

# Real-time PCR detekce virů Rubus yellow net virus (RYNV), raspberry rubodvirus 1 (RaRV1) a raspberry enamovirus 1 (RaEV1) v rostlinném materiálu



**Lucie Valentová  
Martina Rejlová  
Radek Čmejlá**

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

**Real-time PCR detekce virů  
Rubus yellow net virus (RYNV),  
raspberry rubodvirus 1 (RaRV1)  
a raspberry enamovirus 1 (RaEV1)  
v rostlinném materiálu**

Lucie Valentová, Martina Rejlová, Radek Čmejla



**CERTIFIKOVANÁ METODIKA**

**2024**

**Autorský kolektiv:**

Mgr. Lucie Valentová, Ph.D., Ing. Martina Rejlová, RNDr. Radek Čmejla, Ph.D.

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.,  
Holovousy 129, 508 01 Hořice

**Kontakt na vedoucího autorského kolektivu:**

[valentova@vsuo.cz](mailto:valentova@vsuo.cz)

**Autoři fotografií a obrázkových schémat:**

kolektiv autorů

**Odborný oponent:**

RNDr. Markéta Bohunická, Ph.D., Univerzita Hradec Králové

**Oponent ze státní správy:**

RNDr. Kateřina Tománková, Ph.D., Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

**Název:**

**Real-time PCR detekce virů Rubus yellow net virus (RYNV), raspberry rubodvirus 1 (RaRV1) a raspberry enamovirus 1 (RaEV1) v rostlinném materiálu**

**Dedikace:**

Metodika je výstupem řešení projektu „Zdravé ovoce v měnících se klimatických podmínkách: vývoj nových biotechnologických postupů diagnostiky virů, studium vektorů, ozdravování a bezpečného uchovávání jahodníku a maliníku“ (TO01000295) financovaného částkou 1 477 000 Euro z fondů EHP a Technologické Agentury České republiky v rámci programu KAPPA.

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

1. vydání, 2024

ISBN 978-80-87030-98-1 (online; pdf)



<https://doi.org/10.60615/yxyh-r586>

# OBSAH

1	Úvod	4
2	Cíl metodiky	5
3	Vlastní popis metodiky	6
3.1	Úvod	6
3.2	Použité laboratorní metody a postupy	8
3.2.1	Pre-analytická fáze	9
3.2.1.1	Odběr vzorků, přeprava vzorků	9
3.2.1.2	Příjem vzorků do laboratoře	9
3.2.2	Analytická fáze	10
3.2.2.1	Izolace RNA	10
3.2.2.2	Příprava cDNA	11
3.2.2.3	Dvoukroková RT-qPCR detekce	13
3.2.2.4	Jednokroková RT-qPCR detekce	18
3.2.3	Post-analytická fáze	20
3.2.3.1	Vyhodnocování výsledků	20
3.2.3.2	Akceptace a interpretace výsledků	23
3.3	Validace metody	23
3.3.1	Stanovení specificity	24
3.3.2	Stanovení analytické senzitivity	26
3.3.3	Stanovení opakovatelnosti	27
3.3.4	Stanovení reprodukovatelnosti	28
3.4	Porovnání PCR reagensů	29
3.4.1	Detekce RYNV a příslušné IPC	30
3.4.2	Detekce RaEV1, RaRV1 a příslušné IPC	31
3.4.3	Shrnutí	34
4	Srovnání novosti postupů	34
5	Popis uplatnění certifikované metodiky	36
6	Ekonomické aspekty	37
7	Seznam použité související literatury	39
8	Seznam publikací, které předcházely metodice	40
9	Osvědčení o uznání metodiky	41

# 1 ÚVOD

Ostružiník maliník (*Rubus idaeus* L.) z čeledi růžovité (Rosaceae), spíše známý pouze pod označením maliník, nebo lidově „maliny“, je vytrvalá rostlina, která vyhání až 2 m vysoké prutovité výhony. Přestože se maliníky v profesionálním ovocnářství pěstují jen okrajově, došlo v posledních letech k výraznému nárůstu v produkci jejich školkařských výpěstků. To dokládají údaje v Situační a výhledové zprávě za rok 2023: v roce 2020 byla produkce sazenic maliníku 261 tisíc sazenic, v roce 2021 byla 446 tisíc a v roce 2022 stoupla na 693 tisíc. S tímto nárůstem souvisí i zvýšená kontrola a testování rozmnožovacího materiálu na přítomnost nežádoucích patogenů. Povinnost kontroly a testování rozmnožovacího materiálu vychází z Vyhlášky č. 96/2018 Sb. Vyhláška o množitelských porostech a rozmnožovacím materiálu ovocných rodů a druhů a jeho uvádění do oběhu. Kontrola a testování v rámci produkce rozmnožovacího materiálu jsou opodstatněné, neboť viry přežívají v rostlině v různé míře po celou dobu jejího života. Včasná a spolehlivá detekce patogenů v rozmnožovacím materiálu tak může zabránit významným hospodářským škodám v porostech maliníku, jehož životnost je okolo 10 let.

Dle této legislativy je povinná kontrola množitelského materiálu maliníku na přítomnost virů apple mosaic virus (ApMV), Arabis mosaic virus (ArMV), black raspberry necrosis virus (BRNV), cucumber mosaic virus (CMV), raspberry bushy dwarf virus (RBDV), raspberry leaf mottle virus (RLMV), raspberry ringspot virus (RpRSV), raspberry vein chlorosis virus (RVCV), raspberry yellow spot (RYS), Rubus yellow net virus (RYNV), strawberry latent ringspot virus (SLRSV) a tomato black ring virus (TBRV). Všechny zmíněné viry jsou součástí certifikačního schématu pro rod *Rubus* PM 4/10 (2) Schemes for the production of healthy plants for planting, Certification scheme for *Rubus* dle European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). Předchozí certifikovaná metodika (Valentová *et al.* 2022) řešila real-time PCR detekci čtyř z výše uvedených virů: virus černé nekrózy maliníku (BRNV), virus kroužkovitosti maliníku (RpRSV), virus keříčkové zakrslosti maliníku (RBDV) a virus latentní kroužkovitosti jahodníku (SLRSV). Předkládaná metodika na ni navazuje a doplňuje ji o real-time PCR metodiku detekce RYNV a nově identifikovaných virů raspberry rubodvirus 1 (RaRV1) a raspberry enamovirus 1 (RaEV1).

Virus žluté síťovitosti maliníku (Rubus yellow net virus – RYNV) je zástupcem rodu *Badnavirus*, čeleď *Caulimoviridae* (Jones *et al.* 2002). Mezi nejčastější příznaky patří síťovitá chloróza pletiv podél listových žilek, dalším příznakem mohou být mírně pokroucené listy směrem dolů. U některých rostlin může docházet k deformaci nebo zakrnutí, avšak většina genotypů zůstává bez příznaků, virus tak vyvolává latentní infekci (Vakić *et al.* 2022). V porostech maliníku je virus přenášen semiperzistentním způsobem pomocí vektorů a roubováním (Martin *et al.* 2013). Jak uvádí Kalischuk *et al.* (2008), přítomnost RYNV byla potvrzena v několika evropských zemích a v Severní Americe. V maliníkových porostech ho v Evropě přenáší kyjatka maliníková (*Amphorophora idaei* Börner) a v Severní Americe *Amphorophora agathonica* Hottes (Jones *et al.* 2002).

Oba tyto vektory mohou přenášet i další viry maliníku (BRNV a RLMV), které společně s RYNV způsobují mozaikovou chorobu maliníku (RMD, Raspberry Mosaic Disease), která je pravděpodobně nejničivějším virovým onemocněním, jež se vyskytuje na malinících (McGavin & MacFarlane 2010; Vakić *et al.* 2022). Dopad na výnos je při samotné infekci RYNV minimální, větší ztráty mohou být při výskytu viru v komplexu s BRNV. V prvním roce sklizně mohou ztráty na výnosu dosahovat 30–75 % a v následujících letech jsou mírnější, až 15% (Diaz-Lara 2015). RYNV jakožto zástupce rodu *Badnavirus* má schopnost se v hostitelské rostlině vyskytovat ve dvou formách, a to jako episomální – tvoří viriony, a/nebo endogenní, kdy je virus integrovaný v genomu hostitele. Předpokládá se, že endogenní forma viru je neaktivní a nevyvolává symptomy typické pro virovou infekci. Na druhou stranu, integrované formy viru jsou schopny reaktivace a tvorby virionů, které se mohou začít replikovat a vyvolat onemocnění maliníku (Ndowora *et al.* 1999, Ho *et al.* 2024). Případné pozitivní nálezy je tak nutné interpretovat s přihlédnutím k těmto znalostem (Vakić *et al.* 2022).

Virus RaEV1 byl popsán teprve nedávno jako nový druh rodu *Enamovirus* (Koloniuk *et al.* 2023) z čeledi *Solemoviridae*. Tyto viry mají nesegmentovaný genom cca 5,8 kbp dlouhý, který je tvořen (+)ssRNA. Jeho výskyt byl potvrzen v cca 10 % vzorků maliníku pocházejících jak z komerčních ploch, tak v divokých rostlinách. Virus byl detekován ve všech testovaných částech rostlin – kořenech, stoncích, listech, pupenech, květech, nezralých i zralých plodech, a bez problémů v rostlině přezimuje. RaEV1 byl nalezen také v hmyzích zástupcích *Amphorophora rubi idaei*, *Aphis idaei*, *Psallus wagneri*, *Macropsis fuscula* a *Myzus persicae*, ale přenos viru na další rostlinu těmito potenciálními vektory nebyl zatím potvrzen. Hospodářská škodlivost RaEV1 nebyla zatím studována, ale lze předpokládat, že se minimálně ve směsné infekci bude spolupodílet na závažnosti symptomů.

Dalším nově objeveným virem maliníku je virus RaRV1, který patří do rodu *Rubodvirus* z čeledi *Phenuiviridae*, a jeho genom je tvořen segmentovanou (-)ssRNA. Byl identifikován u 2,1 % vzorků maliníku různého původu a také u potenciálního vektoru *Aphis idaei*, přenos však nebyl prokázán. Virus bude podrobně charakterizován v chystané publikaci (Lenz *et al.*).

## 2 CÍL METODIKY

Certifikovaná metodika si dává za cíl zavést nové detekční systémy založené na real-time PCR pro rutinní diagnostiku Rubus yellow net virus (RYNV), raspberry rubodvirus 1 (RaRV1) a raspberry enamovirus 1 (RaEV1). RYNV je detekován v duplexním uspořádání spolu s interní pozitivní kontrolou (IPC) a RaRV1 a RaEV1 v triplexu spolu s IPC. Toto upořádání umožňuje uživateli vybrat si cílovou skupinu virů s ohledem na zamýšlený účel. Oba systémy jsou součástí diagnostické soupravy „RubusVir II qPCR-RG detekční kit – souprava pro real-time PCR detekci virů RaEV1, RaRV1 a RYNV v rostlinném materiálu“ a doplňují již publikovanou metodiku detekce virů BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV metodou real-time PCR (Valentová *et al.* 2022).

Navržené detekční systémy byly příkladně validovány pro použití s cyklem Rotor-Gene Q (Qiagen) dle validačního schématu obsaženého v EPP0 PM 7/98 (5) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity a po verifikaci je bude možné použít i na pracovištích, které disponují jiným vybavením. Součástí metodiky je i porovnání různých postupů pro přípravu cDNA (různé reverzní transkriptázy), různých PCR reagensů a jednokrokové a dvoukrokové analýzy, aby se uživatel seznámil s výhodami a nevýhodami jednotlivých postupů. Předkládaná metodika tedy rozšiřuje spektrum virů, které je u maliníku možné detekovat metodou real-time PCR a nalezne uplatnění nejen při certifikaci rozmnožovacího materiálu, ale i v základním virologickém výzkumu.

### 3 VLASTNÍ POPIS METODIKY

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

#### 3.1 Úvod

Metodika real-time PCR detekce virů RYNV, RaRV1 a RaEV1 v biologickém materiálu byla validována pro přístroj Rotor-Gene Q (Qiagen) s využitím následujícího materiálu a reagensů:

- ▶ Pro duplexní detekci RYNV se používají následující primery a sondy:

**RYNV:** Forward primer 1: GYTGGTTGGGAGTYCTSAACTA  
Forward primer 2: GTTGGCTTGGAGTTCTCAACTA  
Reverse primer 1: AGGYCTGGGAGRTTYTGGAC  
Reverse primer 2: AGGTCTGGGAGATCCTGGAC  
Sonda 1: HEX-TCTTGCTGTATAGYGGGCC-BHQ1  
Sonda 2: HEX-TCTTGCTGTAKAGTGGRCC-BHQ1

- ▶ Pro multiplexní detekci virů RaRV1 a RaEV1 se používají následující primery a sondy:

**RaRV1:** Forward primer: AATTCAATGTTGAATTGTTTCCAAAAG  
Reverse primer: CTTACCCTAAAATCAACCACATAAAT  
Sonda 1: 6-FAM-CCCTCAAGCCATTATGCTGATC-BHQ1  
Sonda 2: 6-FAM-CCCTCAAACCGTTGTGTTGATC-BHQ1

**RaEV1:** Forward primer: CTGGCGTACAGAAATCGGG  
Reverse primer: AGCACCAGCATATTGGGAC  
Sonda: HEX-AATTCGAGGATGCGGGTTATGTTG-BHQ1

- ▶ Jako marker pro kontrolu kvality izolace RNA a přípravy cDNA se používá test na přítomnost transkriptu pro mitochondriální gen *Nad5* (interní pozitivní kontrola; IPC). Pro jeho detekci se používají následující primery a sonda:

Forward primer: GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGTT

Reverse primer: ACATAAATCGAGGGCTATGCGG

Sonda: IRDye700 [příp. 6-FAM]-

-CCACAATTAACATCACTACGGTCGGGCTA-BHQ3 [příp. BHQ1]

- ▶ IPC je detekována současně s RYNV ve stejné reakci, přičemž sonda může být značena 6-FAM--BHQ1 (ověřeno) nebo IRDye700--BHQ3 (netestováno).
- ▶ IPC je detekována současně s RaRV1 a RaEV1 ve stejné reakci, přičemž sonda je značena IRDye700--BHQ3.
- ▶ RNA byla izolována pomocí Ribospin™ Plant (GeneAll Biotechnology, k.č. 307-150; dodává Bohemia Genetics s.r.o.).
- ▶ Pro dvoukrokovou RT-qPCR analýzu byly testovány následující reverzní transkriptázy:
  - M-MLV Reverse Transcriptase, 200 U/μl (Invitrogen, k.č. 28025-013; dodává Life Technologies Czech Republic s.r.o.)
  - M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, k.č. M107; dodává East Port Praha, s.r.o.)
- ▶ Testované PCR reagenty:
  - qPCR 2x Blue Master Mix (výrobce a dodavatel: Top-Bio, k.č. P523)
  - Luna Universal Probe qPCR Master Mix (výrobce: New England Biolabs, k.č. M3004S; dodává BioTech a.s.)
- ▶ Pro jednokrokovou RT-qPCR analýzu byl použit Luna Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit (New England Biolabs, k.č. E3006L; dodává BioTech a.s.).



- ▶ Pro rutinní diagnostiku lze použít jednotlivé PCR komponenty nebo diagnostickou soupravu **RubusVir II qPCR-RG** (výrobce a dodavatel: VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.), která obsahuje připravené PCR premixy a systém kontrol pro snadné a rychlé sestavení PCR reakce. Souprava obsahuje:
  - UniPmxI<sup>1</sup>: premix obsahující všechny nezbytné komponenty pro PCR amplifikaci
  - RYNV PmxII: premix obsahující všechny nezbytné komponenty pro specifickou detekci RYNV a pro detekci interní pozitivní kontroly (IPC), která slouží jako kontrola kvality izolované RNA a připravené cDNA
  - RubusVir II PmxII: premix obsahující všechny nezbytné komponenty pro specifickou detekci virů RaRV1, RaEV1 a pro detekci interní pozitivní kontroly (IPC), která slouží jako kontrola kvality izolované RNA a připravené cDNA
  - RYNV Ctrl [500 000 kopií/μl]: pozitivní kontrola pro ověření správnosti PCR pro detekci viru RYNV
  - RaRV1 Ctrl [500 000 kopií/μl]: pozitivní kontrola pro ověření správnosti PCR pro detekci viru RaRV1
  - RaEV1 Ctrl [500 000 kopií/μl]: pozitivní kontrola pro ověření správnosti PCR pro detekci viru RaEV1
  - 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.
- ▶ Real-time PCR cykler Rotor-Gene Q (Qiagen) nebo obdobný, který je schopen detekovat použité fluorofory u sond.
- ▶ Použité vybavení, reagentie a značení sond je pouze ilustrativní; uživatelé se mohou rozhodnout i pro jiné značení sond a jiné reagentie, které více vyhovují jejich vybavení a zkušenostem.

### 3.2 Použité laboratorní metody a postupy

Vlastní postup lze rozdělit do třech fází:

- ▶ Pre-analytická (odběry vzorků a jejich příjem do laboratoře, uchování do doby analýzy)

---

<sup>1</sup> UniPmxI je obsažen v kompletní verzi detekční soupravy. Standardní verze UniPmxI neobsahuje, takže uživatelé mohou použít své vlastní ověřené PCR reagentie.

- ▶ Analytická fáze (zpracování vzorků v laboratoři, homogenizace, izolace RNA, příprava cDNA, sestavení PCR reakce)
- ▶ Post-analytická fáze (vyhodnocení a interpretace nálezů, uvádění výsledků)

### 3.2.1 Pre-analytická fáze

#### 3.2.1.1 Odběr vzorků, přeprava vzorků

Vzhledem k tomu, že pro rutinní testování jsou doporučeným materiálem listy, vzorky lze odebírat po celou dobu jejich přítomnosti na rostlině, nejdéle však do konce září, neboť v dalším období listy stárnou a nejsou vhodné pro detekci virů. Dalším materiálem pro testování mohou být i výhony, které se odebírají v době nepřítomnosti listů. Pro účely diagnostiky virů se pak odebrané výhony nechají narašit v laboratorních podmínkách. Pro izolaci RNA se pak odebírá rostlinný materiál ve fenologické fázi BBCH54, který odpovídá stavu rostliny, kdy zelené špičky listu vyčnívají nad šupiny pupenů. Protože se viry RYNV, RaRV1 a RaEV1 mohou vyskytovat v rostlinách nerovnoměrně, je vhodné pro získání reprezentativního vzorku odebírat 3–4 listy z různých částí rostliny. Odebrané části rostlin se vloží do plastového sáčku a vzorek se v co nejkratším čase dopraví do laboratoře. Po celou dobu převozu se vzorek ideálně uchovává v chladu, v období teplejších dní lze pro převoz vzorků použít chladič box.



#### 3.2.1.2 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  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Při této teplotě je možné vzorky skladovat bez ztráty kvality nejméně 1 rok.

Ke zpracování se přijímají pouze vzorky, které:

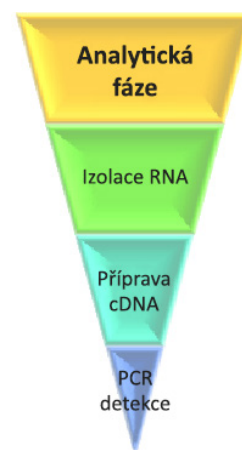
- ▶ nejsou starší než 4 kalendářní dny
- ▶ nejsou znehodnoceny plísní
- ▶ nejsou znehodnoceny hnilobným procesem
- ▶ nevykazují pokročilou nekrózu pletiv
- ▶ neobsahují savý ani jiný hmyz
- ▶ nejsou ovlivněny dalšími faktory, které by mohly ovlivnit výsledek zkoušky (např. aplikace postřiků)
- ▶ jsou jednoznačně identifikovatelné, aby nedošlo k jejich záměně

### 3.2.2 Analytická fáze

Vlastní analytická fáze se provádí ve třech krocích:

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

Pokud se provádí jednokroková analýza, probíhá syntéza cDNA a real-time PCR detekce v jednom kroku.



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

- ▶ Dodržování zásad dekontaminace a hygieny doporučených pro laboratoře molekulární biologie pro vyloučení možných kontaminací
- ▶ Dodržování všech zásad správné laboratorní praxe v laboratoři molekulární biologie
- ▶ Zařazování extrakčních kontrol (kontrola čistoty používaných reagensů při izolaci RNA)
- ▶ Dodržování standardní navážky vstupního materiálu
- ▶ Kvalita izolované RNA a připravené cDNA

#### 3.2.2.1 Izolace RNA

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

- ▶ Homogenizace vzorku se provádí v tekutém dusíku. Pro izolaci RNA se standardně používá 50 mg homogenizovaného materiálu.
- ▶ 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 (Tabulka 1). Postupuje se podle návodu výrobce, který je dostupný na jeho [webových stránkách](#).

**Tabulka 1.** Specifikace kitu dle výrobce

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

- ▶ Průměrný výtěžek RNA z 50 mg listů *Rubus subgen. Idaeobatus* a *subgen. Rubus* je 13,8 µg, hodnoty výtěžnosti se pohybují v rozmezí 4,2 µg – 23,4 µg; (interval spolehlivosti 95 % pro n=339, vlastní laboratorní výsledky).
- ▶ Izolovaná RNA by měla mít čistotu (hodnota poměru absorbancí A260/A280) alespoň 1,8. Pokud je čistota nižší, nelze vyloučit negativní dopad na citlivost analýz.
- ▶ Purifikovanou RNA je možné pro další analýzy (např. okamžitá 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 mikrozkumavky 2 ml při pokojové teplotě při relativní centrifugační síle (RCF) minimálně 10 000 g (u běžných centrifug zpravidla >13 000 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.
- ▶ Primární biologický materiál byl homogenizován v tekutém dusíku. Standardně se pro izolaci použilo 50 mg homogenizovaného vzorku.

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

### 3.2.2.2 Příprava cDNA

Krok samostatné přípravy cDNA se provádí při dvoukrokové RT-qPCR detekci; při jednokrokové detekci je syntéza cDNA prováděna ve stejné zkumavce jako vlastní PCR (viz kapitola 3.2.2.4).

Metodika je validována s využitím následujících postupů, reagensů a podmínek pro přípravu cDNA:

- ▶ Vstupní materiál byla RNA izolovaná pomocí kitu Ribospin™ Plant, (GeneAll Biotechnology, Co., Ltd.; k. č. 307-150; dodává Bohemia Genetics s.r.o.).
- ▶ Použit byl maximálně 1 µg izolované RNA pro syntézu cDNA.
- ▶ Pro porovnání přípravy cDNA byly testovány dvě reverzní transkriptázy podle návodu výrobce:
  - M-MLV Reverse Transcriptase, 200 U/µl (Invitrogen, k. č. 28025-013; dodává Life Technologies Czech Republic s.r.o.)
  - M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, k. č. M107; dodává East Port Praha, s.r.o.)

- ▶ Pro iniciaci reverzní transkripce byla použita směs náhodných primerů-hexamerů: Primer Random p(dN)<sub>6</sub> (Roche, k.č. 11034731001; dodává Roche s.r.o.).
- ▶ V reakci byla použita směs nukleotidů: dNTP mix, 10 mM každý (Genaxxon, k. č. M3016.1010; dodává Bohemia Genetics s.r.o.).
- ▶ Připravenou cDNA je možné pro další analýzy (např. PCR) krátkodobě uchovat při 4 °C nebo dlouhodobě skladovat při -20 °C. Pro validní analýzy se však doporučuje pracovat vždy s čerstvě připravenou cDNA (vlastní laboratorní zkušenost), případně si ověřit vliv dlouhodobějšího skladování na stabilitu cDNA z listů maliníku.
- ▶ 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 pro přípravu cDNAs použitím reverzní transkriptázy výrobce Invitrogen***

Použita M-MLV Reverse Transcriptase, 200 U/μl (Invitrogen, k. č. 28025-013; dodává Life Technologies Czech Republic s.r.o.). Postup vychází z návodu výrobce.

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 pipetuje:
  - a. 4 μl náhodných primerů (hexamery) o koncentraci 50 ng/μl
  - b. 1 μl 10 mM 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 PCR cykleru na 65 °C 5 minut. Po uplynutí inkubační doby se zkumavky prudce zchladí ve vymražené kovové destičce. Poté se krátce centrifugují.
4. Do jednotlivých zkumavek se napipetuje:
  - a. 4 μl 5x First-Strand Buffer
  - b. 2 μl 0,1 M DTT
5. Ke každé zkumavce se vzorkem kromě RT- kontroly se přidá 1 μl (200 U) M-MLV reverzní transkriptázy, dobře se promíchá.
6. Vzorky se vloží do PCR 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 lze uchovávat v mrazničce při -20 °C.

### ***Pracovní postup pro přípravu cDNA s použitím reverzní transkriptázy výrobce Promega***

Použita M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, k.č. M107; dodává East Port Praha, s.r.o.). Postup vychází z návodu výrobce.

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 pipetuje:
  - a. 4 µl náhodných primerů (hexamery) o koncentraci 50 ng/µl
  - b. 1 - 5 µl celkové RNA (Celkové množství RNA v reakci by nemělo překročit 1 µg)
 Směs se promíchá.
3. Směs se zahřeje v cykleru na 70 °C 5 minut. Po uplynutí inkubační doby se zkumavky prudce zchladí ve vymražené kovové destičce. Poté se krátce centrifugují.
4. Do jednotlivých zkumavek se napipetuje:
  - a. 4 µl M-MLV 5x Reaction Buffer
  - b. 1 µl 10mM dNTPs
  - c. RNase free voda do celkového objemu 19 µl
5. Ke každé zkumavce se vzorkem kromě RT- kontroly se přidá 1 µl (200 U) M-MLV reverzní transkriptázy, dobře se promíchá.
6. Vzorky se vloží do cykleru.
7. Vzorky projdou následujícími teplotními fázemi:
  - a. Inkubace při 37 °C po dobu 60 minut
  - b. Finální zchlazení na 4 °C
8. Takto připravenou cDNA lze přímo použít jako templát (zpravidla 2 µl) pro další PCR analýzy. cDNA lze uchovat v mrazničce při -20 °C.

### **3.2.2.3 Dvoukroková RT-qPCR detekce**

#### **Úvod**

Postup je validován pro detekci RYNV v duplexu s IPC a detekci virů RaRV1 a RaEV1 v triplexu s IPC. Metodiku lze použít jak pro kvalitativní, tak kvantitativní detekci přítomnosti jednotlivých virů. Jako indikátor kontroly 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), která je detekována ve stejné reakci.

Vlastní detekce je založena na použití specifických primerů a sond, které je možné zakoupit zvlášť (kapitola 3.1) nebo použít RubusVir II qPCR-RG detekční kit, který obsahuje všechny reagenty pro real-time PCR detekci pro cykly Rotor-Gene Q [Qiagen] (k.č. RubusVir II qPCR-RG; výrobce a dodavatel: VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.). Sonden 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.

### **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.
- ▶ Vzorok se doporučuje analyzovat v technických 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 RYNV, RaRV1 a RaEV1. 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 RYNV, RaRV1, RaEV1 a IPC.

V rámci testování metodiky detekce byly použity **PCR reagensie od dvou dodavatelů:**

- qPCR 2x Blue Master Mix (výrobce a dodavatel: Top-Bio, k.č. P523)
- Luna Universal Probe qPCR Master Mix (výrobce: New England Biolabs, k.č. M3004S; dodává BioTech a.s.)

**Pokud není uvedeno jinak, je níže popsáný postup společný pro oba typy PCR reagensií.**

1. V PCR boxu se do kovového stojánku připraví potřebný počet 0,1ml stripů včetně mikrozkušavek pro NTC (kontrola bez přidané cDNA) a syntetickou pozitivní kontrolu, případně další různě ředěné standardy pro tvorbu kalibrační křivky pro kvantitativní stanovení.
2. Podle počtu současně míchaných PCR mastermixů se do stojánku připraví 1,5ml mikrozkušavky, do kterých se připraví adekvátní množství PCR mastermixu dle typu reakce a rozpisu (Tabulka 2):

**Tabulka 2a.** Rozpis pro detekci RYNV a IPC s využitím základních PCR komponent

<b>RYNV + IPC</b>	<b>Na 1 vzorek</b>	<b>Finální koncentrace</b>
PCR voda	6,88 µl	
RYNV forward primer 1 (50 µM)	0,2 µl	0,5 µM
RYNV forward primer 2 (50 µM)	0,1 µl	0,25 µM
RYNV reverse primer 1 (50 µM)	0,2 µl	0,5 µM
RYNV reverse primer 2 (50 µM)	0,1 µl	0,25 µM
RYNV sonda 1 (50 µM)	0,1 µl	0,25 µM
RYNV sonda 2 (50 µM)	0,14 µl	0,35 µM
IPC forward primer (50 µM)	0,1 µl	0,25 µM
IPC reverse primer (50 µM)	0,1 µl	0,25 µM
IPC sonda (50 µM)	0,08 µl	0,2 µM
qPCR 2x Blue Master Mix <b>nebo</b> Luna Universal Probe qPCR Master Mix	10 µl	1x
<b>Celkem</b>	<b>18 µl</b>	



**Tabulka 2b.** Rozpis pro současnou detekci virů RaRV1, RaEV1 a IPC s využitím základních PCR komponent

<b>RaRV1 + RaEV1 + IPC</b>	<b>Na 1 vzorek</b>	<b>Finální koncentrace</b>
PCR voda	6,72 µl	
RaRV1 forward primer (50 µM)	0,2 µl	0,5 µM
RaRV1 reverse primer (50 µM)	0,2 µl	0,5 µM
RaRV1 sonda 1 (50 µM)	0,06 µl	0,15 µM
RaRV1 sonda 2 (50 µM)	0,06 µl	0,15 µM
RaEV1 forward primer (50 µM)	0,2 µl	0,5 µM
RaEV1 reverse primer (50 µM)	0,2 µl	0,5 µM
RaEV1 sonda (50 µM)	0,08 µl	0,2 µM
IPC forward primer (50 µM)	0,1 µl	0,25 µM
IPC reverse primer (50 µM)	0,1 µl	0,25 µM
IPC sonda (50 µM)	0,08 µl	0,2 µM
qPCR 2x Blue Master Mix <b>nebo</b> Luna Universal Probe qPCR Master Mix	10 µl	1x
<b>Celkem</b>	<b>18 µl</b>	

**Tabulka 2c.** Rozpis pro současnou detekci RYNV včetně IPC a/nebo RaRV1, RaEV1 a IPC s využitím RubusVir II qPCR-RG detekčního kitu

<b>RYNV + IPC</b>	<b>Na 1 vzorek</b>
PCR voda	7 µl
RYNV PmxII	1 µl
UniPmxI <b>nebo</b> qPCR 2x Blue Master Mix <b>nebo</b> Luna Universal Probe qPCR Master Mix	10 µl
<b>Celkem</b>	<b>18 µl</b>

<b>RaRV1 + RaEV1 + IPC</b>	<b>Na 1 vzorek</b>
PCR voda	7 µl
RubusVir II PmxII	1 µl
UniPmxI <b>nebo</b> qPCR 2x Blue Master Mix <b>nebo</b> Luna Universal Probe qPCR Master Mix	10 µl
<b>Celkem</b>	<b>18 µl</b>

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 RYNV, RaRV1, RaEV1 a IPC.
7. Po zapnutí Rotor-Gene Q se připraví teplotní profil s následujícími parametry:

### ***Pro qPCR 2x Blue Master Mix***

Teplotní podmínky PCR: 1 cyklus: 94 °C 5 min  
50 cyklů: 94 °C 20 s  
58 °C 20 s  
72 °C 20 s

- čtení v **zeleném kanálu** pro RaRV1
- čtení v **zeleném kanálu** pro IPC v duplexu s RYNV
- čtení ve **žlutém kanálu** pro RaEV1 a RYNV
- čtení v **karmínovém kanálu** pro IPC v multiplexu s RaRV1 a RaEV1 (příp. s RYNV)

### ***Pro Luna Universal Probe qPCR Master Mix***

Teplotní podmínky PCR: 1 cyklus: 95 °C 60 s  
50 cyklů: 95 °C 15 s  
58 °C 20 s  
60 °C 30 s

- čtení v **zeleném kanálu** pro RaRV1
- čtení v **zeleném kanálu** pro IPC v duplexu s RYNV
- čtení ve **žlutém kanálu** pro RaEV1 a RYNV
- čtení v **karmínovém kanálu** pro IPC v multiplexu s RaRV1 a RaEV1 (příp. s RYNV)

- ▶ Pro použité fluorofory se doporučuje nastavit „Gains“ na následující hodnoty.
  - Green: 5,67; Yellow: 6,67; 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.
- ▶ Celý proces amplifikace trvá cca 2 hodiny.
- ▶ PCR produkty je možné uchovávat při teplotě  $\leq -18$  °C po dobu minimálně jednoho roku.

### **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.

### 3.2.2.4 Jednokroková RT-qPCR detekce

#### Úvod

Při jednokrokové RT-qPCR detekci se využívá skutečnost, že není nutné připravit cDNA v samostatném kroku, neboť ta se syntetizuje ve stejné zkumavce, ve které následně probíhá vlastní qPCR. Odpadá tak příprava cDNA a její pipetování do zkumavek, ve kterých se qPCR provádí při dvoukrokovém uspořádání. Nevýhodou může být, že při jednokrokové detekci lze provádět detekci pouze konkrétních cílů, v tomto případě RYNV + IPC nebo RaRV1 + RaEV1 + IPC. Pro zjednodušení byla jednokroková RT-qPCR detekce testována pouze s premixy z RubusVir II qPCR-RG detekční kitu, který obsahuje všechny reagenty pro real-time PCR detekci pro cykler Rotor-Gene Q (detaily viz výše).

#### Sestavení vlastní real-time PCR reakce

Základní předpoklady pro sestavení PCR reakce jsou stejné jako pro dvoukrokovou detekci, viz výše.

*Použité reagenty a podmínky:*

- ▶ Luna Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit (New England Biolabs, k.č. E3006L; dodává BioTech a. s.).
- ▶ Jako vstupní materiál pro RT-qPCR byla použita RNA izolovaná pomocí kitu Ribospin™ Plant (GeneAll Biotechnology, Co., Ltd.; k.č. 307-150; dodává Bohemia Genetics s. r. o.).
- ▶ Pro analýzu se používá maximálně 100 ng izolované RNA v reakci.
- ▶ Použita diagnostická souprava RubusVir II qPCR-RG, která obsahuje připravené RYNV PmxII pro detekci RYNV (žlutý kanál) a RubusVir II PmxII pro současnou detekci RaRV1 (zelený kanál) a RaEV1 (žlutý kanál).
  - Jako marker pro kontrolu kvality izolace RNA se používá test na přítomnost transkriptu pro mitochondriální gen *Nad5* (interní pozitivní kontrola; IPC).
  - IPC je detekována současně s RYNV ve stejné reakci (zelený kanál).
  - IPC je detekována současně s RaRV1 a RaEV1 ve stejné reakci (karmínový kanál).

- 
1. V PCR boxu se do kovového stojánku připraví potřebný počet 0,1ml stripů včetně mikrozkušavek pro NTC (kontrola bez přidané cDNA) a syntetickou pozitivní kontrolu, případně další různě řaděné standardy pro tvorbu kalibrační křivky pro kvantitativní stanovení.
  2. Podle počtu současně míchaných PCR mastermixů se do stojánku připraví 1,5ml mikrozkušavky, do kterých se připraví adekvátní množství PCR mastermixu dle typu reakce a rozpisu (Tabulka 3):

**Tabulka 3.** Rozpis pro současnou detekci RYNV včetně IPC a/nebo RaRV1, RaEV1 a IPC s využitím RubusVir II qPCR-RG detekčního kitu

<b>RYNV + IPC</b>	<b>Na 1 vzorek</b>
PCR voda	6 µl
RYNV PmxII	1 µl
Luna Universal Probe One-Step Reaction Mix (2X)	10 µl
Luna WarmStart RT Enzyme Mix (20X)	1 µl
<b>Celkem</b>	<b>18 µl</b>

<b>RaRV1 + RaEV1 + IPC</b>	<b>Na 1 vzorek</b>
PCR voda	6 µl
RubusVir II PmxII	1 µl
Luna Universal Probe One-Step Reaction Mix (2X)	10 µl
Luna WarmStart RT Enzyme Mix (20X)	1 µl
<b>Celkem</b>	<b>18 µl</b>

8. Připravený mastermix se krátce vortexuje a krátce se centrifuguje.
9. Mastermix se rozpipetuje do PCR stripů po 18 µl.
10. K mastermixu se postupně pipetují 2 µl naředěné RNA testovaného vzorku o koncentraci 50 ng/µl.
11. Po uzavření všech zkumavek se v post-PCR místnosti přidají 2 µl syntetické pozitivní kontroly (tedy 1 milion kopií/reakci) pro detekci RYNV, RaRV1, RaEV1 a IPC.
12. Po zapnutí Rotor-Gene Q se připraví teplotní profil s následujícími parametry:

Teplotní podmínky PCR: 1 cyklus: 55 °C 10 min  
 1 cyklus: 95 °C 1 min  
 45 cyklů: 95 °C 10 s  
 58 °C 20 s  
 60 °C 30 s

- čtení v zeleném kanálu pro RaRV1
- čtení v zeleném kanálu pro IPC v duplexu s RYNV
- čtení ve žlutém kanálu pro RaEV1 a RYNV
- čtení v karmínovém kanálu pro IPC v multiplexu s RaRV1 a RaEV1 (příp. s RYNV)

- ▶ Pro použité fluorofory se doporučuje nastavit „Gains“ na následující hodnoty.
  - Green: 5,67; Yellow: 6,67; 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.
- ▶ Celý proces amplifikace trvá necelé 2 hodiny.
- ▶ PCR produkty je možné uchovávat při teplotě  $\leq -18$  °C po dobu minimálně jednoho roku.

### 3.2.3 Post-analytická fáze

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

#### 3.2.3.1 Vyhodnocování výsledků

##### 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.

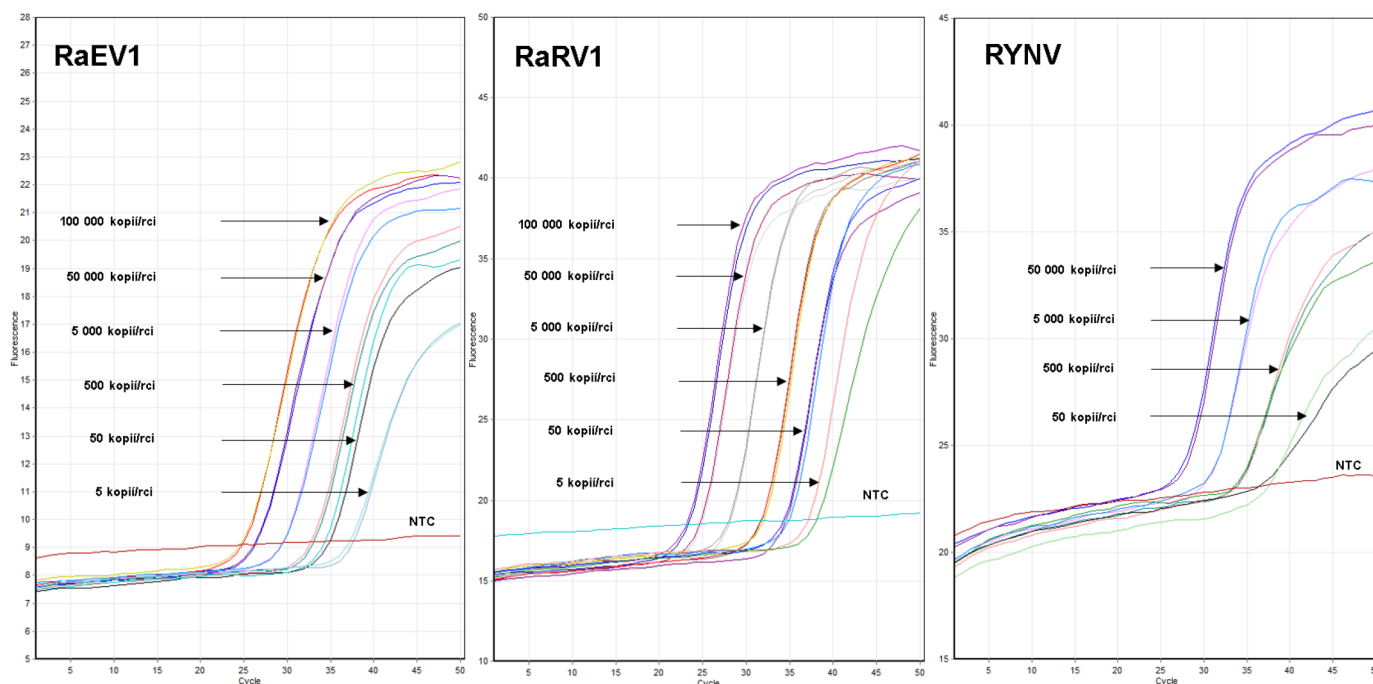
Po ukončení běhu se provádí vyhodnocení odečtením hodnoty Ct v zeleném kanálu pro detekci viru RaRV1 a IPC (duplex s RYNV); ve žlutém kanálu pro detekci viru RaEV1 a RYNV; v karmínovém kanálu pro detekci IPC (triplex s RaRV1 a RaEV1). Použité parametry:

Dynamic tube:	ANO
Slope correct:	ANO
Ignore first:	Fakultativně
Threshold:	0,01
Eliminate cycles before:	Dle potřeby

Pozitivita se stanovuje jako hodnota cyklu (Ct), při kterém dojde k protnutí amplifikační křivky a nastaveného prahu (Threshold). Pokud se provádí kvantitativní hodnocení výsledků, software vytvoří kalibrační křivku na základě Ct hodnot série různě řaděných standardů, na základě které vypočte koncentraci viru RaEV1, RaRV1 a RYNV v požadovaných jednotkách (Obrázek 1 pro ilustraci).



**Obrázek 1.** Ukázka výstupu detekce virů RaEV1, RaRV1 a RYNV s využitím Luna Universal Probe qPCR Master Mix a cyklu Rotor-Gene Q.



### Vyhodnocení systému kontrol kvality

Pro interpretaci výsledků je klíčové správné vyhodnocení systému kontrol zajišťujících validitu výsledků.

#### *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. Dle vlastních laboratorních výsledků lze pro čerstvé listy maliníku s ohledem na typ použitých reagentů očekávat hodnoty Ct v rozsahu 13,8 – 22,4 (95% interval spolehlivosti; detaily viz také kapitola 3.4).

Při použití RubusVir II 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.

**Tabulka 4.** Přehled očekávaných výsledků pro systém kontrol [1mil. kopií/rci], které jsou součástí RubusVir II qPCR-RG detekčního kitu. Rozmezí představuje 95% interval spolehlivosti.

Standard [1mil. kopií/reakci]	Luna Universal Probe qPCR Master Mix (Ct)	qPCR 2x Blue Master Mix (Ct)	Luna Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit (Ct)
RaEV1	18,40 – 19,36	19,62 – 19,96	18,22 – 19,39
RaRV1	16,67 – 17,82	17,86 – 18,78	16,46 – 17,07
RYNV	22,35 – 23,00	23,69 – 24,43	21,90 – 22,32
IPC (čtení v IRDye700 kanálu)	17,44 – 18,67	17,81 – 18,46	16,95 – 17,20
IPC (čtení v 6-FAM kanálu)	18,90 – 19,49	19,79 – 21,29	18,23 – 18,81

**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 RubusVir II qPCR-RG detekčního kitu v přístroji Rotor-Gene Q lze pro přiložené standardy RYNV, RaRV1 a RaEV1 při použití v koncentraci 1 milion kopií v PCR reakci očekávat rozpětí hodnot Ct dle Tabulky 4.

Negativní kontrola představuje PCR reakci bez přidaného templátu (cDNA), 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. Tento typ kontroly je extrémně důležitý pro stanovení RYNV, neboť ten se může vyskytovat jako integrovaný provirus či v episomální podobě a případná kontaminace DNA z izolace RNA může vést k falešně pozitivním výsledkům.

### 3.2.3.2 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.

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

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

### 3.3 Validace metody

Validace byla provedena pro dvoukrokovou RT-qPCR detekční metodu podle výše uvedených postupů s následujícími reagensy:

- ▶ Izolace RNA byla provedena pomocí kitu Ribospin™ Plant (GeneAll Biotechnology).
- ▶ Pro přípravu cDNA byla použita reverzní transkriptáza M-MLV Reverse Transcriptase, 200 U/μl (Invitrogen).



- ▶ Pro real-time PCR analýzu byl využit kit RubusVir II qPCR-RG (multiplexní detekce).
- ▶ Byly testovány dva typy PCR reagensií:
  - qPCR 2x Blue Master Mix (Top-Bio)
  - Luna Universal Probe qPCR Master Mix (New England Biolabs)
- ▶ Validace proběhla s využitím cykleru Rotor-Gene Q.

Uživatelé jiných postupů a jiných real-time PCR cyklerů si musí provést verifikaci metody a ověření výkonnostních charakteristik na svém pracovišti podle svých postupů s ohledem na své laboratorní vybavení. Validace detekční metody byla provedena podle protokolu EPPO PM 7/98 (5): 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:

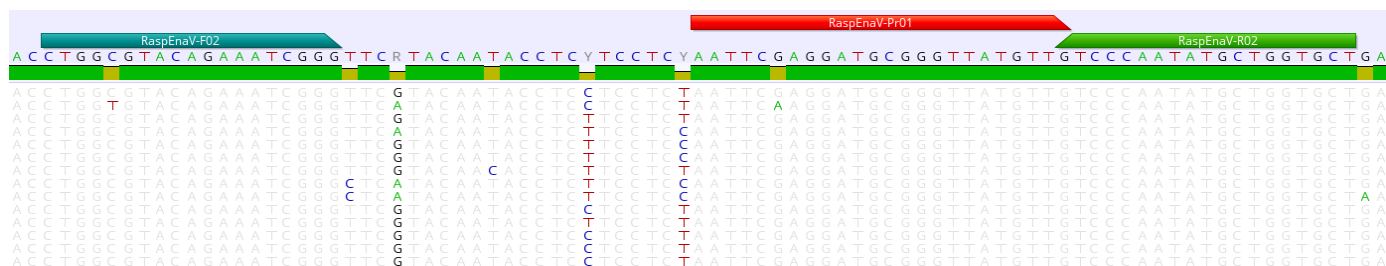
- ▶ Diagnostická specifita
- ▶ Analytická senzitivita
- ▶ Opakovatelnost
- ▶ Reprodukovatelnost

### 3.3.1 Stanovení specifity

#### *Metodika*

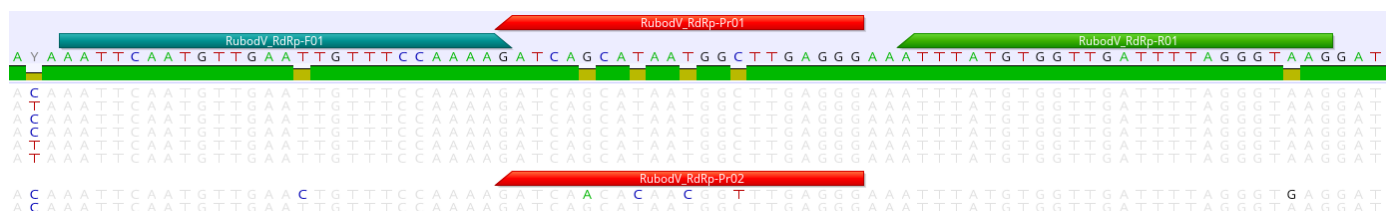
Viry RaRV1 a RaEV1 jsou nově objevené viry metodou vysokokapacitního sekvencování (HTS; High-Throughput Sequencing), které byly charakterizovány ve spolupráci s týmem Dr. Fránové z Ústavu molekulární biologie rostlin, Biologické centrum AV ČR, v. v. i. (RaEV1: Koloniuk *et al.* 2023; RaRV1: manuskript v přípravě, Lenz *et al.*). Pro RaEV1 bylo celkem identifikováno 14 izolátů (12 z České republiky, 2 z Norska), u kterých byla získána téměř kompletní genomová sekvence (~5,8 kbp). Pro výběr vhodné oblasti pro návrh primerů byla provedena multiple-alignment analýza, na základě, které byla vybrána oblast genu pro RdRp, která byla nejvíce konzervovaná mezi izoláty (Obrázek 2). Navržená oblast byla dále analyzována pomocí Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), aby se vyloučila přítomnost této oblasti u příbuzných virů. V této oblasti pak bylo navrženo několik párů primerů a sond pro nezávislé testování specifity u živých vzorků. PCR produkt pro real-time PCR detekci je dlouhý 83 nt (referenční sekvence: OR683427).

**Obrázek 2.** Vybraná oblast pro real-time PCR detekci RaEV1 s vyznačenými primery a sondou.



Obdobně bylo postupováno i v případě RaRV1, pro který bylo k dispozici 8 izolátů z České republiky. Na základě analýz byl pro real-time PCR detekci vybrán segment kódující RdRp protein. Protože byly nalezeny dva hlavní odlišné kmeny, bylo pro jejich detekci nutné navrhnout dvě sondy. Délka ampliconu je 76 bp (Obrázek 3; sekvence odeslána do GenBank).

**Obrázek 3.** Vybraná oblast pro real-time PCR detekci RaRV1 s vyznačenými primery a sondami.



Situace u RYNV je komplikovaná tím, že se: i) jedná o značně polymorfní virus; ii) při svém životním cyklu využívá cirkulární DNA, která persistuje v buňkách v epizomální podobě; iii) může se integrovat do rostlinného genomu, kde může setrvávat v latentní, neaktivní formě, ale může se také reaktivovat. Kvalitní diagnostika tohoto viru tak spočívá na dvou pilířích – eliminace DNA při izolaci RNA (důkladné používání DNasy při izolaci, kontrola přítomnosti kontaminující DNA pomocí RT- kontrol) a návrh takových primerů a sond, které nedetekují známé, neaktivní endogenní varianty RYNV. Byla proto provedena i) analýza sekvencí v databázi GeneBank (n=60); ii) charakterizace sekvencí vlastních izolátů RYNV (n=50); a iii) podrobná sekvenační analýza popsanych endogenních variant (Ho *et al.* 2024). Na základě těchto analýz byla pro návrh primerů a sond vybrána oblast obalového proteinu (Co-like) v rámci polyproteinu, která vykazovala nejvyšší míru konzervovanosti mezi izoláty, a byla zároveň specifická pro RYNV (referenční sekvence: NC\_026238). Navržené primery a sondy zároveň nedetekují endogenní variantu endoRYNV-BS, která se v našich izolátech vyskytovala nejčastěji.

Pomocí různých sad navržených primerů bylo provedeno nezávislé testování souboru vzorků rostlin rodu *Rubus* subgen. *Idaeobatus* a *Rubus* subgen. *Rubus* (více jak 300 vzorků) odebraných na území České republiky, aby byla ověřena jejich specificita. Všechny podstatné kroky vývoje detekčního systému byly verifikovány sekvenačně. Specificita byla též ověřena na negativních vzorcích a na směsných vzorcích (vzájemná koinfekce a/nebo v komplexu s black raspberry necrosis virus [BRNV] a raspberry bushy dwarf virus [RBDV]).

### *Očekávaná hodnota parametru*

- ▶ Očekává se 100% specificita pro diagnostiku jednotlivých virů.

### *Výsledky, závěr, shrnutí*

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. U vzorků, které byly koinfikovány více viry (BRNV a RBDV), byla ve všech případech specificky potvrzena přítomnost daného viru a nebyl zaznamenán žádný případ křížové nespecifické reakce.

- ▶ Diagnostická specificita metody je stanovena na 100% pro viry RaEV1, RaRV1 a RYNV.

### **3.3.2 Stanovení analytické senzitivity**

#### *Metodika*

Syntetické pozitivní kontroly pro RaEV1, RaRV1 a RYNV 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). Cílem bylo nalézt nejnižší koncentraci ředění (limitní ředění), pro kterou budou všechny testované vzorky dané koncentrace pozitivní s nezměněnými amplifikačními parametry (testováno v kvadruplikátu). Stanovení senzitivity pro každý virus bylo provedeno s použitím obou typů PCR reagiencí: qPCR 2x Blue Master Mix (Top-Bio) a Luna Universal Probe qPCR Master Mix (New England Biolabs). Protože se v případě testování virů RaRV1 a RaEV1 jedná o multiplexní reakci se současnou detekcí dvou různých virů, byl testován i vliv multiplexování na analytickou senzitivitu porovnáním se simplexní detekcí konkrétního viru (testováno s qPCR 2x Blue Master Mix, Top-Bio).

### *Očekávaná hodnota parametru*

- ▶ Multiplexováním nedojde k snížení analytické senzitivity.
- ▶ Nejnižší dosažené ředění s konzistentní detekcí alespoň 1 000 kopií/reakci.

### *Výsledky, závěr, shrnutí*

Pro analýzu vlivu multiplexování byly porovnány výsledky detekce virů RaRV1 a RaEV1 v simplexním a multiplexním uspořádání při různých koncentracích (100 000 až 5 kopií na reakci) syntetické pozitivní kontroly. Výsledky detekce jsou pro oba viry v obou provedeních srovnatelné.

Pro **RaEV1** bylo při použití obou typů PCR reagiencí dosaženo citlivosti 5 kopií/reakci; Luna Universal Probe qPCR Master Mix vykazoval průměrně Ct nižší o 1,6 ve srovnání s qPCR 2x Blue Master Mix. Pro **RaRV1** bylo při použití obou typů PCR

reagencií dosaženo citlivosti 500 kopií/reakci; Luna Universal Probe qPCR Master Mix vykazoval průměrně Ct nižší o 1,75 ve srovnání s qPCR 2x Blue Master Mix. Pro další stanovení výkonnostních charakteristik pro detekci **RaEV1** a **RaRV1** byla použita koncentrace ředění **500 kopií/reakci**, která byla opakovaně spolehlivě detekována s nízkou variabilitou, a **qPCR 2x Blue Master Mix**, který sice vykazoval horší kinetiku o 1,6–1,75 cyklu, ale je o více jak polovinu levnější ve srovnání s Luna Universal Probe qPCR Master Mix a s ohledem na cenu může být některými laboratořemi preferován. Pro Luna Universal Probe qPCR Master Mix lze však očekávat, že další výkonnostní parametry budou srovnatelné nebo lepší v porovnání s qPCR 2x Blue Master Mix a je na uživateli, aby si tyto parametry případně ověřil.

Pro **RYNV** bylo při použití obou typů PCR reagentů dosaženo citlivosti 500 kopií/reakci; Luna Universal Probe qPCR Master Mix vykazoval průměrně Ct nižší o 1,75 ve srovnání s qPCR 2x Blue Master Mix. Pro další stanovení výkonnostních charakteristik pro detekci **RYNV** byla použita koncentrace ředění **1 000 kopií/reakci**, která byla opakovaně spolehlivě detekována s nízkou variabilitou, a **Luna Universal Probe qPCR Master Mix**, který ve srovnání s qPCR 2x Blue Master Mix vykazoval nižší variabilitu při nižších koncentracích.

- ▶ Multiplexování nemá negativní vliv na výkonnost testu; výsledky jsou srovnatelné se simplexním uspořádáním pro RaRV1 a RaEV1.
- ▶ Analytická senzitivita metody detekce je pro:
  - RaEV1 500 kopií/reakci,
  - RaRV1 500 kopií/reakci,
  - RYNV 1 000 kopií/reakci.

### 3.3.3 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 virů RaRV1 a RaEV1 stanoveno na 500 kopií/reakci a pro RYNV 1 000 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 RaRV1 a RaEV1 v jedné reakci s využitím qPCR 2x Blue Master Mix a v simplexním uspořádání pro RYNV s využitím Luna Universal Probe qPCR Master Mix. U každé série se stanoví variační koeficient a celkový průměrný variační koeficient, který vyjadřuje míru shody naměřených hodnot 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 (RaEV1 a RaRV1) nebo 1 000 kopií/reakci (RYNV).

#### *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, závěr, shrnutí*

- ▶ Opakovatelnost metody detekce při limitním ředění vyjádřená jako míra shody mezi hodnotami z jednotlivých sérií měřená průměrným variačním koeficientem je pro:
  - RaEV1  $0,0214 \pm 0,0009$ , tj. 2,14 %
  - RaRV1  $0,0145 \pm 0,0021$ , tj. 1,45 %
  - RYNV  $0,0180 \pm 0,0019$ , tj. 1,8 %.
- ▶ Pro všechny testované viry (RYNV, RaEV1 a RaRV1) byly zaznamenány pozitivní nálezy ve všech vzorcích při limitním ředění, opakovatelnost pro kvalitativní účely je 100 %.

### **3.3.4 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 virů RaEV1 a RaRV1 stanoveno na 500 kopií/reakci a pro RYNV 1 000 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 třemi různými pracovníky. Byl stanoven variační koeficient, který vyjadřuje míru shody naměřených hodnot 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, závěr, shrnutí*

- ▶ Reprodukovatelnost metody detekce při limitním ředění vyjádřená jako míra shody mezi hodnotami z jednotlivých sérií provedených různými pracovníky v různých PCR bězích měřená variačním koeficientem je pro:
  - RaEV1 0,0180, tj. 1,8 %.
  - RaRV1 0,0136, tj. 1,36 %.
  - RYNV 0,0340, tj. 3,4 %.
- ▶ Pro všechny testované viry (RaEV1, RaRV1 a RYNV) byly zaznamenány pozitivní nálezy ve všech vzorcích, reprodukovatelnost pro kvalitativní účely je 100 %.

### **3.4 Porovnání PCR reagensí**

Nabídka v oblasti PCR reagensí je velmi bohatá, proto byly v rámci ověřování metodiky detekce virů RaEV1, RaRV1 a RYNV otestovány a porovnány různé přístupy a reagensie pro přípravu cDNA a PCR. Testování probíhalo na vzorcích maliníku, u nichž byla předem ověřena pozitivita či negativita. Do reakcí vstupovala RNA, která byla izolována pomocí kitu Ribospin™ Plant (GeneAll Biotechnology). Byla vyzkoušena jak jednokroková detekce s využitím Luna Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit (New England Biolabs), tak dvoukroková detekce s využitím dvou typů běžných reverzních transkriptáz a dvou typů PCR reagensí. Všechny srovnávací analýzy byly prováděny paralelně s využitím kitu RubusVir II qPCR-RG. Celkem bylo porovnáno pět variant detekce virů RaEV1, RaRV1, RYNV a příslušné IPC:

- ▶ **One-Step NEB:** Luna Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit (New England Biolabs, **NEB**)
- ▶ **Inv+T-B:** M-MLV Reverse Transcriptase (**Invitrogen**) + qPCR 2x Blue Master Mix (**Top-Bio**)
- ▶ **Pro+T-B:** M-MLV Reverse Transcriptase (**Promega**) + qPCR 2x Blue Master Mix (**Top-Bio**)
- ▶ **Inv+NEB:** M-MLV Reverse Transcriptase (**Invitrogen**) + Luna Universal Probe qPCR Master Mix (New England Biolabs, **NEB**)
- ▶ **Pro+NEB:** M-MLV Reverse Transcriptase (**Promega**) + Luna Universal Probe qPCR Master Mix (New England Biolabs, **NEB**)

Pro každou kombinaci reagensií pro konkrétní virus/IPC bylo nejprve pro každý vzorek určeno 1. až 5. pořadí podle naměřených hodnot Ct (nejnižší hodnota = nejlepší výsledek = 1. v pořadí) a následně bylo spočítáno průměrné umístění pro každou kombinaci reagensií pro konkrétní virus/IPC. Dále byl spočítán průměrný rozdíl Ct jednotlivých kombinací vzhledem k té nejlepší na 1. místě.

### 3.4.1 Detekce RYNV a příslušné IPC

RYNV a IPC jsou detekovány v jedné reakci, **RYNV** ve žlutém kanálu a **IPC** v zeleném kanálu. Výsledky srovnání ukazuje Tabulka 5 (RYNV) a Tabulka 6 (příslušná IPC).

**Tabulka 5.** Porovnání jednotlivých kombinací reagensií pro detekci **RYNV**. Nejlepší průměrné pořadí zeleně. **Inv+T-B:** M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) + qPCR 2x Blue Master Mix (Top-Bio); **Pro+T-B:** M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) + qPCR 2x Blue Master Mix (Top-Bio); **Inv+NEB:** M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) + Luna Universal Probe qPCR Master Mix (New England Biolabs, NEB); **Pro+NEB:** M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) + Luna Universal Probe qPCR Master Mix (New England Biolabs, NEB); **One-Step NEB:** Luna Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit (New England Biolabs, NEB)

Vzorek	Inv+T-B (Ct)	Pro+T-B (Ct)	Inv+NEB (Ct)	Pro+NEB (Ct)	One-Step NEB (Ct)
1	21,62	21,82	20,27	20,39	20,71
2	25,49	26,48	24,29	25,18	24,38
3	21,94	23,16	21,06	21,78	21,48
4	22,74	25,27	21,58	22,30	22,38
5	21,80	23,71	20,25	21,61	21,24
6	24,10	24,87	22,79	22,90	22,83
7	23,24	24,58	22,19	23,27	22,02
8	23,50	25,88	21,73	24,85	21,91
9	24,09	26,61	23,14	26,13	22,21
10	22,66	24,00	20,83	22,72	22,00
11	26,15	28,00	24,46	26,36	24,43
12	24,38	26,27	23,37	25,81	23,11
<b>Průměrné pořadí:</b>	<b>3,5</b>	<b>5</b>	<b>1,3</b>	<b>3,3</b>	<b>1,8</b>
<b>Průměrný rozdíl Ct od nejlepší:</b>	1,31	2,89		1,45	0,23

**Tabulka 6.** Porovnání jednotlivých kombinací reagensů pro detekci příslušné IPC. Nejlepší průměrné pořadí zeleně. **Inv+T-B:** M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) + qPCR 2x Blue Master Mix (Top-Bio); **Pro+T-B:** M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) + qPCR 2x Blue Master Mix (Top-Bio); **Inv+NEB:** M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) + Luna Universal Probe qPCR Master Mix (New England Biolabs, NEB); **Pro+NEB:** M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) + Luna Universal Probe qPCR Master Mix (New England Biolabs, NEB); **One-Step NEB:** Luna Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit (New England Biolabs, NEB)

Vzorek	Inv+T-B (Ct)	Pro+T-B (Ct)	Inv+NEB (Ct)	Pro+NEB (Ct)	One-Step NEB (Ct)
1	18,12	18,56	16,96	17,98	17,36
2	18,54	19,03	17,73	17,96	18,25
3	17,28	18,00	16,49	17,14	17,16
4	16,89	17,86	15,99	17,00	17,25
5	16,38	16,98	15,66	16,43	16,52
6	18,37	18,62	17,10	17,84	17,81
7	18,79	19,60	17,57	18,80	18,20
8	19,36	21,92	17,97	21,22	18,46
9	20,15	22,81	19,11	23,32	18,48
10	17,77	19,18	16,63	18,86	17,59
11	20,10	21,07	18,52	20,53	18,50
12	18,98	21,74	18,07	21,26	18,24
<b>Průměrné pořadí:</b>	<b>3,2</b>	<b>4,9</b>	<b>1,2</b>	<b>3,4</b>	<b>2,3</b>
<b>Průměrný rozdíl Ct od nejlepší:</b>	1,08	2,30		1,71	0,50

Pro detekci RYNV a příslušné IPC se nejlépe osvědčila dvoukroková RT-qPCR kombinující M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) + Luna Universal Probe qPCR Master Mix (New England Biolabs, NEB), která byla následována jednokrokovou detekcí s průměrným rozdílem do +0,5 Ct. Nejhorší výkonnost byla zjištěna u kombinace M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) + qPCR 2x Blue Master Mix (Top-Bio), která téměř vždy (kromě jednoho vzorku) skončila na posledním místě s průměrným rozdílem Ct +2,89 oproti vítězi.

### 3.4.2 Detekce RaEV1, RaRV1 a příslušné IPC

Viry RaEV1 a RaRV1 spolu s IPC jsou detekovány v jedné multiplexní reakci: RaRV1 v zeleném kanálu, RaEV1 v žlutém kanálu a příslušná IPC v karmínovém kanálu. Výsledky srovnání ukazují Tabulky 7 (RaRV1), 8 (RaEV1) a 9 (příslušná IPC).



**Tabulka 7.** Porovnání jednotlivých kombinací reagentů pro detekci **RaRVI**. Nejlepší průměrné pořadí zeleně. **Inv+T-B:** M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) + qPCR 2x Blue Master Mix (Top-Bio); **Pro+T-B:** M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) + qPCR 2x Blue Master Mix (Top-Bio); **Inv+NEB:** M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) + Luna Universal Probe qPCR Master Mix (New England Biolabs, NEB); **Pro+NEB:** M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) + Luna Universal Probe qPCR Master Mix (New England Biolabs, NEB); **One-Step NEB:** Luna Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit (New England Biolabs, NEB)

Vzorek	Inv+T-B (Ct)	Pro+T-B (Ct)	Inv+NEB (Ct)	Pro+NEB (Ct)	One-Step NEB (Ct)
1	17,83	19,54	16,95	18,56	17,04
2	18,84	19,50	17,51	18,99	18,81
3	17,43	18,47	16,49	17,43	17,95
4	17,45	19,79	16,44	18,88	17,58
5	Neg	Neg	35,38	Neg	36,01
6	18,10	18,87	16,91	18,18	17,69
7	20,17	22,26	18,92	21,05	19,37
8	Neg	33,68	Neg	Neg	Neg
9	19,07	19,14	17,84	18,24	18,5
<b>Průměrné pořadí:</b>	<b>2,8</b>	<b>4,3</b>	<b>1,1</b>	<b>3,2</b>	<b>2,4</b>
<b>Průměrný rozdíl Ct od nejlepší:</b>	1,12	2,06		1,47	0,81

**Tabulka 8.** Porovnání jednotlivých kombinací reagentů pro detekci **RaEVI**. Nejlepší průměrné pořadí zeleně. **Inv+T-B:** M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) + qPCR 2x Blue Master Mix (Top-Bio); **Pro+T-B:** M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) + qPCR 2x Blue Master Mix (Top-Bio); **Inv+NEB:** M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) + Luna Universal Probe qPCR Master Mix (New England Biolabs, NEB); **Pro+NEB:** M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) + Luna Universal Probe qPCR Master Mix (New England Biolabs, NEB); **One-Step NEB:** Luna Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit (New England Biolabs, NEB)

Vzorek	Inv+T-B (Ct)	Pro+T-B (Ct)	Inv+NEB (Ct)	Pro+NEB (Ct)	One-Step NEB (Ct)
1	21,62	22,60	20,10	21,53	20,60
2	27,26	29,20	25,23	27,48	25,16
3	23,72	26,94	23,23	26,04	21,96
4	23,95	26,98	23,33	26,13	21,50
5	24,68	31,28	24,25	30,93	22,46
6	28,58	28,56	26,74	27,28	25,83
7	26,24	28,82	24,57	26,27	24,29
8	29,14	29,04	28,32	28,18	27,41
9	29,32	29,98	27,36	28,80	27,56
10	20,13	21,23	19,50	20,46	19,51
11	Neg	36,30	34,67	32,11	34,10
12	21,19	22,48	20,17	21,95	19,59
13	35,83	34,09	Neg	35,33	30,95
<b>Průměrné pořadí:</b>	<b>3,7</b>	<b>4,5</b>	<b>2,2</b>	<b>3,3</b>	<b>1,3</b>
<b>Průměrný rozdíl Ct od nejlepší:</b>	2,07	3,58	0,63	2,43	

**Tabulka 9.** Porovnání jednotlivých kombinací reagensů pro detekci příslušné **IPC**. Nejlepší průměrné pořadí zeleně. **Inv+T-B:** M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) + qPCR 2x Blue Master Mix (Top-Bio); **Pro+T-B:** M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) + qPCR 2x Blue Master Mix (Top-Bio); **Inv+NEB:** M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) + Luna Universal Probe qPCR Master Mix (New England Biolabs, NEB); **Pro+NEB:** M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) + Luna Universal Probe qPCR Master Mix (New England Biolabs, NEB); **One-Step NEB:** Luna Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit (New England Biolabs, NEB)

Vzorek	Inv+T-B (Ct)	Pro+T-B (Ct)	Inv+NEB (Ct)	Pro+NEB (Ct)	One-Step NEB (Ct)
1	17,27	18,09	15,89	17,07	15,95
2	16,38	18,95	15,61	18,56	15,20
3	15,77	17,45	14,79	17,40	15,41
4	17,67	20,22	16,70	19,92	16,27
5	18,19	21,11	17,81	20,80	16,64
6	15,93	17,29	15,05	16,58	15,95
7	15,78	19,30	15,37	18,83	15,29
8	16,10	23,09	15,94	22,09	15,02
9	17,57	18,50	16,73	17,14	15,86
10	15,62	17,09	14,85	16,84	14,89
11	21,40	21,48	20,22	20,23	18,79
12	17,64	17,37	16,01	16,69	15,82
13	16,18	16,99	15,40	16,88	15,98
14	17,44	20,51	16,54	19,93	16,23
15	17,78	18,75	16,61	18,60	16,18
16	16,91	17,26	16,16	16,80	15,85
<b>Průměrné pořadí:</b>	<b>3,3</b>	<b>4,9</b>	<b>1,7</b>	<b>3,6</b>	<b>1,4</b>
<b>Průměrný rozdíl Ct od nejlepší:</b>	1,14	3,01	0,27	2,44	

Pro detekci RaRV1 se opět nejlépe osvědčila dvoukroková RT-qPCR kombinující M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) + Luna Universal Probe qPCR Master Mix (New England Biolabs, NEB) následovaná jednokrokovou detekcí s průměrným rozdílem +0,8 Ct. Obě kombinace reagensů však nedetekovaly jeden stejný, velmi slabě pozitivní vzorek; bylo však také zjištěno, že ani jedna z pěti testovaných kombinací PCR reagensů nezachytila všechny vzorky. Zajímavé je, že pro detekci RaEV1 a příslušné IPC se situace obrátila – nejcitlivější byla jednokroková detekce Luna Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit (New England Biolabs, NEB) a druhá v pořadí s průměrným odstupem +0,6 Ct byla dvoukroková RT-qPCR kombinující M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) + Luna Universal Probe qPCR Master Mix (New England Biolabs, NEB), která navíc nedetekovala jeden slabě pozitivní vzorek.

Ve všech třech testech byla nejhorší výkonnost opět zaznamenána pro kombinaci M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) + qPCR 2x Blue Master Mix (Top-Bio),

která v některých testech vykazovala rozdíl i +8 Ct. Zbývající dvě kombinace [Inv+T-B: M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) + qPCR 2x Blue Master Mix (Top-Bio) a Pro+NEB: M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) + Luna Universal Probe qPCR Master Mix (New England Biolabs, NEB)] fungovaly průměrně.

### 3.4.3 Shrnutí

- ▶ Jednokroková RT-qPCR detekce RaEV1, RaRV1, RYNV a příslušné IPC pomocí Luna Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit (New England Biolabs, NEB) poskytuje srovnatelné výsledky jako **nejlepší** dvoukrokový postup s využitím M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) + Luna Universal Probe qPCR Master Mix (New England Biolabs, NEB).
- ▶ Jako průměrné byly pro detekci RaEV1, RaRV1, RYNV a příslušné IPC vyhodnoceny kombinace reagensů M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) + qPCR 2x Blue Master Mix (Top-Bio) a M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) + Luna Universal Probe qPCR Master Mix (New England Biolabs, NEB).
- ▶ Doporučujeme nepoužívat reagensie v kombinaci M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) + qPCR 2x Blue Master Mix (Top-Bio).

Finální výběr vhodné detekční metody je na uživateli s ohledem na zamýšlený účel prováděné analýzy a další faktory, např. požadavek na detekci dalších virů ze stejného materiálu (BRNV, RpRSV, RBDV, SLRSV aj.), požadavek na rychlost, náklady za analýzu atd.

## 4 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

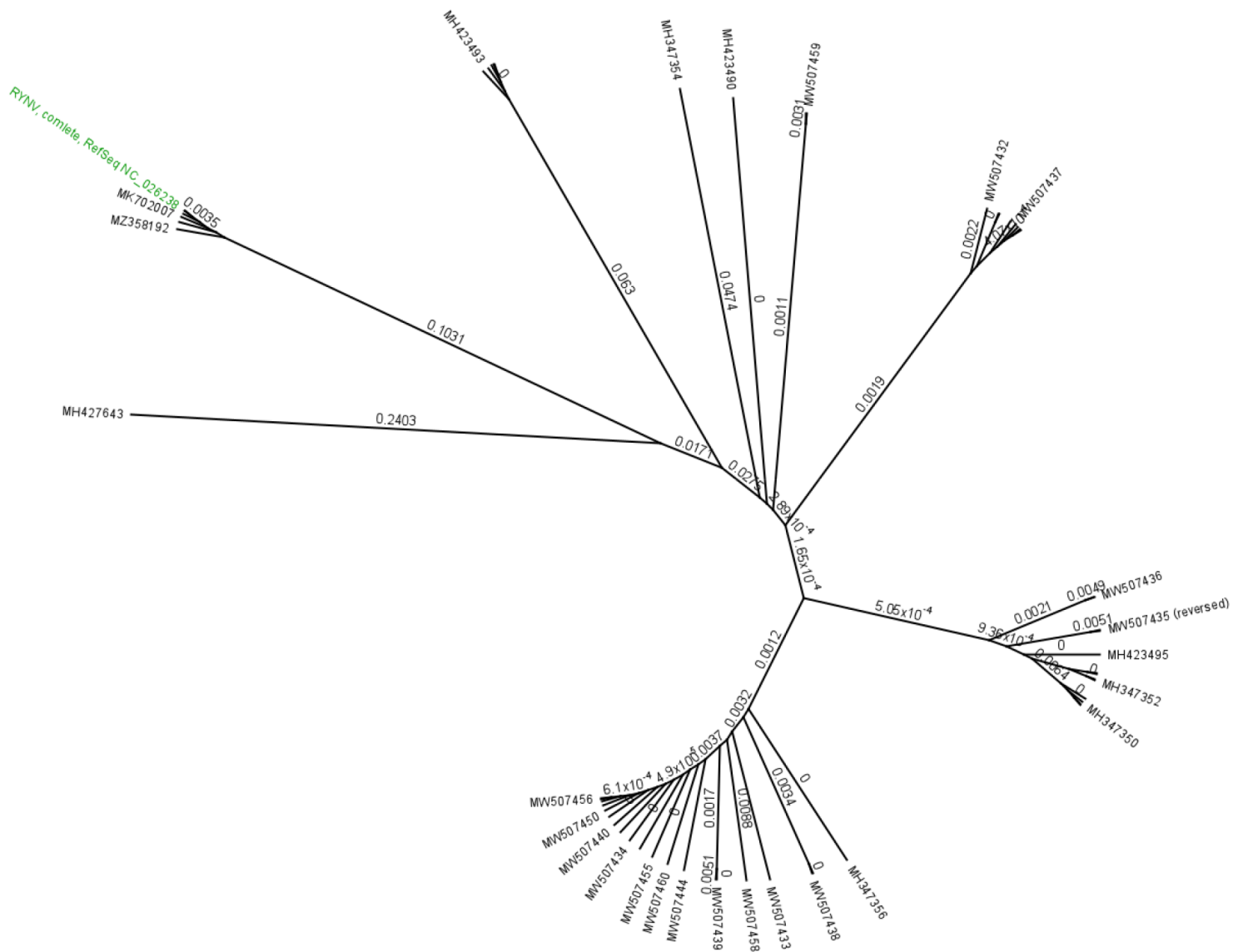
Pro viry RaEV1 a RaRV1, které byly v nedávné době objeveny, není v literatuře popsán žádný validovaný detekční systém pro jejich rutinní testování. Metoda testování RaEV1, kterou uvádí ve své publikaci Koloniuk *et al.* (2023), vychází z detekčního systému, který je součástí této metodiky. Pro virus RaRV1 se připravuje publikace (Lenz *et al.*), v které bude popsána jeho detekce pomocí zde popsané metodiky.

Vzhledem k tomu, že se může RYNV v rostlinách vyskytovat ve dvou formách -episomální a endogenní, je testování tohoto viru problematické. McGavin *et al.* (2023) se v publikaci zmiňují, že přestože byl RYNV objeven před více než 50 lety, metoda testování na principu PCR byla zavedena až v roce 2002, přičemž jedním z důvodů může být i značná genetická diverzita izolátů RYNV (Obrázek 4). Dalším milníkem v testování RYNV bylo zjištění, že se virus vyskytuje v endogenní formě. Tento nález vedl k závěru, že do té doby navržené detekční systémy mohly detekovat i formy viru, které v rostlině nevyvolávají symptomy a jsou pro rostlinu neškodné. Od roku 2015 se začínají v odborné literatuře objevovat publikace, které jsou převážně zaměřeny na analýzu endogenní formy RYNV. Tou se např. zabýval Ho *et al.* (2024), který ve své publikaci na základě „melting“

analýzy rozdělil získané endogenní formy do 6 hlavních skupin A-F. Výzkumníci uvádějí, že protokoly, které byly v rámci publikace navrženy, nejsou určeny pro diagnostické účely, ale mohly by být prvním krokem k jejich zavedení. Přítomnost endogenní formy RYNV v maliníku ve své studii řešil i Diaz-Lara *et al.* (2020) a v ostružiníku Vakić *et al.* (2022).

V předkládané metodice nově navržený detekční systém pro RYNV využívá primery a sondy, které detekují popsané episomální formy RYNV a nedetekují nejčastěji se vyskytující endogenní formu endoRYNV-BS.

**Obrázek 4.** Ukázka porovnání 56 izolátů RYNV v oblasti polyproteinu. Izoláty dostupné v GenBank (24. 6. 2022) byly namapovány pomocí Geneious mapovacího algoritmu na referenční sekvenci (zeleně) a následovala alignment analýza v oblasti polyproteinu s využitím Neighbor-Joining tree algoritmu (vizualizováno v nezakořeněné podobě, větve byly pro přehlednost proporcionálně transformované; vytvořeno pomocí software Geneious Prime). Čísla u jednotlivých větví označují substituce na pozici.



## 5 POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Validovaná metodika real-time PCR detekce virů RYNV, RaRV1 a RaEV1 v rostlinném materiálu může být využita v celé řadě aplikací, např.:

- ▶ Rutinní diagnostika virů RYNV, RaRV1 a RaEV1
- ▶ Testování zdravotního stavu rozmnožovacího materiálu pro zajištění požadavků certifikace
- ▶ Sledování výskytu virů RYNV, RaRV1 a RaEV1 na vybraném území
- ▶ Výzkum šíření virů RYNV, RaRV1 a RaEV1
- ▶ Základní výzkum biologie virů RYNV, RaRV1 a RaEV1
- ▶ Studium vektorů daných virů
- ▶ Studium přirozených hostitelů
- ▶ Testování hospodářské škodlivosti daných virů

Metodika real-time PCR detekce virů RYNV, RaRV1 a RaEV1 v rostlinném materiálu je určena pro laboratoře molekulární biologie, které se věnují diagnostice virových onemocnění nebo virologickému výzkumu, jako např.:

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

## 6 EKONOMICKÉ ASPEKTY

Ekonomickou stránku předkládané metodiky lze hodnotit z několika pohledů. Protože je detekční systém pro viry RaEV1 a RaRV1 navržen v multiplexním uspořádání, dojde tak k úspoře financí, které by byly vynaloženy na přípravu dvou PCR. Dalším přínosem je skutečnost, že včasnou detekcí případných pozitivních rostlin bude zabráněno šíření virů množitelenským materiálem v pěstebních plochách a tím i budoucím ztrátám na výnosu v dalších letech. 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 na ně pružněji reagovat.

Součástí metodiky je i porovnání různých reagensů pro analýzu virů RYNV, RaRV1 a RaEV1. Cena<sup>2</sup> použitých reagensů, časová náročnost a výsledky testování jsou shrnuty v Tabulce 10, na základě které si potenciální uživatelé mohou zvolit vhodnou kombinaci reagensů pro diagnostiku vybraných virů vzhledem ke svým potřebám. Z porovnání cen vyplývá, že nejlevnější metodou pro testování virů maliníku je jednokroková RT-qPCR s použitím Luna Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit (New England Biolabs, NEB), kdy jedna analýza stojí 23,20 Kč. Zároveň je tento postup i nejrychlejší, protože odpadá krok samostatné přípravy cDNA. Tento přístup testování je ale ekonomicky výhodný pouze pro vzorky, u kterých je vyžadována detekce maximálně dvou cílů (v simplexní reakci); pro tři a více cílů je již výhodnější dvoukroková RT-qPCR. Tato limitace je však obecně řešena návrhem a validací multiplexních detekčních systémů, kdy je možné v jedné reakci detekovat až pět (šest) cílů dle typu PCR cyklu. Ve dvou reakcích je tak možné detekovat až 10 (12) patogenů včetně příslušné IPC, což je zpravidla dostatečné pro povinně testované patogeny dle certifikačních schémat pro různé hospodářské rostliny. Multiplexní uspořádání je tak přístup s jasnými, byť individuálními, pozitivními dopady na ekonomiku laboratoře i žadatelů o vyšetření zdravotního stavu ovocných plodin.

Pokud je nutné testovat více patogenů u jednoho vzorku (velké spektrum patogenů, virologický výzkum, sekvenování, aj.), lze doporučit dvoukrokovou RT-qPCR, kdy je počítána částka za reverzní transkriptázu pouze jednou a takto připravenou cDNA lze použít na minimálně 10 (pokud není cDNA naředěna) následujících (i multiplexních) PCR; cena za analýzu jednoho vzorku se tak postupně výrazně snižuje. Na základě potřeb laboratoře je možné v Tabulce 10 vybrat nejvhodnější kombinaci reagensů. Zajímavé je, že nejlevnější kombinace reagensů [M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) + qPCR 2x Blue Master Mix (Top-Bio)] patřila k nejhorším a nejdražší kombinace [M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) + Luna Universal Probe qPCR Master Mix (New England Biolabs, NEB)] byla nejlepší; v tomto případě tak cena koresponduje s výkonností (kvalitou) reagensů.

---

<sup>2</sup> Zahrnuje pouze cenu za použitou reverzní transkriptázu a PCR reagensie. Se započítáním dalších nákladů se bude výsledná cena pro každou laboratoř lišit. Vyžádané ceny bez DPH k 30. 11. 2023.

**Tabulka 10.** Porovnání jednotlivých kombinací reagensů z hlediska finančních nákladů, časové náročnosti analýzy a výkonnosti (kvality). **Inv+T-B:** M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) + qPCR 2x Blue Master Mix (Top-Bio); **Pro+T-B:** M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) + qPCR 2x Blue Master Mix (Top-Bio); **Inv+NEB:** M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) + Luna Universal Probe qPCR Master Mix (New England Biolabs, NEB); **Pro+NEB:** M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) + Luna Universal Probe qPCR Master Mix (New England Biolabs, NEB); **One-Step NEB:** Luna Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit (New England Biolabs, NEB)

Kombinace reagensů (výrobci)	INV+T-B		Pro+T-B		INV+NEB		Pro+NEB		One-Step PCR (NEB)
Výrobce	INV	T-B	Pro	T-B	INV	NEB	Pro	NEB	23,20
Cena/vzorek (Kč)	46,30	5,20	32,20	5,20	46,30	10,90	32,20	10,90	
Cena celkem/vzorek (Kč)	51,50		37,40		57,20		43,10		
Doba pro provedení analýzy (min)	77	112	65	112	77	108	65	108	104
	189		177		185		173		
<b>Výsledky testování - pořadí</b>									
RaRV1	3		5		1		4		2
RaEV1	4		5		2		3		1
IPC (RubusVir II PmxII)	3		5		1		4		2
RYNV	4		5		1		3		2
IPC (RYNV PmxII)	3		5		2		4		1

V laboratořích, kde se rutinně provádí real-time PCR vyšetření přítomnosti RNA virů, souvisejí náklady na zavedení metodiky pouze s nákupem primerů/sond (cena bez DPH cca 45 000 Kč/ 1 000 reakcí). Laboratoře, které by uvažovaly o kompletním zavedení metodiky bez předchozích zkušeností a přístrojového vybavení, musí počítat s náklady na izolaci RNA (50 izolací cca 7 600 Kč bez DPH), příprava cDNA a PCR reagensie (Tabulka 10), real-time PCR cykler (různé cenové úrovně, orientačně > 800 000 Kč bez DPH).

## 7 SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- DIAZ-LARA, A., MOSIER, N. J., KELLER, K. E., MARTIN, R. R. A variant of Rubus yellow net virus with altered genomic organization. *Virus genes*. 2015, 50(1), 104-110. DOI: [10.1007/s11262-014-1149-6](https://doi.org/10.1007/s11262-014-1149-6)
- DIAZ-LARA, A., MOSIER, N. J., STEVENS, K., KELLER, K. E., MARTIN, R. R. Evidence of Rubus yellow net virus integration into the red raspberry genome. *Cytogenetic and Genome Research*. 2020, 160(6), 329-334. DOI: [10.1159/000509845](https://doi.org/10.1159/000509845)
- HO, T., BROOME, J. C., BUHLER, J. P., O'DONOVAN, W., TIAN, T., DIAZ-LARA, A., TZANETAKIS, I. E. Integration of Rubus yellow net virus in the raspberry genome: A story centuries in the making. *Virology*. 2024, 591, 109991. DOI: [10.1016/j.virol.2024.109991](https://doi.org/10.1016/j.virol.2024.109991)
- JONES, A. T., MCGAVIN, W. J., GEERING, A. D. W., LOCKHART, B. E. L. Identification of Rubus yellow net virus as a distinct badnavirus and its detection by PCR in Rubus species and in aphids. *Annals of applied biology*. 2002, 141(1), 1-10. DOI: [10.1111/j.1744-7348.2002.tb00189.x](https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2002.tb00189.x)
- KALISCHUK, M. L., KAWCHUK, L. M., LEGGETT, F. First report of Rubus yellow net virus on Rubus idaeus in Alberta, Canada. *Plant disease*. 2008, 92(6), 974-974. DOI: [10.1094/PDIS-92-6-0974A](https://doi.org/10.1094/PDIS-92-6-0974A)
- KOLONIUK, I., FRÁNOVÁ, J., PŘIBYLOVÁ, J., SARKISOVA, T., ŠPAK, J., TAN, J.L., ZEMEK, R., ČMEJLA, R., REJLOVÁ, M., VALENTOVÁ, L., et al. Molecular Characterization of a Novel Enamovirus Infecting Raspberry. *Viruses*. 2023, (15): 2281. DOI: [10.3390/v15122281](https://doi.org/10.3390/v15122281)
- MACFARLANE, S. A., MCGAVIN, W. J. Sequencing studies for the identification and characterization of new and old Rubus viruses. *Julius-Kühn-Archiv*. 2010, (427), 39.
- MARTIN, R. R., MACFARLANE, S., SABANADZOVIC, S., QUITO, D., POUDEL, B., TZANETAKIS, I. E. Viruses and virus diseases of Rubus. *Plant disease*. 2013, 97(2), 168-182. DOI: [10.1094/PDIS-04-12-0362-FE](https://doi.org/10.1094/PDIS-04-12-0362-FE)
- MCGAVIN, W., JONES, S., MACFARLANE, S. Distinguishing integrated sub-viral fragments from infectious Rubus yellow net virus in Scottish commercial red raspberry cultivars. *bioRxiv*, 2023-03. DOI: [10.1101/2023.03.07.531471](https://doi.org/10.1101/2023.03.07.531471)
- NDOWORA, T., DAHAL, G., LAFLEUR, D., HARPER, G., HULL, R., OLSZEWSKI, N. E., LOCKHART, B. Evidence that badnavirus infection in muscadine can originate from integrated pararetroviral sequences. *Virology*. 1999, 255(2), 214-220.
- NĚMCOVÁ V., BUCHTOVÁ, I. Situační a výhledová zpráva ovoce. Praha: Ministerstvo zemědělství. 2023. ISBN 978-80-7434-744-3
- PM 4/10 (2) Certification scheme for *Rubus*. OE PP/EPPO Bulletin. 2009, 39: 271–277.
- PM 7/98 (5) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity OE PP/EPPO Bulletin. 2021, 51:468–498. DOI: [10.1111/epp.12780](https://doi.org/10.1111/epp.12780)



VAKIĆ, M., STANTON, D., DELIĆ, D., TZANETAKIS, I. E. Characterization of the first Rubus yellow net virus genome from blackberry. *Virus Genes*. 2022, 58(6), 594-597. DOI: [10.21203/rs.3.rs-1465847/v1](https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1465847/v1)

VALENTOVÁ L., ČMEJLA R. Real-time PCR detekce virů black raspberry necrosis virus (BRNV), raspberry ringspot virus (RpRSV), raspberry bushy dwarf virus (RBDV) a strawberry latent ringspot virus (SLRSV) v rostlinném materiálu. Certifikovaná metodika. Holovousy: VŠÚO. 2022. ISBN 978-80-87030-87-5. Dostupné z: [https://www.vsuo.cz/images/patenty/Valentov\\_Metodika-RubusVir\\_2022.pdf](https://www.vsuo.cz/images/patenty/Valentov_Metodika-RubusVir_2022.pdf)

## 8 SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

ČMEJLA, R., VALENTOVÁ, L., REJLOVÁ, M. Sada pro detekci virů raspberry virus 1 a raspberry virus 2 v biologickém materiálu. Užitný vzor č. 37 208. 2023. Dostupné z: <https://isdv.upv.gov.cz/doc/FullFiles/UtilityModels/FullDocuments/FDUM0037/uv037208.pdf>

KOLONIUK, I., FRÁNOVÁ, J., PŘIBYLOVÁ, J., SARKISOVA, T., ŠPAK, J., TAN, J.L., ZEMEK, R., ČMEJLA, R., REJLOVÁ, M., VALENTOVÁ, L., et al. Molecular Characterization of a Novel Enamovirus Infecting Raspberry. *Viruses*. 2023, (15): 2281. DOI: [10.3390/v15122281](https://doi.org/10.3390/v15122281)

VALENTOVÁ, L., REJLOVÁ, M., ČMEJLA, R. RubusVir I qPCR-RG detekční kit – diagnostická souprava pro současnou real-time PCR detekci virů BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV v rostlinném materiálu. Funkční vzorek. 2022.

VALENTOVÁ, L., REJLOVÁ, M., ČMEJLA, R. Real-time PCR detekce virů black raspberry necrosis virus (BRNV), raspberry ringspot virus (RpRSV), raspberry bushy dwarf virus (RBDV) a strawberry latent ringspot (SLRSV) v rostlinném materiálu. Certifikovaná metodika. 2022. Dostupné z: [https://www.vsuo.cz/images/patenty/Valentov\\_Metodika-RubusVir\\_2022.pdf](https://www.vsuo.cz/images/patenty/Valentov_Metodika-RubusVir_2022.pdf)

VALENTOVÁ, L., REJLOVÁ, M., ČMEJLA, R. RubusVir II qPCR-RG detekční kit – souprava pro real-time PCR detekci virů RaEV1, RaRV1 a RYNV v rostlinném materiálu. Funkční vzorek. 2023



v y d á v á

## OSVĚDČENÍ

UKZUZ 062144/2024

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 Rubus yellow net virus (RYNV), raspberry rubodvirus 1 (RaRV1) a raspberry enamovirus 1 (RaEV1) v rostlinném materiálu**

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

Název organizace/cí: **VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ  
HOLOVOUSY s.r.o.**

Místo vydání: **Holovousy**

Rok vydání: **2024**

Metodika byla vypracovaná v rámci výzkumného projektu č. TO01000295 TAČR.

Brno 10. 4. 2024

Ing. Daniel Jurečka

ředitel ústavu

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

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

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

**Mgr. Jan Radoš**

Digitální podpis:  
16.04.2024 14:25

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



ISBN 978-80-87030-98-1



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

**© 2024**