

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV  
OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.



**Real-time PCR detekce virů Strawberry mild yellow edge virus (SMYEV), Strawberry crinkle virus (SCV), Strawberry vein banding virus (SVBV), Strawberry mottle virus (SMoV) a Strawberry polerovirus-1 (SPV-1) v biologickém materiálu**



Radek Čmejla, Lucie Valentová



**CERTIFIKOVANÁ  
METODIKA  
2020**





**Real-time PCR detekce virů Strawberry  
mild yellow edge virus (SMYEV),  
Strawberry crinkle virus (SCV),  
Strawberry vein banding virus (SVBV),  
Strawberry mottle virus (SMoV)  
a Strawberry polerovirus-1 (SPV-1)  
v biologickém materiálu**

Radek Čmejla, Lucie Valentová



**CERTIFIKOVANÁ METODIKA**

- Autoři:** RNDr. Radek Čmejla, Ph.D.  
Mgr. Lucie Valentová  
VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.  
Holovousy 129, 508 01 Hořice
- Dedikace:** Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum (NAZV) QK1920245: Výzkum rozšíření, biologických vlastností a škodlivosti virů identifikovaných v rostlinách jahodníku pomocí nejnovějších diagnostických metod (NGS, PCR) jako podklad pro přípravu legislativy.
- Ochrana autorských práv:** Použité sady pro PCR detekci virů SMYEV, SCV, SVBV, SMOV a SPV-1 v biologickém materiálu jsou právně chráněny užitným vzorem č. CZ 32879 a jejich použití je možné se souhlasem Přihlašovatele (VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY, s.r.o.).
- Oponenti:** Ing. Aleš Eichmeier, Ph.D., Mendelova univerzita v Brně  
RNDr. Kateřina Tománková, Ph.D., ÚKZÚZ
- Další informace:** Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský schválil publikaci jako certifikovanou metodiku. Metodice bylo vydáno Osvědčení č. UKZUZ 205307/2020 o uznání metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací.

## OBSAH

<b>1. Úvod</b> .....	<b>7</b>
<b>2. Cíl metodiky</b> .....	<b>8</b>
<b>3. Vlastní popis metodiky</b> .....	<b>9</b>
<b>3.1 Pre-analytická fáze</b> .....	<b>10</b>
3.1.1 Odběr vzorků, přeprava vzorků .....	10
3.1.2 Příjem vzorků do laboratoře .....	10
<b>3.2 Analytická fáze</b> .....	<b>10</b>
3.2.1 Izolace RNA .....	11
3.2.2 Příprava cDNA .....	13
3.2.3 Real-time PCR detekce .....	15
3.2.3.1 Úvod .....	15
3.2.3.2. Materiál .....	15
3.2.3.3. Sestavení vlastní real-time PCR reakce .....	17
3.2.3.4. Poznámka pro uživatele jiného typu real-time PCR cyklu .....	20
<b>3.3 Post-analytická fáze</b> .....	<b>20</b>
3.3.1 Vyhodnocování, analýza dat .....	20
3.3.1.1. Vyhodnocení PCR běhu u přístroje Rotor-Gene Q .....	20
3.3.1.2. Vyhodnocení systému kontrol kvality .....	22
3.3.1.3. Akceptace a interpretace výsledků .....	23
3.3.2 Poznámka pro uživatele jiného typu real-time PCR cyklu .....	23
<b>3.4 Validace metody</b> .....	<b>23</b>
3.4.1 Stanovení specificity .....	24
3.4.2 Stanovení analytické senzitivity .....	25
3.4.3 Stanovení opakovatelnosti .....	26
3.4.4 Stanovení reprodukovatelnosti .....	27
3.4.5 Zjednodušený validační protokol .....	28
<b>4. Srovnání novosti postupů</b> .....	<b>29</b>
<b>5. Popis uplatnění certifikované metodiky</b> .....	<b>30</b>
<b>6. Ekonomické aspekty</b> .....	<b>31</b>
<b>7. Seznam použité související literatury</b> .....	<b>33</b>
<b>8. Seznam publikací, které předcházely metodice</b> .....	<b>34</b>



## 1. ÚVOD

Jahody patří mezi velmi oblíbené drobné ovoce, které je rozšířené téměř na všech kontinentech. Kulturní odrůda jahodníku velkoplodého (*Fragaria × ananassa* nebo také *Fragaria ananassa* nebo *Fragaria × grandiflora*) je forma kříženců jahodníku virginického (*Fragaria virginiana*) a jahodníku čilského (*Fragaria chiloensis*) a byla vyšlechtěna v roce 1766 zahradníkem francouzského krále Ludvíka XV. Antoniem Duchesneem. Pěstování jahodníku má v České republice dlouholetou tradici. Prvním pěstitelem, který na našem území zakládal první porosty jahodníku, byl Rudolf Strimpl. V současné době, jak vyplývá z údajů pro rok 2018, jsou jahodníky pěstovány na cca 1 830 ha, celková sklizeň se pohybuje okolo 7 tisíc tun a produkce školkařských výpěstků je téměř 7,3 milionů kusů (Buchtová 2019).

Mezi ekonomicky významné patogeny, které ovlivňují produkci a výnos jahodníku, řadíme viry Strawberry mild yellow edge virus (SMYEV), Strawberry crinkle virus (SCV), Strawberry vein banding virus (SVBV), Strawberry mottle virus (SMoV) a Strawberry polerovirus-1 (SPV-1). Mnoho z nich nevyvolává zřetelné příznaky, viry přežívají v latenci a jedinými příznaky infekce jahodníku jsou právě ztráta vitality a snížený výnos (Conci *et al.* 2008).

Virus SMYEV patří do čeledi Alphaflexiviridae (rod *Potexvirus*) a jeho genom je tvořen jednou molekulou (+)ssRNA. SMYEV je původcem onemocnění virového okrajového žloutnutí listů jahodníku a je přenášen mšicemi perzistentním způsobem, mechanickým přenosem nebo pomocí šlahounů, kdy je virus přenášen z matečné rostliny na dceřinou. Virus se často vyskytuje v latentní podobě nebo v koinfekci s dalšími mšicemi přenosnými viry. Závažnost příznaků je závislá na kmeni viru, kultivaru jahodníku a dalších biotických a abiotických faktorech. Mezi hlavní příznaky patří zakrslost listů, které jsou menší a kadeřavé, dále se na rostlině mohou objevovat chlorotické skvrny. Charakteristickým symptomem je žloutnutí okrajů listů, které zasahuje do mezižilkových pletiv (Maas 1998). Virus je rozšířen po celém světě, první výskyt v ČR byl popsán v roce 2001 (Fránová *et al.* 2001, Martin & Tzanetakis 2006).

Onemocnění virová kadeřavost jahodníku je vyvoláno virem SCV z čeledi Rhabdoviridae (rod *Cytorhabdovirus*), jehož genom je tvořen (-)ssRNA. Virus je perzistentně přenášen mšicemi (Klerks *et al.* 2004), mechanickým přenosem a vegetativním množením. Jak uvádí Krczal (1988) příznaky viru SCV na jahodnicích se liší v závislosti na kmeni viru a kultivaru jahod. Symptomy se projevují zejména na listech, kdy listy napadených rostlin jsou malé, zkadeřené, může se na nich projevit chlorotická skvrnitost a žloutnutí celých částí listů. Dalším příznakem je zakrňlost, abnormální vzhled rostlin (Maas 1998), zmenšení velikosti listů a plodů a snížení výnosů pěstovaných jahod (Dara 2015).

Virové lemování žilek jahodníku je způsobeno virem SVBV z čeledi Caulimoviridae (rod *Caulimovirus*), který patří do skupiny dsDNA-RT virů. Onemocnění je přenášeno mšicemi semiperzistentním způsobem (Mahmoudpour 2003) nebo roubováním či mechanickým přenosem. Virus je celosvětově rozšířen (Chen *et al.* 2016). Výrazné příznaky lze na jahodníku pozorovat v případě směsných infekcí.

Chen *et al.* (2016) sledovali příznaky viru SVBV na lesních jahodnicích. Infikované rostliny vykazovaly charakteristické příznaky, jako je žloutnutí podél hlavních listových žil, kratší šlahouny, snížená intenzita růstu rostlin, menší plody a významné snížení výnosu a kvality plodů.

Virus SMOV z čeledi Secoviridae (do rodu není zatím zařazen) je původcem choroby virové strakatosti jahodníku. Genom viru je tvořen dvěma segmenty (+)ssRNA. Tento virus je nejrozšířenějším jahodníkovým virem (Thompson *et al.* 2002). Thompson *et al.* (2003) uvádí, že samostatná infekce virem SMOV může vyvolávat snížení výnosu jahodníku a přírůstků šlahounů až o 30 %. V rámci směsných infekcí s dalšími mšicemi přenášenými viry mohou být ztráty až 80 %. Dále ve své práci popisují, že je velmi obtížné pozorovat příznaky viru na listech jahodníku velkoplodého. Doporučují proto virus inokulovat na indikátorové rostliny, které jsou k viru citlivější s ohledem na asociované symptomy. V případě projevu příznaků se na listech objevují skvrny, listy jsou malé, zkadeřené, okraje nažloutlé, stočené směrem nahoru. Infikované rostliny mohou mít růžicovitý vzhled.

Virus SPV-1, pro který se v literatuře neuvádí název onemocnění, byl objeven teprve nedávno. Fylogenetická analýza ukázala, že se jedná o nový druh rodu *Polerovirus*, čeleď Luteoviridae (Xiang *et al.* 2015). Thekke-Veetil & Tzanetakis (2016) se jím zabývali při studii epidemie onemocnění u jahodníku, které bylo způsobené komplexem virů. Uvádějí, že by bylo vhodné tento virus zařadit mezi viry, které se rutinně testují v rozmnožovacím materiálu.

Protože jsou všechny viry přenosné vegetativním množením rostlin, účinná ochrana je prevence, která spočívá např. v používání bezvirózního rozmnožovacího materiálu nebo potlačování výskytu přenašečů virů. Uvedené viry SMYEV, SCV, SMOV a SVBV jsou uvedeny jednak v seznamu virů a virům podobných škodlivých organizmů, jejichž přítomnost je nezbytná testovat u rozmnožovacího materiálu ovocných rodů a druhů v České republice, a také na seznamu patogenů certifikačního schématu pro testování jahodníku PM 4/11 (2) Schemes for the production of healthy plants for planting, Certification scheme for strawberry dle EPPO. Požadavky na zdravotní stav množitelského materiálu jsou dány zákonem č. 219/2003 Sb. a navazující vyhláškou č. 95/2018 Sb., o množitelských porostech a rozmnožovacím materiálu chmele, révy, ovocných rodů a druhů a okrasných druhů a jeho uvádění do oběhu. Dle této platné legislativy je kontrola rozmnožovacího materiálu jahodníku na přítomnost virů SMYEV, SCV, SMOV a SVBV povinná.

## 2. CÍL METODIKY

Metodika se zaměřuje na zavedení nového detekčního systému pro rutinní diagnostiku rostlinných virů Strawberry mild yellow edge virus (SMYEV), Strawberry crinkle virus (SCV, oba kmeny A i B), Strawberry vein banding virus (SVBV, evropská i kanadská forma), Strawberry mottle virus (SMOV) a Strawberry polerovirus-1 (SPV-1), původců virového onemocnění jahodníku (*Fragaria* spp. L.). SMYEV je původcem virového okrajového žloutnutí listů jahodníku, SCV způsobuje



virovou kadeřavost jahodníku, SVBV virové lemování žilek jahodníku a SMOV virovou strakatost jahodníku, pro virus SPV-1 se zatím v literatuře název konkrétního onemocnění neuvádí.

Navržená metodika detekce virů je založena na principu real-time PCR. Tento přístup umožňuje současnou kvalitativní/kvantitativní detekci všech pěti virů v jedné reakci. Navržený detekční systém byl validován v multiplexním uspořádání pro použití s cyklem Rotor-Gene Q (Qiagen) dle validačního schématu obsaženého v EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) PM7/98 (4) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. Využití detekčního systému se předpokládá zejména pro rutinní diagnostiku těchto virů při certifikaci rozmnožovacího materiálu.

### 3. VLASTNÍ POPIS METODIKY

Vlastní metodika sestává z několika kroků:

#### 3.1 Pre-analytická fáze

- 3.1.1 Odběr vzorků, přeprava
- 3.1.2 Příjem vzorků do laboratoře

#### 3.2 Analytická fáze

- 3.2.1 Izolace RNA
- 3.2.2 Příprava cDNA
- 3.2.3 Real-time PCR detekce

#### 3.3 Post-analytická fáze

- 3.3.1 Vyhodnocování výsledků
- 3.3.2 Uvádění výsledků

#### 3.4 Validace metodiky

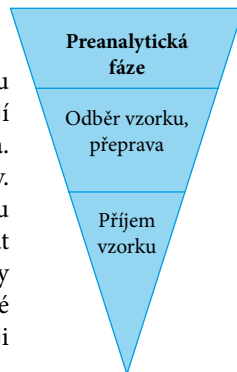
- 3.4.1 Specificita
- 3.4.2 Senzitivita
- 3.4.3 Opakovatelnost
- 3.4.4 Reprodukovatelnost

Použití metodiky předpokládá základní znalosti principů molekulárně-biologických metod a principů správné laboratorní praxe. Metodika byla testována a validována s použitím konkrétních reagensí, souprav a přístrojů (viz níže), odborník v oboru však bude schopen metodiku verifikovat pro konkrétní vybavení laboratoře a používané laboratorní reagensie.

### 3.1 Pre-analytická fáze

#### 3.1.1 Odběr vzorků, přeprava vzorků

Termín odběru by měl odpovídat účelu testování a typu testovaného materiálu. Constable *et al.* (2010) doporučují vzorky pro testování odebírat v období od května do října. Pro rutinní testování jsou nejvhodnějším materiálem listy. Protože se viry SMYEV, SCV, SVBV, SMOV a SPV-1 mohou vyskytovat v rostlinách nerovnoměrně, doporučuje se odebírat 3-4 listy z více míst rostliny, pokud možno ze všech stran, aby se získal reprezentativní vzorek. Odebrané a řádně označené vzorky je nutné uchovávat v chladu a dopravit co nejrychleji do laboratoře.



#### 3.1.2 Příjem vzorků do laboratoře

Vzorky se po příjmu do laboratoře okamžitě zpracují nebo se ve zkumavkách šokově zamrazí v tekutém dusíku a uloží se do doby zpracování do mrazicího boxu při teplotě -80 °C. Při této teplotě je možné vzorky skladovat bez ztráty kvality nejméně 1 rok.

Ke zpracování se přijímají pouze vzorky, které nejsou znehodnoceny:

- Plísní
- Hnilobným procesem
- Pokročilou nektrózou pletiv
- Dalšími faktory, které by mohly ovlivnit výsledek zkoušky (např. aplikace postřiků)

Kritické body při příjmu vzorků, na které je třeba zvláště dbát:

- Neporušenost obalu zásilky
- Jednoznačná identifikace každého vzorku
- Dodržení doby transportu vzorků do laboratoře od jejich odběru:

**Samotné listy:** 4 kalendářní dny

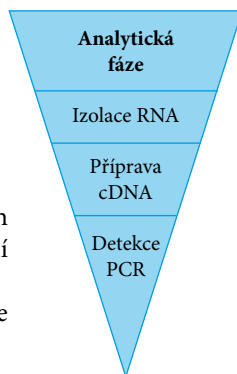
### 3.2 Analytická fáze

Vlastní analytická fáze se provádí ve třech krocích:

- Izolace RNA
- Příprava cDNA
- Real-time PCR detekce

Kritické body analytické fáze, na které je třeba zvláště dbát:

- Dodržování zásad dekontaminace a hygieny platných pro laboratoř molekulární biologie pro vyloučení možných kontaminací
- Dodržování všech zásad správné laboratorní praxe v laboratoři molekulární biologie
- Zařazování extrakčních kontrol
- Dodržování standardní navážky vstupního materiálu
- Kvalita izolované RNA a připravené cDNA



### 3.2.1 Izolace RNA

Metodika je validována s využitím následujícího postupu a reagensů pro izolaci RNA:

- Homogenizace vzorku se provádí v tekutém dusíku.
- Vlastní izolace RNA se provádí pomocí komerčně dodávaného izolačního kitu Ribospin™ Plant, (GeneAll Biotechnology, Co., Ltd.; k.č. 307-150; dodává Bohemia Genetics s.r.o.) na bázi kolon. Postupuje se podle návodu výrobce.
- Specifikace kitu a typické výtěžky:

Specifikace	Ribospin™ Plant
Typ izolace	Kolonová
Maximální množství výchozího vzorku	~ 100 mg rostlinné tkáňe
Maximální objem kolony	~ 700 µl
Minimální eluční objem	30 µl
Maximální vazebná kapacita	~ 100 µg

#### Typické výtěžky

Typ vzorku		Množství výchozího vzorku	Typický výtěžek
List	<i>Pinus densiflora</i> (Borovice)	100 mg	2,7 µg
	<i>Cucumis sativus</i> L. (Okurka)	100 mg	50 µg
	<i>Zea mays</i> (Kukuřice)	100 mg	11 µg
	<i>Capsicum annuum</i> (Červená paprika)	100 mg	22 µg
	<i>Lycopersicon esculentum</i> (Rajče)	50 mg	13 µg
	<i>Lactuca sativa</i> (Hlávkový salát)	100 mg	29 µg
	<i>Citrus grandis</i> Osbek (Satsuma)	100 mg	4,6 µg
	<i>Diospyros kaki</i> (Tomel japonský – Kaki)	100 mg	16 µg
	<i>Crassula ovata</i> (Tlustice vejčitá)	100 mg	3 µg
	<i>Nicotiana tabacum</i> (Tabák)	50 mg	13 µg
Kořen	<i>Allium cepa</i> (Cibule)	100 mg	8 µg
	<i>Plantago asiatica</i> (Jitrocel asijský)	50 mg	2,5 µg
	<i>Nicotiana tabacum</i> (Tabák)	50 mg	5,3 µg
Plod	<i>Citrus grandis</i> Osbek (Satsuma)	50 mg	1,1 µg
Klíček	<i>Allium cepa</i> (Cibule)	100 mg	9 µg

- Typický výtěžek RNA z 50 mg listů **jahodníku** (*Fragaria* spp.) je 16,6 µg (vlastní laboratorní výsledek).
- Izolovaná RNA by měla mít čistotu (hodnota poměru absorbcí A260/A280) alespoň 1,8.
- Purifikovanou RNA je možné pro další analýzy (např. příprava cDNA) krátkodobě uchovat při 4 °C nebo dlouhodobě skladovat při -80 °C.
- Izolace RNA probíhá v prostorách k tomu určených v rámci laboratoře molekulární biologie (pre-PCR area) v souladu s principy správné laboratorní praxe.
- Všechny centrifugační kroky se provádějí ve stolní centrifuze s rotorem pro mikrozkušavky 2 ml při pokojové teplotě při otáčkách minimálně 10 000 g (u běžných centrifug zpravidla 14 000 otáček za minutu [RPM]).
- Jako kontrolu kvality přípravy RNA a ověření čistoty reagensů používaných pro izolaci lze doporučit tzv. extrakční kontrolu. K sérii paralelně izolovaných vzorků se provede kontrolní izolace, ale bez použití vstupního rostlinného materiálu. Tímto způsobem se testuje případná kontaminace použitých reagensů pro izolaci RNA.

### **Pracovní postup**

1. V třecí misce se v tekutém dusíku homogenizuje dostatečné množství rostlinného pletiva na jemný prášek. Standardně se 50 mg homogenizovaného vzorku přenese do 2ml mikrozkušavky (není součástí izolačního kitu).
2. Přidá se 450 µl lyzačního pufru RPL nebo v případě tvorby sraženin alternativně pufr REL ve stejném množství. Vzorek se ihned důkladně promíchá na vortexu.
3. Vzorky se inkubují 3 minuty při pokojové teplotě.
4. Lyzát se přenese pomocí 1ml špičky s filtrem s ustríženou špičkou na EzPure™ kolonu (žlutá barva). V případě gelovitější konzistence je možné lyzát přesunout přímo na kolonu pomocí tenké kovové špachtličky (ve špičce zůstává značná část materiálu).
5. Vzorky se centrifugují 2 minuty. V případě, že kolonou proteče pouze málo vzorku, lze centrifugaci opakovat nebo provést předčištění lyzátu ihned po kroku 3, a to centrifugací vzorků 1 minutu. Na kolonu se poté nanáší supernatant.
6. Po stočení se proteklý lyzát opatrně bez narušení pelety přenese do nové 1,5ml zkušavky (je součástí kitu); typicky se jedná o 350 µl lyzátu.
7. K lyzátu se přidá 1 objem 70% EtOH (k 350 µl lyzátu se přidá 350 µl); roztoky je nutné okamžitě promíchat otáčením zkušavky (cca 5x).
8. Maximálně 700 µl směsi z kroku 7 se přenese na mini spin kolonu s modrým kroužkem (typ W) se sběrnou zkušavkou.
9. Centrifuguje se 1 minutu. Supernatant se vylije, okraj sběrné zkušavky se oře buničitou vatou. W kolona se opět vsune do sběrné zkušavky. V případě potřeby se na kolonu nanese zbytek lyzátu, zopakuje se krok 9.
10. Na W kolonu se přidá 500 µl pufru RBW.

11. Centrifuguje se 1 minutu. Proteklá tekutina se vylije, okraj sběrné zkumavky se otře buničitou vatou. W kolona se opět vsune do sběrné zkumavky.
12. V čisté 1,5ml mikrozkuhavce nebo přímo ve zkumavce s alikvotovanou DNase I (součást kitu) se připraví premix reakční směsi DNase I. Na každý vzorek se počítá 70  $\mu$ l pufru DRB a 2  $\mu$ l DNase I. Do středu W kolony se nanese 70  $\mu$ l DNase I reakční směsi, nechá se inkubovat minimálně 10 min. při pokojové teplotě. Pozor, DNase I je náchylná na fyzické poškození, nemíchejte ji a nemanipulujte s ní příliš prudce!
13. Na kolonu se přidá 500  $\mu$ l pufru RBW a nechá stát 2 minuty. Pufr RBW inaktivuje DNase I.
14. Centrifuguje se 1 minutu. Proteklá tekutina se vylije, okraj sběrné zkumavky se otře buničitou vatou. W kolona se opět vsune do sběrné zkumavky.
15. Na kolonu se přidá 500  $\mu$ l pufru RNW.
16. Centrifuguje se 1 minutu. Proteklá tekutina se vylije, okraj sběrné zkumavky se otře buničitou vatou. W kolona se opět vsune do sběrné zkumavky.
17. Zopakují se kroky 15-16.
18. Centrifuguje se 1 minutu, aby se zcela odstranil RNW pufr z kolony. Po centrifugaci se W kolona opatrně vsune do čisté 1,5ml mikrozkuhavky (součástí kitu).
19. Do středu W kolony se nanese 50  $\mu$ l RNase-free vody a vzorky se nechají stát 1 minutu při pokojové teplotě. Pro zvýšení koncentrace RNA je možné snížit eluční objem až na 30  $\mu$ l.
20. Centrifuguje se 2 minuty. Purifikovanou RNA je možné pro další analýzy krátkodobě uchovat při 4 °C (např. pro navazující přípravu cDNA) nebo dlouhodobě uchovávat při 80 °C.
21. Čistota a koncentrace izolované RNA se stanoví pomocí spektrofotometru.

Odborníkoví v oboru jsou známy další postupy homogenizace výchozího materiálu nebo izolace RNA, které mohou vést ke stejnému výsledku.

### 3.2.2 Příprava cDNA

Metodika je validována s využitím následujícího postupu a reagentů pro přípravu cDNA:

- Pro přípravu cDNA se používá RNA izolovaná pomocí kitu Ribospin™ Plant, (GeneAll Biotechnology, Co., Ltd.; k.č. 307-150; dodává Bohemia Genetics s.r.o).
- Pro přípravu cDNA se používá maximálně 1  $\mu$ g izolované RNA.
- Pro přípravu cDNA se používá reverzní transkriptáza: M-MLV Reverse Transcriptase, 200 U/ $\mu$ l (Invitrogen, k.č. 28025-013; dodává Life Technologies Czech Republic s.r.o.). Postupuje se podle návodu výrobce.
- Pro přípravu cDNA se používá směs náhodných primerů-hexamerů: Primer Random p(dN)<sub>6</sub> (Roche, k.č. 11034731001; dodává Roche s.r.o.).
- Pro přípravu cDNA se používá směs nukleotidů: dNTP mix, 10 mM každý (Genaxxon, k.č. M3016.1010; dodává Bohemia Genetics s.r.o.).

- Přípravenou cDNA je možné pro další analýzy (např. PCR) krátkodobě uchovat při 4 °C nebo dlouhodobě skladovat při -20 °C.
- Příprava cDNA probíhá v prostorách k tomu určených v rámci laboratoře molekulární biologie (PCR area) s využitím PCR boxů a v souladu s principy správné laboratorní praxe.
- Jako kontrolu kvality přípravy cDNA lze doporučit tzv. „RT- kontrolu“. Z RNA příslušného vzorku se paralelně připravují dvě cDNA pouze s tím rozdílem, že se do RT- kontrolního vzorku nepřidá reverzní transkriptáza.

### ***Pracovní postup***

1. Podle počtu vzorků se ve stojánku připraví potřebný počet 0,2ml mikrozkušavek včetně zkumavky pro negativní kontrolu, pokud se připravuje (RT-). Jako negativní kontrola může být použita RNA z negativního vzorku nebo voda.
2. Do jednotlivých zkumavek se napipetuje:
  - a. 4 µl náhodných primerů o koncentraci 50 ng/µl
  - b. 1 µl 10mM dNTPs
  - c. 1–5 µl celkové RNA (Celkové množství RNA v reakci by nemělo překročit 1 µg.)
  - d. RNase free voda do celkového objemu 13 µl  
Směs se promíchá.
3. Směs se zahřeje v cykleru na 65 °C 5 minut. Po uplynutí inkubační doby se zkumavky prudce zchladí ve vymražené kovové destičce. Poté se krátce zcentrifugují.
4. Do jednotlivých zkumavek se napipetuje:
  - a. 4 µl 5× First-Strand Buffer
  - b. 2 µl 0,1M DTT
5. Ke každé zkumavce se vzorkem kromě RT- se přidá 1 µl (200 U) M-MLV reverzní transkriptázy, dobře se promíchá.
6. Vzorky se dají do cykleru.
7. Vzorky projdou následujícími teplotními fázemi:
  - a. Inkubace při 37 °C po dobu 2 minut
  - b. Inkubace při 25 °C po dobu 10 minut
  - c. Inkubace při 37 °C po dobu 50 minut
  - d. Závěrečná denaturace při 70 °C po dobu 10 minut
  - e. Finální zchlazení na 4 °C
8. Takto připravenou cDNA lze přímo použít jako templát (zpravidla 2 µl) pro další PCR analýzy. cDNA se uchovává v mrazničce při -20 °C.

Odborníkovi v oboru jsou známy další postupy přípravy cDNA, které mohou vést ke stejnému výsledku.

### 3.2.3 Real-time PCR detekce

#### 3.2.3.1. Úvod

Metodika je validována pro současnou detekci virů SMYEV, SCV, SVBV, SMOV a SPV-1 v jedné reakci (multiplexní uspořádání). Metodiku lze použít jak pro kvalitativní, tak kvantitativní detekci přítomnosti jednotlivých virů. Jako marker pro kontrolu kvality izolace RNA a přípravy cDNA se používá test na přítomnost transkriptu pro rostlinný mitochondriální gen *Nad5* (NADH dehydrogenase subunit 5; Interní pozitivní kontrola, IPC).

Vlastní detekce je založena na použití specifických primerů a sond, které je možné zakoupit zvlášť nebo použít StrawVir I qPCR-RG detekční kit, který obsahuje všechny reagentie pro real-time PCR detekci pro cykler Rotor-Gene Q [Qiagen] (k.č. StrawVir I\_qPCR-RG; výrobce a dodavatel: VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.). SONDY musí být vhodně označeny vzhledem k zamýšlenému použití a detekčním možnostem používaného real-time PCR cyklu. Pro detekci v multiplexním uspořádání se doporučuje sondy označit tak, aby vrcholy jejich emisních spekter byly co nejdále od sebe vzhledem k detekčním schopnostem příslušného cyklu.

Vzhledem k rozmanitosti používaných real-time PCR cyklerů, PCR reagentií, analyzačních software a dalších faktorů je níže uvedený postup pouze ukázkový a odborník v oboru si tento postup přizpůsobí ke konkrétním podmínkám technického a materiálního vybavení laboratoře.

#### 3.2.3.2. Materiál

Metodika real-time PCR detekce virů SMYEV, SCV, SVBV, SMOV a SPV-1 v biologickém materiálu je validována pro přístroj Rotor-Gene Q (Qiagen), s využitím následujícího materiálu a reagentií:

● Pro multiplexní detekci virů SMYEV, SCV, SVBV, SMOV a SPV-1 se používají následující primery a sondy:

**SMYEV:** Forward primer: CCCTCCTGACGTACACAACAACCTG  
Reverse primer 1: CCGTGAGGGAGGAGAATACGC  
Reverse primer 2: CCGTGAGGGAGGAGAATACAC  
Sonda: 6-FAM-TACTCTAGTYGCCATCGAGGTACAGTGC-BHQ1

**SCV:** Forward primer 1: ACAGTRTGCGCTTTAGAGGTTGTT  
Forward primer 2: ACAGTGTGCGCTTTAGAGGTTATTC  
Forward primer 3: ACAGTGTGCGCTTTAGAAGTTGTT  
Reverse primer 1: ACCTGATTATCTCCCATYCCCATT  
Reverse primer 2: ACTTGATTATCCCCATCCCCA  
Sonda 1: HEX-TCTCAATAYGATTGTACATACCGCAT-BHQ1  
Sonda 2: HEX-TCTCAATACGATTGCACATATCGCAT-BHQ1

**SVBV:** Forward primer: AATATCTGTCTTTACTTGATSATGAACTTG  
Reverse primer 1: CGTCTTCGCTGCTGCTGTAGTC  
Reverse primer 2: CATCTTCACTGCTGCTGCTGTAG  
Sonda: ROX-AGTTACAGGTACTIONTGTAGCAAAGARATGA-BHQ2

**SMoV:** Forward primer: GTAGGACACCGGCTCTTGGYAGT  
Reverse primer: TTGGRTCGTCACCTGAYCTCG  
Sonda: Cy5-ACAGGWGGCACTGTTTACAGTGTTC-BHQ3

**SPV-1:** Forward primer: CAACTGGGGTCGTACACTCGC  
Reverse primer: GGCCAGCCGAATCCTTTGAC  
Sonda: IRDye700-ACCTACCCTGAACTCGCCGAACA-BHQ3

- Jako marker pro kontrolu kvality izolace RNA a přípravy cDNA se používá test na přítomnost transkriptu pro mitochondriální gen *Nad5*. Pro jeho detekci se používají následující primery a sonda:  
Forward primer: GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGTT  
Reverse primer: ACATAAATCGAGGGCTATGCGG  
Sonda: 6-FAM-CCACAATTAACATCACTACGGTCGGGCTA-BHQ1
- Pro vlastní real-time PCR se používá qPCR 2x Blue Master Mix (výrobce a dodavatel: Top-Bio, k.č. P523) podle návodu výrobce.
- Pro rutinní diagnostiku lze doporučit StrawVir I qPCR-RG detekční kit (výrobce a dodavatel: VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.), který obsahuje předmíchané PCR premixy a systém kontrol pro snadné a rychlé sestavení PCR reakce. Kit obsahuje:
  - UniPmxI: premix obsahující všechny nezbytné komponenty pro PCR amplifikaci
  - StrawVir I PmxII: premix obsahující všechny nezbytné komponenty pro specifickou detekci virů SMYEV, SCV (kmeny A i B), SVBV (evropská i kanadská forma), SMoV a SPV-1 jedné reakci
  - IPC PmxII – premix obsahující všechny nezbytné komponenty pro specifickou detekci interní pozitivní kontroly (IPC), která slouží jako kontrola kvality izolované RNA a připravené cDNA
  - SMYEV Ctrl [500 000 kopií/μl]: pozitivní kontrola pro ověření správnosti PCR pro detekci viru SMYEV
  - SCV-A Ctrl [500 000 kopií/μl]: pozitivní kontrola pro ověření správnosti PCR pro detekci viru SCV-A
  - SCV-B Ctrl [500 000 kopií/μl]: pozitivní kontrola pro ověření správnosti PCR pro detekci viru SCV-B
  - SVBV Ctrl [500 000 kopií/μl]: pozitivní kontrola pro ověření správnosti PCR pro detekci viru SVBV (evropská forma)



- SMoV Ctrl [500 000 kopií/μl]: pozitivní kontrola pro ověření správnosti PCR pro detekci viru SMoV
- SPV-1 Ctrl [500 000 kopií/μl]: pozitivní kontrola pro ověření správnosti PCR pro detekci viru SPV-1
- IPC Ctrl [500 000 kopií/μl]: pozitivní kontrola pro ověření správnosti PCR pro detekci IPC.
- Použitý spotřební materiál: Sterilní zkumavky 1,5 ml; PCR stripy pro Rotor-Gene Q; stojánky na zkumavky; špičky s filtrem; voda v kvalitě vhodné pro PCR.

### 3.2.3.3. Sestavení vlastní real-time PCR reakce

- Příprava PCR reakce probíhá v prostorách k tomu určených v rámci laboratoře molekulární biologie (PCR area) s využitím PCR boxů a v souladu s principy správné laboratorní praxe.
- Přidávání syntetických pozitivních kontrol probíhá výhradně v místnosti post-PCR area.
- Pro pipetování se používají špičky s filtrem.
- Vzorky se doporučuje analyzovat v duplikátech.
- Všechny PCR komponenty se před zahájením práce vyjmou z mrazničky a nechají se roztát při pokojové teplotě.
- Před použitím je vhodné PCR komponenty promíchat krátkým vortexováním a dle potřeby stočit na minicentrifuze.
- Pro zajištění validity výsledků se používá systém minimálně následujících kontrol:
  - Kontrola bez přidaného templátu (No-Template Control; NTC)  
Jedná se o kontrolu bez přidání vzorku. Tato kontrola se používá vždy u každého testování.
  - Pozitivní kontrola  
Jedná se o kontrolu, která je pozitivní v definovaném rozsahu. Zpravidla se jedná o syntetickou pozitivní kontrolu o známé koncentraci.
  - Interní kontrola kvality izolované RNA/cDNA, interní pozitivní kontrola (IPC)  
Používá se real-time PCR systém pro detekci transkriptu pro rostlinný mitochondriální gen *Nad5*. Přítomnost tohoto transkriptu a hodnoty Ct jsou brány jako indikátor kvality izolované RNA/cDNA. Tato kontrola se provádí ke každému testovanému vzorku.
- Primárně je následující postup určen pro kvalitativní nebo semi-kvantitativní detekci virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1. Ředěním syntetické pozitivní kontroly lze však získat standardní kalibrační křivku, podle které je možné provádět vyhodnocení kvantitativně.
- Pro úsporu času a financí lze připravit jednu syntetickou pozitivní kontrolu smícháním některých nebo všech syntetických standardů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1.

\*\*\*\*\*

1. V PCR boxu se do kovového stojánku připraví potřebný počet 0,1ml stripů včetně mikrozkumavek pro NTC (netemplátovaná kontrola) a syntetickou pozitivní kontrolu, případně další různé řaděné standardy pro tvorbu kalibrační křivky pro kvantitativní stanovení.
2. Podle počtu současně míchaných PCR mastermixů se do stojánku připraví 1,5ml mikrozkumavky, do kterých se připraví adekvátní množství PCR mastermixu dle typu reakce a rozpisu:

*Rozpis pro současnou detekci virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 s využitím základních PCR komponent*

<b>SMYEV + SCV + SVBV + SMoV + SPV-1</b>	<b>Na 1 vzorek</b>	<b>Finální konc.</b>
PCR voda	4,68 µl	
SMYEV forward primer (50 µM)	0,22 µl	0,55 µM
SMYEV reverse primer 1 (50 µM)	0,22 µl	0,55 µM
SMYEV reverse primer 2 (50 µM)	0,22 µl	0,55 µM
SMYEV sonda (50 µM)	0,1 µl	0,25 µM
SCV forward primer 1 (50 µM)	0,22 µl	0,55 µM
SCV forward primer 2 (50 µM)	0,22 µl	0,55 µM
SCV forward primer 3 (50 µM)	0,12 µl	0,3 µM
SCV reverse primer 1 (50 µM)	0,22 µl	0,55 µM
SCV reverse primer 2 (50 µM)	0,22 µl	0,55 µM
SCV sonda 1 (50 µM)	0,06 µl	0,15 µM
SCV sonda 2 (50 µM)	0,06 µl	0,15 µM
SVBV forward primer (50 µM)	0,2 µl	0,5 µM
SVBV reverse primer 1 (50 µM)	0,1 µl	0,25 µM
SVBV reverse primer 2 (50 µM)	0,1 µl	0,25 µM
SVBV sonda (50 µM)	0,08 µl	0,2 µM
SMoV forward primer (50 µM)	0,2 µl	0,5 µM
SMoV reverse primer (50 µM)	0,2 µl	0,5 µM
SMoV sonda (50 µM)	0,08 µl	0,2 µM
SPV-1 forward primer (50 µM)	0,2 µl	0,5 µM
SPV-1 reverse primer (50 µM)	0,2 µl	0,5 µM
SPV-1 sonda (50 µM)	0,08 µl	0,2 µM
qPCR 2x Blue Master Mix	10 µl	1x
<b>Celkem</b>	<b>18 µl</b>	

*Rozpis pro současnou detekci SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 s využitím StrawVir I qPCR-RG detekčního kitu*

- Dodavatel: VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.
- Kit obsahuje v základním balení komponenty pro provedení 100 testů. Přesný obsah kitu je uveden výše.

SMYEV + SCV + SVBV + SMoV + SPV-1	Na 1 vzorek
PCR voda	7 µl
StrawVir I PmxII	1 µl
UniPmxI	10 µl
<b>Celkem</b>	<b>18 µl</b>

*Rozpis pro IPC s využitím základních PCR komponent*

IPC	Na 1 vzorek	Finální konc.
PCR voda	6,6 µl	
IPC forward primer (10 µM)	0,5 µl	0,25 µM
IPC reverse primer (10 µM)	0,5 µl	0,25 µM
IPC sonda (10 µM)	0,4 µl	0,2 µM
qPCR 2x Blue Master Mix	10 µl	1x
<b>Celkem</b>	<b>18 µl</b>	

*Rozpis pro IPC s využitím StrawVir I qPCR-RG detekčního kitu (součást kitu)*

IPC	Na 1 vzorek
PCR voda	7 µl
IPC PmxII	1 µl
UniPmxI	10 µl
<b>Celkem</b>	<b>18 µl</b>

Detaily komponent kitu uvedeny výše.

3. Připravený mastermix se krátce vortexuje a krátce se centrifuguje.
4. Mastermix se rozpipetuje do PCR stripů po 18 µl.
5. K mastermixu se postupně pipetují 2 µl neředěné cDNA testovaného vzorku.
6. Po uzavření všech zkumavek se v post-PCR místnosti přidají 2 µl syntetické pozitivní kontroly (tedy 1 milion kopií/reakci) pro detekci SMYEV, SCV-A, SCV-B, SVBV, SMoV, SPV-1 a IPC.

7. Po zapnutí Rotor-Gene Q se připraví templát s následujícími parametry:

Teplotní podmínky

PCR: 1 cyklus: 94 °C 5 min

50 cyklů: 94 °C 20 s

58 °C 20 s; čtení v zeleném kanálu pro SMYEV a IPC;

čtení ve žlutém kanálu pro SCV;

čtení v oranžovém kanálu pro SVBV;

čtení v červeném kanálu pro SMOV;

čtení v karmínovém kanálu pro SPV-1

72 °C 20 s

- Pro použité fluorofory se doporučuje nastavit „Gains“ na následující hodnoty. Green: 5,33; Yellow: 6; Orange: 6; Red: 7; Crimson: 7

Jedná se pouze o orientační hodnoty, přesné nastavení si musí uživatel provést sám během prvních třech cyklů nebo po prvním běhu dle návodu výrobce.

- Předprogramovaný templát lze získat i na kontaktním e-mailu:

***laboratorni.komplement@vsuo.cz***

- Celý proces amplifikace trvá cca 2,5 hodiny.

8. PCR produkty je možné uchovávat při teplotě  $\leq -18$  °C po dobu minimálně jednoho roku.

### 3.2.3.4. Poznámka pro uživatele jiného typu real-time PCR cykleru

Uživatelé jiných real-time PCR cyklerů než Rotor-Gene Q se musí před objednáním sond (detekčního kitu) seznámit s možnostmi detekce různých fluoroforů na svém PCR cykleru a s možnostmi příslušného analyzačního softwaru. Dále je nutné posoudit možnosti přístroje pro multiplexování a naprogramovat příslušný PCR protokol.

### 3.3 Post-analytická fáze

V této fázi se vyhodnocují výsledky a na základě všech dostupných informací se provádí jejich interpretace.

Kritické body post-analytické fáze, na které je třeba zvláště dbát:

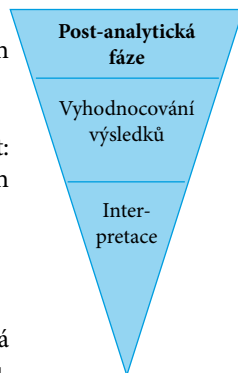
- Správné vyhodnocení systému kontrol zajišťujících validitu výsledků.

#### 3.3.1 Vyhodnocování, analýza dat

##### 3.3.1.1. Vyhodnocení PCR běhu u přístroje Rotor-Gene Q

Pro vyhodnocení PCR běhu se používá identický software jako pro ovládání cykleru.

Přesný postup vyhodnocování různých typů experimentů je uveden v příručce výrobce cykleru nebo přímo v nápovědě tohoto softwaru.

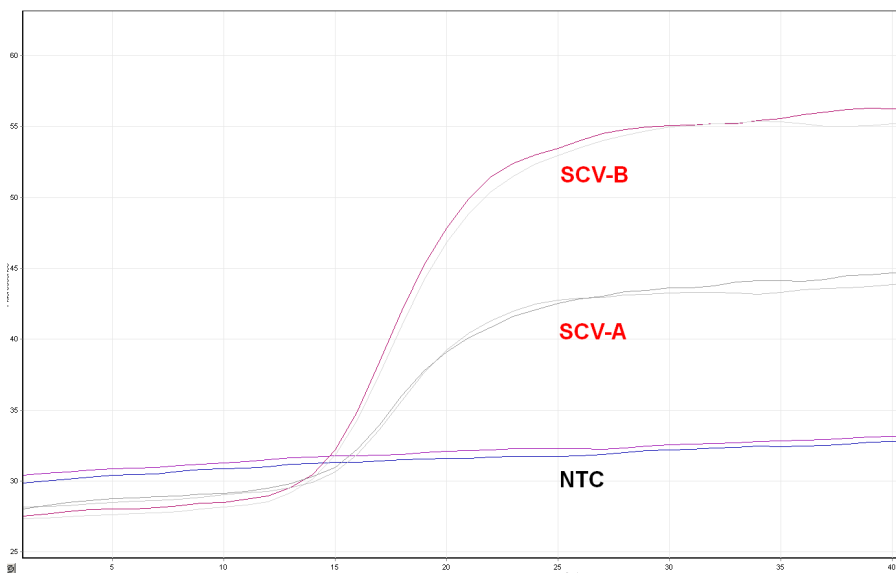


Po ukončení běhu se provádí vyhodnocení odečtením hodnoty Ct v zeleném kanálu pro detekci viru SMYEV a interní kontroly kvality (IPC); ve žlutém kanálu pro detekci viru SCV bez rozlišení kmene; v oranžovém kanálu pro detekci viru SVBV (bez rozlišení geografické formy); v červeném kanálu pro detekci viru SMoV; a v karmínovém kanálu pro detekci viru SPV-1. Použité parametry:

Dynamic tube:	ANO
Slope correct:	ANO
Ignore first:	Fakultativně. Doporučuje se použít v případech, kdy fluorescence během první cca 10 cyklů vykazuje průběh ve tvaru písmena „U“.
	Zpravidla se stává v oranžovém kanálu pro sondy značné ROX.
Threshold:	0,01
Eliminate cycles before:	Dle potřeby

Pokud se provádí kvantitativní hodnocení výsledků, software vytvoří na základě hodnot sérií různě řaděných standardů a zadaných údajů kalibrační křivku a provede absolutní kvantifikaci přítomnosti viru SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 v požadovaných jednotkách.

Pro orientační odlišení detekovaného kmene SCV lze využít různého tvaru amplifikační křivky pro oba kmeny: SCV-A má obecně nižší maximální fluorescenci než kmen SCV-B (obrázek níže). Jedná se však pouze o orientační stanovení, kmeny se často vyskytují v koinfekcích, takže nelze podle výsledných křivek věrohodně kmen stanovit. V případě potřeby znalosti kmene se doporučuje provést sekvenování příslušného PCR ampliconu.



### 3.3.1.2. Vyhodnocení systému kontrol kvality

#### Interní kontrola kvality (IPC)

Interní kontrola kvality (IPC) slouží ke dvěma účelům: kontrola kvality izolace RNA a přípravy cDNA a zároveň jako inhibiční kontrola. Technicky se jedná o detekci mitochondriálního transkriptu *Nad5*, který je přítomen v každém rostlinném pletivu a musí pro každý vzorek vyjít pozitivní. Doporučuje se hodnoty Ct dlouhodobě sledovat, protože pro obdobné vzorky bývají hodnoty při standardních podmínkách velmi podobné. Využití této kontroly je tedy výhodné zejména pro pracoviště provádějící rutinní diagnostiku zejména v akreditovaném režimu, neboť kontrolu lze využít jako kritérium hodnocení kvality celého předešlého procesu.

Při použití StrawVir I qPCR-RG detekčního kitu v přístroji Rotor-Gene Q lze pro přiložený IPC standard při použití 1 milion kopií v PCR reakci očekávat rozpětí hodnot Ct dle následující tabulky.

*Přehled očekávaných výsledků pro systém kontrol, které jsou součástí StrawVir I qPCR-RG detekčního kitu. Rozmezí představuje průměr ± 3 směrodatné odchylky.*

Standard [1mil. kopií/rci]	Očekávaná hodnota Ct
IPC	18,93 – 19,77
SMYEV	17,88 – 18,85
SCV-A	18,94 – 20,14
SCV-B	18,36 – 19,42
SVBV	17,22 – 17,96
SMoV	15,87 – 16,26
SPV-1	15,48 – 16,33

Poznámka: Rozpětí očekávaných hodnot Ct se mohou mírně odlišovat v závislosti na šarži kitu.

#### Kontrola kvality PCR reakce

Pro kontrolu kvality PCR reakce se používají dva typy kontrol. Pozitivní kontrolu může představovat charakterizovaný vzorek nebo zpravidla syntetický standard, který má stejnou sekvenci jako cílové místo pro PCR amplifikaci. Pozitivní kontrola představuje referenční materiál s definovaným rozpětím hodnot Ct, ve kterém se při zohlednění reprodukovatelnosti metody musí nálezy pohybovat u každého PCR běhu bez ohledu na osobu provádějící analýzu.

Při použití StrawVir I qPCR-RG detekčního kitu v přístroji Rotor-Gene Q lze pro přiložené standardy SMYEV, SCV-A, SCV-B, SVBV, SMoV a SPV-1 při použití v koncentraci 1 milion kopií v PCR reakci očekávat rozpětí hodnot Ct dle tabulky výše.

Negativní kontrola představuje PCR reakci bez přidaného templátu, tzv. netemplátovaná kontrola (NTC). NTC by měla být za všech okolností u každého PCR běhu negativní.

### Další kontroly

Pro kontrolu případné kontaminace reagensií používaných pro izolace RNA lze doporučit zařazení tzv. extrakční kontroly, kdy se provede izolace bez rostlinného materiálu. S touto kontrolou se poté pracuje jako se vzorkem. Extrakční kontrola by měla být za všech okolností u každého PCR běhu negativní.

Jako další kontrolu lze doporučit kontrolu přípravy cDNA. Z RNA příslušného vzorku se paralelně připravují dvě cDNA s tím, že do jednoho vzorku se nepřidá reverzní transkriptáza (tzv. RT- kontrola). RT- kontrola by měla být za všech okolností u každého PCR běhu negativní.

#### 3.3.1.3. Akceptace a interpretace výsledků

Pokud si laboratoř nestanoví jinak, výsledky z PCR běhu se akceptují, pokud:

- Všechny pozitivní kontroly jsou pozitivní v definovaném rozsahu.
- Všechny NTC kontroly jsou negativní.
- Extrakční kontrola je negativní.
- RT- kontrola je negativní.
- IPC je pozitivní v definovaném rozsahu.

Na základě typu analýzy lze výsledky interpretovat:

- Kvalitativně
  - Virus detekován/nedetekován; pozitivní/negativní výsledek
- Semi-kvantitativně
  - Na základě reálných zkušeností nebo statistických metod lze nálezy podle hodnot Ct přibližně kvantifikovat do různých kategorií, např.:
    - - / + / ++ / +++
    - Negativní / slabě pozitivní / pozitivní / silně pozitivní
    - Lze též zavést kategorii pro výsledky na spodní hranici detekovatelnosti, které již vykazují nízkou míru reprodukovatelnosti, např. „výsledek podezřelý“ nebo „potenciálně pozitivní“ aj.
- Kvantitativně
  - Na základě sestavené kalibrační křivky lze výsledky vydávat kvantitativně, např. v kopiích nalezeného viru na hmotnost původního materiálu.

#### 3.3.2 Poznámka pro uživatele jiného typu real-time PCR cyklieru

Uživatelé jiných typů real-time cyklierů provádějí vyhodnocení dle doporučení výrobce daného cyklieru pro jednotlivé typy analýz.

### 3.4 Validace metody

Validace metody byla provedena podle výše uvedených postupů izolace RNA, přípravy cDNA a real-time PCR s využitím kitu StrawVir I qPCR-RG (multiplexní detekce) s přístrojem Rotor-Gene Q. Uživatelé jiných postupů a jiných real-time PCR cyklierů si musí provést validaci metody a stanovení výkonnostních charakteristik na svém pracovišti podle svých postupů s ohledem na své laboratorní vybavení.

Validace předkládané metodiky byla provedena podle protokolu EPPO č. PM 7/98 (4): Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity.

Validace představuje proces, při kterém byly stanoveny základní výkonnostní parametry metody. Tyto parametry by měly být adekvátní vzhledem k zamýšlenému použití dané metody. U předkládané metodiky byly stanoveny následující výkonnostní charakteristiky:

- Specifická
- Analytická senzitivita
- Opakovatelnost
- Reprodukovatelnost

### 3.4.1 Stanovení specifickosti

#### Metodika

Specifická je zajištěna ve dvou krocích:

A) Specifická definovaná *in silico*.

Pro výběr vhodné oblasti pro návrh primerů byla provedena multiple-alignment analýza dostupných sekvencí virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1. Při výběru vhodné oblasti se primárně přihlíželo k tomu, aby tento úsek byl specifický pro daný virus a zároveň dostatečně konzervován, aby byly detekovány všechny případné kmeny. Byly navrženy zkušební primery v oblasti, která je specifická pouze pro viry SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1.

Navržená oblast byla dále analyzována pomocí Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), aby se vyloučila přítomnost této oblasti u příbuzných virů.

B) Specifická ověřená na pozitivních a negativních vzorcích

Pomocí navržených primerů bylo provedeno testování souboru vzorků jahodníků odebraných v celé České republice, aby byla zajištěna co největší variabilita izolátů virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1. Získané amplikony byly sekvenovány (minimálně 50 vzorků), aby se zjistila genetická variabilita vybraných oblastí. Na základě těchto analýz byly poté navrženy finální primery a sondy pro detekci virů SMYEV, SCV, SMoV a SPV-1. Tyto byly následně zpětně testovány na souboru původních vzorků jahodníku a výsledky porovnány s původními nálezy. Výjimkou byl virus SVBV, který se nepodařilo ve vzorcích nalézt. Detekční systém byl proto rigorózně testován pouze s použitím syntetických standardů.

Všechny podstatné kroky vývoje detekčního systému byly verifikovány sekvenačně. Specifická byla též ověřena na negativních vzorcích.

#### Očekávaná hodnota parametru

- Očekává se 100% specifická pro diagnostiku jednotlivých virů.

#### Výsledky

Testované negativní vzorky byly negativní, u pozitivních vzorků byla detekována



přítomnost příslušného viru. Pozitivní i negativní vzorky byly testovány a ověřeny i jinými metodami, např. pomocí jiné sady primerů nebo metodou ELISA.

#### *Závěr*

Diagnostická specifita metody je stanovena na 100 % pro viry SMYEV, SCV-A, SCV-B, SVBV, SMoV a SPV-1.

### 3.4.2 Stanovení analytické senzitivity

#### *Metodika*

Syntetické pozitivní kontroly pro SMYEV, SCV-A, SCV-B, SVBV, SMoV a SPV-1 identické s cílovými místy detekce o známé koncentraci 1 µg/µl byly postupně naředěny až na koncentraci 5 kopií/reakci (vypočítáno s pomocí DNA Calculator; <http://www.molbiotools.com/dnacalculator.html>). Do PCR reakce byly použity 2 µl pro analýzu senzitivity.

Pro analýzu byly připraveny tři ředící řady v opakování po osmi s cílem nalézt nejnižší koncentraci, u které budou všechny výsledky pozitivní u všech tří ředících řad.

Protože se jedná o multiplexní reakci se současnou detekcí pěti různých virů, byl testován i vliv multiplexování na analytickou senzitivitu porovnáním se simplexní detekcí konkrétního viru.

#### *Očekávaná hodnota parametru*

- Multiplexováním nedojde k snížení analytické senzitivity.
- Nejnižší dosažené ředění s konzistentní detekcí alespoň 5 000 kopií/reakci.

#### *Výsledky*

Pro analýzu vlivu multiplexování byly porovnány výsledky detekce virů SMYEV, SCV-A, SCV-B, SVBV, SMoV a SPV-1 v simplexním a multiplexním uspořádání při různých koncentracích syntetické pozitivní kontroly. Výsledky detekce jsou pro všechny viry v obou provedeních srovnatelné.

Pro metodu detekce všech testovaných virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 bylo nejnižší dosažené ředění, při kterém byly všechny výsledky pozitivní, 500 kopií/reakci.

#### *Závěr*

- Multiplexování nemá negativní vliv na výkonnost testu; výsledky jsou srovnatelné se simplexním uspořádáním pro SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1.
- Analytická senzitivita metody detekce SMYEV je stanovena na 500 kopií/reakci.
- Analytická senzitivita metody detekce SCV-A je stanovena na 500 kopií/reakci.
- Analytická senzitivita metody detekce SCV-B je stanovena na 500 kopií/reakci.
- Analytická senzitivita metody detekce SVBV je stanovena na 500 kopií/reakci.
- Analytická senzitivita metody detekce SMoV je stanovena na 500 kopií/reakci.
- Analytická senzitivita metody detekce SPV-1 je stanovena na 500 kopií/reakci.

### 3.4.3 Stanovení opakovatelnosti

#### *Metodika*

Opakovatelností se rozumí stanovení variability měření při analýze vzorků stejnou osobou za stejných podmínek. Opakovatelnost byla určena při limitním ředění syntetického standardu, které bylo u detekce všech virů stanoveno na 500 kopií/reakci pomocí syntetické pozitivní kontroly.

Pro analýzu byly připraveny tři série v opakování po osmi vzorcích, které se analyzovaly v rámci jednoho PCR běhu za identických podmínek v multiplexním uspořádání se současnou detekcí SMYEV, SCV-A, SCV-B, SVBV, SMoV a SPV-1 v jedné reakci. U každé série se stanoví variační koeficient a celkový průměrný variační koeficient, který vyjadřuje míru shody naměřených Ct při limitním ředění mezi jednotlivými sériemi.

Pro kvalitativní analýzu se opakovatelnost stanoví jako procento pozitivních nálezů ze všech provedených testů pro každý virus při jeho limitním ředění, tj. 500 kopií/reakci.

#### *Očekávaná hodnota parametru*

Pro kvantitativní stanovení musí být variační koeficient pro limitní ředění  $\leq 2,5$  %.

Pro kvalitativní stanovení musí být výsledky testů pro limitní ředění pozitivní u všech vzorků (opakovatelnost 100%).

#### *Výsledky*

SMYEV: Míra shody mezi hodnotami z jednotlivých sérií měřená průměrným variačním koeficientem je  $0,0079 \pm 0,0005$ , tj. 0,79 %.

SCV-A: Míra shody mezi hodnotami z jednotlivých sérií měřená průměrným variačním koeficientem je  $0,0046 \pm 0,0015$ , tj. 0,46 %.

SCV-B: Míra shody mezi hodnotami z jednotlivých sérií měřená průměrným variačním koeficientem je  $0,0070 \pm 0,0010$ , tj. 0,70 %.

SVBV: Míra shody mezi hodnotami z jednotlivých sérií měřená průměrným variačním koeficientem je  $0,0060 \pm 0,0008$ , tj. 0,60 %.

SMoV: Míra shody mezi hodnotami z jednotlivých sérií měřená průměrným variačním koeficientem je  $0,0042 \pm 0,0014$ , tj. 0,42 %.

SPV-1: Míra shody mezi hodnotami z jednotlivých sérií měřená průměrným variačním koeficientem je  $0,0059 \pm 0,0016$ , tj. 0,59 %.

Pro všechny testované viry (SMYEV, SCV-A, SCV-B, SVBV, SMoV a SPV-1) byly zaznamenány pozitivní nálezy ve všech vzorcích, opakovatelnost je 100%.

#### *Závěr*

- Opakovatelnost metody detekce SMYEV při limitním ředění je stanovena jako průměrný variační koeficient s hodnotou 0,79 %.
- Opakovatelnost metody detekce SCV-A při limitním ředění je stanovena jako průměrný variační koeficient s hodnotou 0,46 %.
- Opakovatelnost metody detekce SCV-B při limitním ředění je stanovena jako průměrný variační koeficient s hodnotou 0,70 %.

- Opakovatelnost metody detekce SVBV při limitním ředění je stanovena jako průměrný variační koeficient s hodnotou 0,60 %.
- Opakovatelnost metody detekce SMoV při limitním ředění je stanovena jako průměrný variační koeficient s hodnotou 0,42 %.
- Opakovatelnost metody detekce SPV-1 při limitním ředění je stanovena jako průměrný variační koeficient s hodnotou 0,59 %.
- Opakovatelnost metody detekce virů SMYEV, SCV-A, SCV-B, SVBV, SMoV a SPV-1 při limitním ředění pro kvalitativní účely je 100%.

### 3.4.4 Stanovení reprodukovatelnosti

#### *Metodika*

Reprodukovatelností se rozumí stanovení variability měření při analýze vzorků, které nezávisle na sobě provádějí různí pracovníci. Reprodukovatelnost byla určena při limitním ředění syntetického standardu, které bylo u detekce všech virů SMYEV, SCV-A, SCV-B, SVBV, SMoV a SPV-1 stanoveno na 500 kopií/reakci pomocí syntetické pozitivní kontroly.

Pro analýzu byly připraveny tři série v opakování po osmi vzorcích, které se analyzovaly ve třech nezávislých PCR bězích provedených různými pracovníky. Byl stanoven variační koeficient, který vyjadřuje míru shody naměřených Ct při limitním ředění mezi jednotlivými nezávislými PCR běhy.

Pro kvalitativní analýzu se reprodukovatelnost stanoví jako procento pozitivních nálezů ze všech provedených testů pro každý virus.

#### *Očekávaná hodnota parametru*

Pro kvantitativní stanovení musí být variační koeficient pro limitní ředění  $\leq 5$  %.

Pro kvalitativní stanovení musí být výsledky testů pro limitní ředění pozitivní u všech vzorků (reprodukovatelnost 100%).

#### *Výsledky*

SMYEV: Míra shody mezi hodnotami z jednotlivých sérií provedených různými pracovníky v různých PCR bězích měřená variačním koeficientem je 0,0078, tj. 0,78 %.

SCV-A: Míra shody mezi hodnotami z jednotlivých sérií provedených různými pracovníky v různých PCR bězích měřená variačním koeficientem je 0,0082, tj. 0,82 %.

SCV-B: Míra shody mezi hodnotami z jednotlivých sérií provedených různými pracovníky v různých PCR bězích měřená variačním koeficientem je 0,0078, tj. 0,78 %.

SVBV: Míra shody mezi hodnotami z jednotlivých sérií provedených různými pracovníky v různých PCR bězích měřená variačním koeficientem je 0,0081, tj. 0,81 %.

SMoV: Míra shody mezi hodnotami z jednotlivých sérií provedených různými pracovníky v různých PCR bězích měřená variačním koeficientem je 0,0092, tj. 0,92 %.

SPV-1: Míra shody mezi hodnotami z jednotlivých sérií provedených různými pracovníky v různých PCR bězích měřená variačním koeficientem je 0,0098, tj. 0,98 %.

Pro všechny testované viry (SMYEV, SCV-A, SCV-B, SVBV, SMoV a SPV-1) byly zaznamenány pozitivní nálezy ve všech vzorcích, reprodukovatelnost je 100%.

## Závěr

- Reprodukovatelnost metody detekce SMYEV při limitním ředění je stanovena jako variační koeficient s hodnotou 0,78 %.
- Reprodukovatelnost metody detekce SCV-A při limitním ředění je stanovena jako variační koeficient s hodnotou 0,82 %.
- Reprodukovatelnost metody detekce SCV-B při limitním ředění je stanovena jako variační koeficient s hodnotou 0,78 %.
- Reprodukovatelnost metody detekce SVBV při limitním ředění je stanovena jako variační koeficient s hodnotou 0,81 %.
- Reprodukovatelnost metody detekce SMoV při limitním ředění je stanovena jako variační koeficient s hodnotou 0,92 %.
- Reprodukovatelnost metody detekce SPV-1 při limitním ředění je stanovena jako variační koeficient s hodnotou 0,98 %.
- Reprodukovatelnost metody detekce virů SMYEV, SCV-A, SCV-B, SVBV, SMoV a SPV-1 při limitním ředění pro kvalitativní účely je 100%.

### 3.4.5 Zjednodušený validační protokol

\*\*\*\*\*

<b>Název zkušebního postupu:</b>	Detekce virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 metodou real-time PCR
<b>Identifikace zkušebního postupu:</b>	SOP_LMB_02; PP_LMB_12
<b>Předmět zkoušky:</b>	Rostlinný materiál
<b>Poznámky:</b>	Multiplexní reakce; Rotor-Gene Q SMYEV v zeleném kanálu SCV-A/SCV-B ve žlutém kanálu SVBV v oranžovém kanálu SMoV v červeném kanálu SPV-1 v karmínovém kanálu

<b>Výkonnostní parametry</b>	<b>Hodnota, komentář</b>
<i>Specificita</i>	
Diagnostická specificita SMYEV	100%
Diagnostická specificita SCV-A/SCV-B	100%
Diagnostická specificita SVBV	100%
Diagnostická specificita SMoV	100%
Diagnostická specificita SPV-1	100%
<i>Senzitivita</i>	
Analytická senzitivita SMYEV	500 kopií/reakci
Analytická senzitivita SCV-A/SCV-B	500 kopií/reakci
Analytická senzitivita SVBV	500 kopií/reakci
Analytická senzitivita SMoV	500 kopií/reakci
Analytická senzitivita SPV-1	500 kopií/reakci

### *Opakovatelnost*

Opakovatelnost SMYEV	Průměrný variační koeficient 0,79 % pro limitní ředění
Opakovatelnost SCV-A	Průměrný variační koeficient 0,46 % pro limitní ředění
Opakovatelnost SCV-B	Průměrný variační koeficient 0,70 % pro limitní ředění
Opakovatelnost SVBV	Průměrný variační koeficient 0,60 % pro limitní ředění
Opakovatelnost SMoV	Průměrný variační koeficient 0,42 % pro limitní ředění
Opakovatelnost SPV-1	Průměrný variační koeficient 0,59 % pro limitní ředění

Opakovatelnost metody detekce virů SMYEV, SCV-A, SCV-B, SVBV, SMoV a SPV-1 při limitním ředění pro kvalitativní účely je 100%.

### *Reprodukovatelnost*

Reprodukovatelnost SMYEV	Variační koeficient 0,78 % pro limitní ředění
Reprodukovatelnost SCV-A	Variační koeficient 0,82 % pro limitní ředění
Reprodukovatelnost SCV-B	Variační koeficient 0,78 % pro limitní ředění
Reprodukovatelnost SVBV	Variační koeficient 0,81 % pro limitní ředění
Reprodukovatelnost SMoV	Variační koeficient 0,92 % pro limitní ředění
Reprodukovatelnost SPV-1	Variační koeficient 0,98 % pro limitní ředění

Reprodukovatelnost metody detekce virů SMYEV, SCV-A, SCV-B, SVBV, SMoV a SPV-1 při limitním ředění pro kvalitativní účely je 100%.

### **Závěr:**

Na základě uvedených výkonnostních parametrů je možné zkušební postup používat pro detekci virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 metodou real-time PCR v rostlinném materiálu dle SOP\_LMB\_02 a PP\_LMB\_12.

### **Dokumentace**

Zpráva\_z\_validace\_StrawVirI\_200121.doc

**Vypracovala dne:** 21. 1. 2020 Mgr. Lucie Valentová

**Schválil dne:** 21. 1. 2020 RNDr. Radek Čmejla, Ph.D., Vedoucí laboratoře

\*\*\*\*\*Konec validačního protokolu\*\*\*\*\*

## **4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ**

Pro detekci virů SCV, SMYEV, SVBV a SMoV v jahodníku se v současné době používají metody založené na principu molekulárních metod, pouze virus SMYEV je možné detekovat imunoenzymatickou metodou ELISA pomocí komerčně dostupné soupravy (Bioreba). Existují i další metody, např. metoda vizuálního hodnocení symptomů, která je však z důvodů latentních a nezřetelných příznaků infekce nedostačující. Biologický indexing využívající princip roubování testovaných rostlin na indikátorovou rostlinu, je metoda časově náročná a zdlouhavá. Výběr vhodných indikátorů pro viry SMYEV, SCV, SVBV a SMoV je uveden v certifikačním schématu

PM 4/11 (2) Schemes for the production of healthy plants for planting, Certification scheme for strawberry.

V literatuře jsou popisovány metody pro detekci virů jahodníku převážně na principu klasické RT-PCR, ať v multiplexním či simplexním uspořádání. Studií, které by popisovaly metody na principu real-time RT-PCR, je v literatuře dostupných méně a většinou se jedná o metody v simplexním uspořádání. Multiplexní klasickou RT-PCR pro jahodníkové viry (SCV, SMYEV, SVBV a SMoV) navrhli Thompson *et al.* (2003). Ti do svého testování jako interní kontrolu, která slouží pro kontrolu izolace RNA a přípravy cDNA, zařadili detekci mitochondriálního genu *Nad5*. Chang *et al.* (2007) provedli multiplexování klasické RT-PCR pro detekci virů SMYEV, SMoV a SVBV a Zhihong *et al.* (2006) pro detekci SMYEV a SMoV. Klasickou metodu RT-PCR v simplexním uspořádání použili i Constable *et al.* (2010), sledovali přítomnost virů SCV, SMYEV, SVBV a SMoV ve vzorcích jahodníků v závislosti na ročním období. Detekci jahodníkových virů na principu RT-PCR v simplexním uspořádání v souvislosti s produkcí bezvirózního rozmnožovacího materiálu řešili Martin & Tzanetakis (2013). Mezi další výzkumníky, kteří se zabývali detekcí více jahodníkových virů v jednom vzorku metodu RT-PCR v simplexním uspořádání můžeme zařadit i Contreras *et al.* (2014). Cubero *et al.* (2009) testovali jahodníkové viry SMoV, SMYEV a SCV metodou na principu real-time RT-PCR s využitím TaqMan sond v simplexním uspořádání. Mumford *et al.* (2004) navrhli pro rutinní detekci SCV real-time RT-PCR s využitím TaqMan sondy.

Nevýhodou výše zmíněných PCR přístupů může být skutečnost, že pomocí nich není možné provést současné kvalitativní/kvantitativní stanovení všech pěti virů, a obecně nižší citlivost klasického PCR v kombinaci s gelovou elektroforézou, neboť real-time PCR je obecně považováno za citlivější a praktičtější metodu. Real-time PCR s využitím SYBR Green zase neumožňuje jednoduché multiplexování, i když kvantitativní stanovení umožňuje.

## 5. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Validovaná metodika real-time PCR detekce virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 v biologickém materiálu může být využita v celé řadě aplikací, např.:

- Rutinní diagnostika virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 v biologickém materiálu
- Testování zdravotního stavu rozmnožovacího materiálu
- Monitoring přítomnosti virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 na daném území
- Studium šíření virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1
- Základní výzkum biologie virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1
- Studium vektorů daných virů
- Studium přirozených hostitelů
- Analýza hospodářské škodlivosti daných virů

Validovaná metodika real-time PCR detekce virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 v biologickém materiálu je určena pro laboratoře molekulární biologie, které se věnují virologickému výzkumu nebo diagnostice virových onemocnění, jako např.:

- Laboratoře Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZÚZ, Odbor diagnostiky škodlivých organismů rostlin)
- Referenční laboratoře
- Laboratoře v akademické sféře a dalších výzkumných institucích

## 6. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Validovaná metodika pro diagnostiku virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 metodou real-time PCR je optimalizována pro současnou detekci všech virů v jedné PCR reakci, eliminuje se tedy nutnost připravovat pět nezávislých PCR reakcí pro detekci těchto virů. Metodika tak zrychluje, zpřesňuje a zlevňuje diagnostiku onemocnění jahodníku, která jsou způsobena viry SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1. Díky tomu mohou laboratoře zpracovat s vyšší citlivostí za stejný čas větší množství vzorků za nižší cenu než doposud, což se samozřejmě promítne do ekonomiky laboratoře např. snížením nákladů na jednu analýzu, nebo uvolněním kapacity laboratoře pro další testy. Finanční přínos je však těžko odhadnutelný, bude záležet na aktivitách konkrétní laboratoře.

Rychlejší odezva laboratoře bude mít též pozitivní dopad na ekonomiku žadatele o vyšetření zdravotního stavu ovocných plodin, neboť může získat výsledky v kratším čase, a tak pružněji reagovat na obdržené výsledky. Odhad ekonomického přínosu pro tyto žadatele je těžko vyčíslitelný, bude záležet na rozsahu nákazy a rychlosti odezvy laboratoře provádějící testy.

Další, ekonomicky obtížně kvantifikovatelný, pozitivní dopad bude mít využití metodiky pro testování rozmnožovacího materiálu, kdy včasnou detekcí případných pozitivních rostlin bude zabráněno šíření virů množitelským materiálem a tím i budoucím ztrátám na výnosu v dalších letech.

V laboratořích, kde se rutinně provádí real-time PCR vyšetření přítomnosti RNA virů, souvisejí náklady pouze s nákupem primerů/sond (cena cca 40 000 Kč / 1 000 reakcí), případně celého kitu. Laboratoře, které by uvažovaly o kompletním zavedení metodiky bez předchozích zkušeností a přístrojového vybavení, musí počítat s následujícími náklady (orientační ceny, uvedeno bez DPH):

Izolace RNA:	50 izolací	7 000 Kč
Příprava cDNA:	200 reakcí	10 000 Kč
Primery+sondy	1 000 reakcí	40 000 Kč
PCR reagentie	1 000 reakcí	10 000 Kč
Real-time PCR cykler	1 ks	> 800 000 Kč

Další spotřební materiál pro laboratoře molekulární biologie.

Pro ilustraci je v tabulce níže uvedeno srovnání nákladů na provedení testu ELISA (k dispozici zatím pouze pro virus SMYEV) a real-time PCR detekce provedené v simplexním a multiplexním uspořádání. Celkové částky pro provedení imunoenzymatické metody ELISA a pro jednotlivé kombinace testování real-time PCR představují finanční náklady spojené pouze s nákupem potřebných reagensů a spotřebního materiálu.

Pro srovnání jsou uvedeny tři varianty testování real-time PCR. V první variantě byly započítány náklady na jednu izolaci RNA, následný přepis do cDNA a provedení real-time PCR reakce v multiplexním uspořádání. Ve druhém případě je vyčíslena jedna izolace RNA, jeden přepis do cDNA, ale PCR reakce je kalkulována pro provedení v simplexním uspořádání. Třetí varianta představuje náklady na pět izolací RNA, pět přepisů RNA do cDNA a PCR v simplexním uspořádání. Jedná se o nejnákladnější variantu, která v praxi nebude využívána, ale je zde uvedena pro srovnání.

*Porovnání finančních nákladů navrženého diagnostického systému real-time PCR s metodou ELISA.*

Metoda	Cena za testování pěti virů jahodníku (vč. spotřebního materiálu)
ELISA - 115 Kč/test	575 Kč
Real-time PCR v <u>multiplexním uspořádání</u> (1 izolace + 1 přepis)	390 Kč
Real-time PCR v <u>simplexním uspořádání</u> (1 izolace + 1 přepis)	487 Kč
Real-time PCR v <u>simplexním uspořádání</u> (5 izolací + 5 přepisů)	1 380 Kč

Z tabulky je patrné, že pro současné otestování virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 je ekonomicky nejvýhodnější metoda multiplexní real-time PCR.



## 7. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

BUCHTOVÁ, I. Situační a výhledová zpráva ovoce. Praha: Ministerstvo zemědělství. 2019. ISBN 978-80-7434-526-5.

CONCI, V.C., TORRICO, A.K., CAFRUNE, E., QUEVEDO, V., BAINO, O., RAMALLO, J.C., BORQUEZ, A.M., MOLLINEDO, V.A., AGÜERO, J.J., KIRSCHBAUM, D.S. First report of Strawberry mild yellow edge virus in Argentina. In: VI International Strawberry Symposium 842. 2008, p. 303-306. DOI: 10.17660/ActaHortic.2009.842.54

CONSTABLE, F.E., BOTTCHEER, C., KELLY, G., NANCARROW, N., MILINKOVIC, M., PERSELY, D.M., RODONİ, B.C. The seasonal detection of strawberry viruses in Victoria, Australia. *Julius-Kühn-Archiv*. 2010, 427, 27-36.

CONTRERAS PAREDES, C.A., SILVA ROSALES, L., GALLEGOS, V., ORTIZ CASTELLANOS, M.L., JOFRE GARFIAS, A.E., DÁVALOS GONZÁLEZ, P.A. Incidence of mixed viral infections in a strawberry producing area in Guanajuato, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 2014, 32(1): 12-25.

CUBERO, J., AYLLÓN, M.A., GELL, I., MELGAREJO, P., DE CAL, A., MARTÍN-SÁNCHEZ, P.M., PÉREZ-JIMÉNEZ, R. M., SORIA, C., SEGUNDO, LORENA, I. Detection of strawberry pathogens by real-time PCR. *Acta Horticulturae*. 2009, 842: 263-266.

DARA, S.K. Virus decline of strawberry in California and the role of insect vectors and associated viruses. *Plant Health Progress*. 2015, 16(4): 211-215. DOI: 10.1094/PHP-MR-15-0023.

FRÁNOVÁ, J., MRÁZ, I., PETRZIK, K., SPAK, J., SIP, M., BERTACCINI, A., ERBENOVÁ, M., KARESOVA, R. Occurrence of strawberry viruses and phytoplasmas in the Czech Republic. *Acta Horticulturae*, 2001. DOI: 10.17660/ActaHortic.2001.551.13.

CHANG, L., ZHANG, Z., YANG, H., LI, H., DAI, H. Detection of strawberry RNA and DNA viruses by RT-PCR using total nucleic acid as a template. *Journal of Phytopathology*. 2007, 155(7-8): 431-436. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2007.01254.x.

CHEN, J., ZHANG, H., FENG, M., ZUO, D., HU, Y., JIANG, T. Transcriptome analysis of woodland strawberry (*Fragaria vesca*) response to the infection by Strawberry vein banding virus (SVBV). *Virology Journal*. 2016, 13(1): 128. DOI: 10.1186/s12985-016-0584-5.

KLERKS, M.M., LINDNER, J.L., VAŠKOVA, D., ŠPAK, J., THOMPSON, J.R., JELKMANN, W., SCHOEN, C.D. Detection and tentative grouping of Strawberry crinkle virus isolates. *European Journal of Plant Pathology*. 2004, 110(1): 45-52.

KRCZAL, H. Strawberry crinkle virus. In: *European handbook of plant diseases* (Ed. by Smith, I.M.; Dunez, J.; Lelliott, R.A.; Phillips, D.H.; Archer, S.A. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK. 1988: 78-79.

MAAS, J.L. (ed.). *Compendium of strawberry diseases*. St. Paul, MN: APS press, 1998.

MAHMOUDPOUR, A. Infectivity of recombinant strawberry vein banding virus DNA. *Journal of General Virology*. 2003, 84(6): 1377-1381. DOI: 10.1099/vir.0.18994-0.

MARTIN, R.R., TZANETAKIS, I.E. High risk strawberry viruses by region in the United States and Canada: implications for certification, nurseries, and fruit production. *Plant Disease*. 2013, 97(10): 1358-1362. DOI: 10.1094/PDIS-09-12-0842-RE.

MARTIN, R.R., TZANETAKIS, I.E. Characterization and recent advances in detection of strawberry viruses. *Plant Disease*. 2006, 90(4): 384-396. DOI: 10.1094/PD-90-0384.

MUMFORD, R.A., SKELTON, A.L., BOONHAM, N., POSTHUMA, K.I., KIRBY, M.J., ADAMS, A.N. The improved detection of Strawberry crinkle virus using Real-Time RT-PCR (TaqMan®). In: X International Symposium on Small Fruit Virus Diseases. 2004, 656: 81-86. DOI: 10.17660/ActaHortic.2004.656.11

THEKKE-VEETIL, T., TZANETAKIS, I.E. First report of Strawberry polerovirus-1 in strawberry in the United States. *Plant Disease*. 2016, 100(4): 867-867. DOI: 10.1094/PDIS-09-15-1044-PDN

THOMPSON, J.R., JELKMANN, W. The detection and variation of Strawberry mottle virus. *Plant Disease*. 2003, 87(4): 385-390.

THOMPSON, J. R., LEONE, G., LINDNER, J. L., JELKMANN, W., SCHOEN, C. D. Characterization and complete nucleotide sequence of Strawberry mottle virus: a tentative member of a new family of bipartite plant picorna-like viruses. *Journal of General Virology*. (2002), 83(1): 229-239.

THOMPSON, J. R., WETZEL, S., KLERKS, M. M., VAŠKOVÁ, D., SCHOEN, C. D., ŠPAK, J., JELKMANN, W. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control. *Journal of Virological Methods*. 2003, 111(2): 85-93.

XIANG, Y., BERNARDY, M., BHAGWAT, B., WIERSMA, P.A., DEYOUNG, R., BOUTHILLIER, M. The complete genome sequence of a new polerovirus in strawberry plants from eastern Canada showing strawberry decline symptoms. *Archives of Virology*. 2015, 16(2): 553-556. DOI: 10.1007/s00705-014-2267-0.

ZHIHONG, Z., HONGYI, Y., HONGYAN, D., HE, L., MIN, X. Detection of Strawberry mottle virus and Strawberry mild yellow edge virus by Multiplex RT-PCR. *Acta Horticulturae Sinica*. 2006, 33(3): 507.

## 8. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Užitečný vzor číslo CZ 32 879: Sada pro detekci virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 v biologickém materiálu. Čmejla R., Valentová L. Zapsáno 21. 5. 2019.



Ústřední kontrolní  
a zkušební ústav zemědělský  
Držitel certifikátu ISO 9001

Hroznová 2  
656 06 Brno

www.ukzuz.cz  
ID DS: ugbaiq7

IČO: 00020338  
DIČ: CZ00020338

v y d á v á

## OSVĚDČENÍ

UKZUZ 205307/2020

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

Název metodiky: **Real-time PCR detekce virů Strawberry mild yellow edge virus (SMYEV), Strawberry crinkle virus (SCV), Strawberry vein banding virus (SVBV), Strawberry mottle virus (SMoV) a Strawberry poterovirus-1 (SPV-1) v biologickém materiálu**

Autor/autoři: **RNDr. Radek Čmejla, Ph.D.; Mgr. Lucie Valentová**

Název organizace/cí: **Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.**  
Místo vydání: **Holovousy**

Rok vydání: **2020**

Metodika byla vypracována v rámci výzkumného projektu MZe NAZV č. QK1920245 „Výzkum rozšíření biologických vlastností a škodlivosti virů identifikovaných v rostlinách jahodníku pomocí nejnovějších diagnostických metod (NGS, PCR) jako podklad pro přípravu legislativy“.

Využívá projekt „Pravidla pro odvětví zemědělství, lesnictví, rybolov“? **NE**

Brno 4. 11. 2020

Razítko odborného orgánu státní správy

Osvědčení ze dne 3. 11. 2020, pod čj.: UKZUZ 203911/2020 se **ruší**.

Jméno zástupce odborného útvaru státní správy:

Ing. Daniel Jurečka

Funkce zástupce odborného útvaru státní správy:

ředitel ústavu

.....  
Podpis zástupce odborného útvaru státní správy

Souhlas ředitelky Odboru vědy, výzkumu a vzdělávání MZe:

**Jan Radoš**

Digitální podpis: 05.11.2020 17:14

V ..... dne .....

.....  
Ing. Pavlína Adam, Ph.D.

Poznámky:

Poznámky:

**Real-time PCR detekce virů Strawberry mild yellow edge virus (SMYEV),  
Strawberry crinkle virus (SCV), Strawberry vein banding virus (SVBV),  
Strawberry mottle virus (SMoV) a Strawberry polerovirus-1 (SPV-1)  
v biologickém materiálu**

Autoři: Radek Čmejla, Lucie Valentová

Vydal: VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.

Grafická úprava a sazba: Jan Slezák - OUTSOURCING

Tisk: Reprint s.r.o.

**ISBN 978-80-87030-75-2**



