutada edasi PCR analüüsi läbiviimiseks
23. Lühiajaliseks säilitamiseks hoia +4 ◦C juures, kauemaks säilitamiseks -20 ◦C.

Lisa 5. RNA ekstraktsioon fosfaatpuhver + Hughes ja Galau (1988) meetodil

1. Kaalu 0.5 – 1 g proovi kilekotti
2. Hõõru läbi kile proov (nt. leht) puruks, kasutades matseraatorit – rullikut või tambi haamriga mugulate puhul. Lisa 5 ml fosfaatpuhvrit ja hõõru matseraatoriga
3. Kanna saadud lahus (2 ml) nummerdatud 15 ml tuubi ja lisa 2 ml H&G ekstraktsiooni tööpuhvrit
4. Lisa sama kogus 6M KOAc, sega tuubi üles-alla keerates
5. Aseta jääle 15 minutiks
6. Tsentrifuugi max kiirusel 15 minutit
7. Mõõda 700 µl saadud lahust 1,5 ml tuubi
8. Lisa 700 µl 4M LiCl, sega tuubi võrekesil
9. Inkubeeri +4 ˚C juures üleöö
10. Tsentrifuugi max kiirusel (13400 rpm) 25 minutit +4 ˚C juures
11. Ettevaatlikult eemalda vedelikuosa, vigastamata pelletit
12. Resuspendeeri pellet 200 µl TE-puhvris, mis sisaldab 1% SDS. Lisa 100 µl 5M NaCl ja 300 µl jääkülma isopropanooli
13. Sega tuubi üles-alla keerates ja inkubeeri -20 ˚C juures 20 minutit
14. Tsentrifuugi +4 ˚C juures 10 minutit max-kiirusel, et nukleiinhape põhja sadestada
15. Eemalda pealt soola/isopropanooli lahus (viska jääkide anumasse)
16. Pese pelletit lisades 400 – 500 µl 70% etanooli, nipsuta tuubi
17. Tsentrifuugi 5 minutit +4 ˚C juures max-kiirusel
18. Eemalda pealt etanool, vigastamata pelletit
19. Kuivata pellet, tuubi õhu õhu juures avatuna hoides
20. Resuspendeeri pellet 50 µl ultra puhtas steriilses vees, sega vortexil
21. Jäta seisma toatemperatuuril 5 minutiks
22. Saadud lahus sisaldab RNA/DNA ja seda võib kasutada edasi PCR analüüsi läbiviimiseks
23. Lühiajaliseks säilitamiseks hoia +4 ˚C juures, kauemaks säilitamiseks -20 ˚C.

Lisa 6. CTAB-meetod – pikk meetod NaCl + fosfaatpuhver

DNA/RNA ekstraktsiooni I etapp:

1. Kui prooviks on taimne materjal siis: kaalu 100-200 mg proovi kilekotti
2. Hõõru läbi kile leht puruks, kasutades matseraatorit - rullikut. Lisa 1-2 ml fosfaatpuhvrit ja hõõru matseraatoriga (soovituslik on 10x lahjendus)
3. Mõõda 350 µl saadud lahust 1,5 ml tuubi ja lisa 350 µl CTAB ekstraktsioonipuhvrit
4. Kui proov on vedelikuna, siis pipeteeri 200 µl proovi lahust safe-lock tüüpi tuubi ning lisa 500 µl CTAB ekstraktsioonipuhvrit, sega
5. Inkubeeri +65^{o} C juures 30 minutit termoblokil
6. Lisa 700 µl kloroformi: isoamüül - atsetaadi (IAA) segu (24:1), sega tuubi vorteksil, kuni tekib emulsioon
7. Tsentrifuugi max-kiirusel 5 minutit
8. Ettevaatlikult mõõda 500 µl ülemisest kihist ja vii uude tuubi ning lisa 500 µl kloroformi: IAA segu (24:1), sega vorteksil. Kloroformi jääke (tuubid, pipetiotsikud) kogu eraldi kloroformi jääkide kogumisnõusse
9. Tsentrifuugi max-kiirusel 5 minutit
10. Mõõda ülemisest kihist 400 µl ja vii uude tuubi, (tähelepanu, et ei vigastaks interfaasi) ning lisa 200 µl 5 M NaCl ja 200 µl jää-külma isopropanooli (-20^{o}C). Kloroformi jääke (tuubid, pipetiotsikud) kogu eraldi kloroformi jääkide kogumisnõusse
11. Sega vortexil ja inkubeeri –20^{o} C juures 30 minutit või üleöö

DNA/RNA ekstraktsiooni II etapp:

12. Tsentrifuugi –20^{o} C juurest võetud proovituube 10 minutit max-kiirusel, et nukleiinhape põhja sadestada
13. Ettevaatlikult eemalda vedelikuosa (pipetiga), vigastamata pelletit
14. Resuspendeeri pellet 200 µl TE-puhvris, mis sisaldab 1% SDS. Lisa 100 µl 5M NaCl ja 300 µl jääkülma isopropanooli
15. Sega tuubi üles-alla keerates ja inkubeeri –20^{o} C juures 30 minutit või üleöö
16. Tsentrifuugi 10 minutit max-kiirusel, et nukleiinhape põhja sadestada
17. Eemalda pealt soola/isopropanooli lahus (viska jääkide anumasse)
18. Pese pelletit lisades 400-500 µl 70% etanooli, nipsuta tuubi

19. Tsentrifuugi 4 minutit max-kiirusel
20. Eemalda pealt etanool, vigastamata pelletit
21. Kuivata pellet, tuubi õhu juures avatuna hoides
22. Resuspendeeri pellet 50 µl ultra puhtas steriilses vees, sega vortexil, jäta seisma 5 minutiks toatemperatuuril
23. Saadud lahus sisaldab DNA/RNA ja seda võib kasutada edasi PCR või hübridiseerimis-analüüsi läbiviimiseks.

Lühiajaliseks säilitamiseks hoia +4 ˚C juures, kauemaks säilitamiseks –20 ˚C

Lisa 7. CTAB-meetod – pikk meetod NaCl

DNA/RNA ekstraktsiooni I etapp:

1. Kui prooviks on taimne materjal siis: kaalu 100-200 mg proovi kilekotti
2. Hõõru läbi kile leht puruks, kasutades matseraatorit - rullikut. Lisa 1-2 ml CTAB ekstraktsioonipuhvrit ja hõõru matseraatoriga (soovituslik on 10x lahjendus)
3. Mõõda 700 µl saadud lahust 1,5 ml tuubi
4. Kui proov on vedelikuna, siis pipeteeri 200 µl proovi lahust safe-lock tüüpi tuubi ning lisa 500 µl CTAB ekstraktsioonipuhvrit, sega
5. Inkubeeri +65^{o} C juures 30 minutit termoblokil
6. Lisa 700 µl kloroformi: isoamüül - atsetaadi (IAA) segu (24:1), sega tuubi vorteksil, kuni tekib emulsioon
7. Tsentrifuugi max-kiirusel 5 minutit
8. Ettevaatlikult mõõda 500 µl ülemisest kihist ja vii uude tuubi ning lisa 500 µl kloroformi: IAA segu (24:1), sega vorteksil. Kloroformi jääke (tuubid, pipetiotsikud) kogu eraldi kloroformi jääkide kogumisnõusse
9. Tsentrifuugi max-kiirusel 5 minutit
10. Mõõda ülemisest kihist 400 µl ja vii uude tuubi, (tähelepanu, et ei vigastaks interfaasi) ning lisa 200 µl 5 M NaCl ja 200 µl jää-külma isopropanooli (-20^{o}C). Kloroformi jääke (tuubid, pipetiotsikud) kogu eraldi kloroformi jääkide kogumisnõusse
11. Sega vortexil ja inkubeeri –20^{o} C juures 30 minutit või üleöö

DNA/RNA ekstraktsiooni II etapp:

12. Tsentrifuugi –20^{o} C juurest võetud proovituube 10 minutit max-kiirusel, et nukleiinhape põhja sadestada
13. Ettevaatlikult eemalda vedelikuosa (pipetiga), vigastamata pelletit
14. Resuspendeeri pellet 200 µl TE-puhvris, mis sisaldab 1% SDS. Lisa 100 µl 5M NaCl ja 300 µl jääkülma isopropanooli
15. Sega tuubi üles-alla keerates ja inkubeeri –20^{o} C juures 30 minutit või üleöö
16. Tsentrifuugi 10 minutit max-kiirusel, et nukleiinhape põhja sadestada
17. Eemalda pealt soola/isopropanooli lahus (viska jääkide anumasse)
18. Pese pelletit lisades 400-500 µl 70% etanooli, nipsuta tuubi

19. Tsentrifuugi 4 minutit max-kiirusel
20. Eemalda pealt etanool, vigastamata pelletit
21. Kuivata pellet, tuubi õhu juures avatuna hoides
22. Resuspendeeri pellet 50 µl ultra puhtas steriilses vees, sega vortexil, jäta seisma 5 minutiks toatemperatuuril
23. Saadud lahus sisaldab DNA/RNA ja seda võib kasutada edasi PCR või hübridiseerimis-analüüsi läbiviimiseks.
24. Lühiajaliseks säilitamiseks hoia +4 ˚C juures, kauemaks säilitamiseks –20 ˚C.

Lisa 8. CTAB-meetod – pikk meetod LiCl

DNA/RNA ekstraktsiooni I etapp:

1. Kui prooviks on taimne materjal siis: kaalu 100-200 mg proovi kilekotti
2. Hõõru läbi kile leht puruks, kasutades matseraatorit - rullikut. Lisa 1-2 ml CTAB ekstraktsioonipuhvrit ja hõõru matseraatoriga (soovituslik on 10x lahjendus)
3. Mõõda 700 µl saadud lahust 1,5 ml tuubi
4. Kui proov on vedelikuna, siis pipeteeri 200 µl proovi lahust safe-lock tüüpi tuubi ning lisa 500 µl CTAB ekstraktsioonipuhvrit, sega
5. Inkubeeri +65^{o} C juures 30 minutit termoblokil
6. Lisa 700 µl kloroformi: isoamüül - atsetaadi (IAA) segu (24:1), sega tuubi vorteksil, kuni tekib emulsioon
7. Tsentrifuugi max-kiirusel 5 minutit
8. Ettevaatlikult mõõda 500 µl ülemisest kihist ja vii uude tuubi ning lisa 500 µl kloroformi: IAA segu (24:1), sega vorteksil. Kloroformi jääke (tuubid, pipetiotsikud) kogu eraldi kloroformi jääkide kogumisnõusse
9. Tsentrifuugi max-kiirusel 5 minutit
10. Mõõda ülemisest kihist 400 µl ja vii uude tuubi, (tähelepanu, et ei vigastaks interfaasi) ning lisa 200 µl 5 M LiCl ja 200 µl jää-külma isopropanooli (-20^{o}C). Kloroformi jääke (tuubid, pipetiotsikud) kogu eraldi kloroformi jääkide kogumisnõusse
11. Sega vortexil ja inkubeeri –20^{o} C juures 30 minutit või üleöö

DNA/RNA ekstraktsiooni II etapp:

12. Tsentrifuugi –20^{o} C juurest võetud proovituube 10 minutit max-kiirusel, et nukleiinhape põhja sadestada
13. Ettevaatlikult eemalda vedelikuosa (pipetiga), vigastamata pelletit
14. Resuspendeeri pellet 200 µl TE-puhvris, mis sisaldab 1% SDS. Lisa 100 µl 5M LiCl ja 300 µl jääkülma isopropanooli
15. Sega tuubi üles-alla keerates ja inkubeeri –20^{o} C juures 30 minutit või üleöö
16. Tsentrifuugi 10 minutit max-kiirusel, et nukleiinhape põhja sadestada
17. Eemalda pealt soola/isopropanooli lahus (viska jääkide anumasse)
18. Pese pelletit lisades 400-500 µl 70% etanooli, nipsuta tuubi

19. Tsentrifuugi 4 minutit max-kiirusel
20. Eemalda pealt etanool, vigastamata pelletit
21. Kuivata pellet, tuubi õhu juures avatuna hoides
22. Resuspendeeri pellet 50 µl ultra puhtas steriilses vees, sega vortexil, jäta seisma 5 minutiks toatemperatuuril
23. Saadud lahus sisaldab DNA/RNA ja seda võib kasutada edasi PCR või hübridiseerimis-analüüsi läbiviimiseks.
24. Lühiajaliseks säilitamiseks hoia +4 ˚C juures, kauemaks säilitamiseks –20 ˚C.

Lisa 9. CTAB-meetod – lühike meetod

1. Kui prooviks on taimne materjal siis: kaalu 100-200 mg proovi kilekotti
2. Hõõru läbi kile leht puruks, kasutades matseraatorit - rullikut. Lisa 1-2 ml CTAB ekstraktsioonipuhvrit ja hõõru matseraatoriga. (soovituslik on 10x lahjendus)
3. Mõõda 700 µl saadud lahust 1,5 ml tuubi
4. Kui proov on vedelikuna, siis pipeteeri 200 µl proovi lahust safe-lock tüüpi tuubi ning lisa 500 µl CTAB ekstraktsioonipuhvrit, sega
5. Mõõda 700 µl saadud lahust 1,5 ml tuubi
6. Inkubeeri +65^{o} C juures 10-15 minutit termoblokil
7. Lisa 700 µl kloroformi : isoamüül-atsetaadi (IAA) segu (24:1), sega tuubi vorteksil, kuni tekib emulsioon
8. Tsentrifuugi max kiirusel 10 minutit toatemperatuuril
9. Ettevaatlikult mõõda 500 µl ülemisest kihist ja vii uude tuubi ning lisa 500 µl jää-külma isopropanooli (-20^{o}C), sega vorteksil. Kloroformi jääke (tuubid, pipetiotsikud) kogu eraldi kloroformi jääkide kogumisnõusse
10. Inkubeeri –20^{o} C juures 20-30 minutit
11. Tsentrifuugi –20^{o} C juurest võetud proovituube 10 minutit max-kiirusel, et nukleiinhape põhja sadestada
12. Ettevaatlikult eemalda vedelikuosa, vigastamata pelletit
13. Pese pelletit lisades 500 µl 70% etanooli, nipsuta tuubi ja tsentrifuugi 3-4 minutit max-kiirusel
14. Ettevaatlikult eemalda pealt etanool, vigastamata pelletit
15. Kuivata pellet, epsi õhu juures avatuna hoides
16. Resuspendeeri pellet 50 µl puhtas steriilses vees, sega vorteksil
17. Saadud lahus sisaldab DNAd ja seda võib kasutada edasi PCR läbiviimiseks
18. Lühiajaliseks säilitamiseks hoia +4 ˚C juures, kauemaks säilitamiseks –20 ˚C

Lisa 9. Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ning juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Mina, Anette Stražev,

(sünnipäev 19/10/2000, 60010192029)

1. annan Eesti Maaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud lõputöö „Kartulil esinevate viiruste DNA/RNA eraldamise meetodite võrdlus ning efektiivsuse hindamine, mille juhendajad on Piret van der Sman ja Kaire Loit,

   1.1. salvestamiseks säilitamise eesmärgil,
   1.2. digiarhiivi DSpace lisamiseks ja
   1.3. veebikeskkonnas üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Lõputöö autor _____

allkiri

Tartu, 20.05.2023

Juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Luban lõputöö kaitsmisele.

_____ _____

(*juhendaja nimi ja allkiri*) (*kuupäev*)

_____ _____

(*juhendaja nimi ja allkiri*) (*kuupäev)*