

# DETEKCE VYBRANÝCH VIRŮ INFIKUJÍCÍCH JABLONĚ

## Certifikovaná metodika

Ing. Lenka Grimová, Ph.D. (40 %)

Ing. Lucie Winkowska, Ph.D. (40 %)

Prof. Ing. Pavel Ryšánek, CSc. (20 %)

Katedra ochrany rostlin, Česká zemědělská univerzita v Praze

Metodika je výsledkem řešení projektů MSM6046070901 a ČZU (CIGA) č. 20142017 a je umístěna na stránkách FAPPZ ČZU v Praze <http://metodiky.agrobiologie.cz>.

Oponentní posudky vypracovali:

doc. Dr. Ing. Jaroslav Salava, VÚRV Praha Ruzyně

Ing. Jana Pekárková, PhD., ÚKZÚZ

ISBN: 978-80-216-2722-1

Publikaci bylo Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským uděleno osvědčení č. 136258/2016 o uznání uplatněné certifikované metodiky v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje“.

## Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	2
1. LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	3
1.1. ÚVOD .....	3
1.2. VYBRANÍ VIROVÍ PATOGENI .....	3
1.2.1. VIRUS MOZAIKY JABLONĚ .....	3
1.2.2. VIRUS ŽLÁBKOVITOSTI KMENE JABLONĚ.....	4
1.2.3. VIRUS VRÁŠČITOSTI KMENE JABLONĚ.....	5
1.2.4. VIRUS CHLOROTICKÉ SKVRNITOSTI LISTŮ JABLONĚ.....	5
1.3. OCHRANA JABLONÍ PŘED VIROVOU INFEKcí .....	6
2. CÍL METODIKY .....	8
3. VLASTNÍ POPIS METODIKY .....	8
3.1. ODBĚR VZORKŮ .....	8
3.2. SKLADOVÁNÍ A PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO TESTOVÁNÍ.....	9
3.3. DETEKCE PATOGENŮ ZA VYUŽITÍ DAS a TAS ELISA.....	9
3.3.1. PRINCIP METODY.....	9
3.3.2. POTŘEBNÉ VYBAVENÍ .....	10
3.3.3. POTŘEBNÉ CHEMIKÁLIE.....	10
3.3.4. PRACOVNÍ POSTUP.....	11
3.3.5. VYHODNOCENÍ TESTŮ .....	12
3.4. DETEKCE PATOGENŮ ZA VYUŽITÍ RT-PCR a RT-qPCR .....	12
3.4.1. PRINCIP METOD.....	12
3.4.2. POTŘEBNÉ VYBAVENÍ .....	13
3.4.3. POTŘEBNÉ CHEMIKÁLIE.....	14
3.4.4. PRACOVNÍ POSTUPY .....	16
3.4.5. VYHODNOCENÍ TESTŮ .....	20
4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ .....	21
5. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY .....	22
6. EKONOMICKÉ ASPEKTY .....	22
6.1. NÁKLADY NA ZAVEDENÍ METODIKY .....	22
6.2. PŘÍNOSY ZAVEDENÍ METODIKY .....	22
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	24
8. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE .....	29
8. PŘÍLOHY .....	31

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	adenin
ACLSV	virus chlorotické skvrnitosti listů jabloně
ApMV	virus mozaiky jabloně
ASGV	virus žlábkovitosti kmene jabloně
ASPV	virus vrásčitosti kmene jabloně
BSA	hovězí sérový albumin
bp	pár bází
C	cytosin
ddH <sub>2</sub> O	re-destilovaná voda
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
G	guanin
mRNA	mesengerová RNA
PCR	polymerázová řetězová reakce
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
RPM	počet otáček za minutu
rRNA	ribozomální RNA
T	tymin
U	enzymová jednotka
UV	ultrafialové záření

# 1. LITERÁRNÍ PŘEHLED

## 1.1. ÚVOD

V rámci evropských standardů na ochranu rostlin (EPPO) jsou v současnosti popsány čtyři viry, jejichž přítomnost by měla být na stromech jabloních pravidelně sledována. Konkrétně se jedná o virus mozaiky jabloně (*Apple mosaic virus*, ApMV), virus žlábkovitosti kmene jabloně (*Apple stem grooving virus*, ASGV), virus vrásčitosti kmene jabloně (*Apple stem pitting virus*, ASPV) a virus chlorotické skvrnitosti listů jabloně (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV) (Anonym 3, 1999). Zmíněné viry se často vyskytují ve směsných infekcích (Mink, 1989).

Jejich přítomnost byla potvrzena po celém světě, přesněji řečeno na všech místech, kde jejich hostitelé volně rostou či se komerčně pěstují. Význam těchto patogenů spočívá především v jejich potenciálu způsobit nemalé výnosové ztráty při pěstování jaderovin.

## 1.2. VYBRANÍ VIROVÍ PATOGENI

### 1.2.1. VIRUS MOZAIKY JABLONĚ

Virus mozaiky jabloně (*Apple mosaic virus*, ApMV) je řazen do rodu *Ilarvirus*, čeledi *Bromoviridae* (Anonym 4, 2014). Jedná se o izometrický virus ikosahedrálního tvaru s rozměry částic okolo 25 nm (Fulton, 1967; Gotlieb a Berbee, 1973). Genom viru (tzv. segmentovaný genom) je složen z pozitivně orientované jednovláčenné molekuly RNA, která je rozdělena do tří genomových RNA a jedné subgenomové RNA. Pro vznik infekce je nutné, aby všechny segmenty viru byly v hostiteli přítomné (Ribicki, 1995; Bol, 1999; Shiel a Berger, 2000).

ApMV je celosvětově rozšířený virus s velice širokým hostitelským spektrem (Fulton, 1972). Přirozený výskyt viru byl popsán na dřevinných i bylinných hostitelích. Mezi ovocnářsky významné hostitele patří jabloně, hrušně, slivoně, meruňky, broskvoně, třešně, mandloně, jahodníky, maliníky, ostružiníky, červené rybízy a lísky (Anonym 1, 2003). Dalšími hostitelskými druhy jsou chmel, růže a několik zástupců z rodů *Prunus*, *Betula*, *Aesculus*, *Sorbus* a *Crateagus* (Sweet, 1980; Neméth, 1986; Brunt *et al.*, 1996).

K nejčastějšímu přenosu viru z infikovaných rostlin na rostliny zdravé dochází při vegetativním množením dřevin (Neméth, 1986). V odborné literatuře je dále popsán přenos viru mechanicky pomocí čepele nože kontaminované infikovanou šťávou (potvrzeno pouze u

rostlin chmele) a pomocí semen a pylu (sledováno pouze u lísek) (Cameron a Thompson, 1986; Pethybridge, 2002). V rámci jádrovin byl krom již zmíněného vegetativního přenosu pozorován pouze přenos ApMV následkem srůstu kořenů jabloní v zemi (Hunter *et al.*, 1958; Dhingra, 1972).

ApMV je nejčastěji původcem různorodých mozaik na listech (v podobě žlutých pravidelných či nepravidelných skvrn), ale infekce se může projevit i listovou nekrózou, nebo být zcela bezpříznaková (tzv. latentní) (Neméth, 1986). Příznaky viru se obvykle liší u různých virových kmenů i mezi jednotlivými hostitelskými rostlinami, a to nejen svou intenzitou, ale i konkrétním projevem. Příznaky se také často neprojeví na celé rostlině, ale náhodně na několika větvích či listech (Paunovic *et al.*, 2011).

V České republice se uvádí, že více než 17 % jabloní v sadech, je virem infikováno. U starších sadů může být napadeno i více než 50 % stromů (Svoboda a Polák, 2010).

Přesné informace o celkových ekonomických ztrátách způsobených ApMV nejsou známé. Významným faktorem je však snížení výnosu, které má infekce za následek. U jabloní jsou uváděny ztráty na výnosu ovoce 30 až 50 % (Thokchom *et al.*, 2009).

### 1.2.2. VIRUS ŽLÁBKOVITOSTI KMENE JABLONĚ

Virus žlábkovitosti kmene jabloně (*Apple stem grooving virus*, ASGV) je řazen do rodu *Capillovirus*, čeledi *Betaflexiviridae*, řádu *Tymovirales* (Anonym 4, 2014). Jedná se o vláknitý lineární virus s částicemi o velikosti 600 – 700 nm x 12 nm, který má spirálovitý tvar  $\alpha$ -helixu. Genom viru je tvořen pozitivně orientovanou jednovláčennou RNA (Lister a Bar-Joseph, 1981; Yoshikawa *et al.*, 1992).

Virus je původcem latentní infekce především u ovocných dřevin z čeledi *Rosaceae*. Jeho výskyt byl do dnešní doby potvrzen nejen na jabloních, ale i na hrušních, meruňkách, třešních, citrusech, aktinídiích, liliích a dokonce i bambusech (Lister, 1970; Inouye *et al.*, 1979; Neméth, 1986; Sawamura *et al.*, 1988; Takahashi *et al.*, 1990; Yoshikawa *et al.*, 1992; Kinard *et al.*, 1996; Clover *et al.*, 2003; Lovisolo *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2010).

ASGV je přenosný vegetativním množením infikovaných rostlin (Neméth, 1986). U některých bylinných hostitelů a u druhu *Malus platycarpa* byl experimentálně potvrzen také přenos semenem (Van der Meer, 1976; Inouye *et al.*, 1979).

Na většině odrůd jabloní je virová infekce bezpříznaková. U citlivých odrůd jabloní může docházet k poškození xylému, které se projevuje rýhami ve dřevě a nekrózami lýka (Neméth, 1986; Nickel *et al.*, 2004).

V České republice byl výskyt viru potvrzen zhruba u 50 % pěstovaných jabloní v sadech (Polák a Zieglerová, 2001; Kundu *et al.*, 2003).

Zhodnotit ekonomický dopad infekce ASGV na ovocné stromy je složité. Problémový je výskyt viru ve školkách, zvláště u okrasných jabloní, kde může dojít k úhynu stromků, ale i pouze k estetickému znehodnocení stromků při roubování a očkování (Tahakara *et al.*, 1988).

### 1.2.3. VIRUS VRÁŠČITOSTI KMENE JABLONĚ

Virus vrásčitosti kmene jabloně (*Apple stem pitting virus*, ASPV) spadá do rodu *Foveavirus*, čeledi *Betaflexiviridae*, řádu *Tymovirales* (Anonym 4, 2014). Je to vláknitý lineární virus s helikální strukturou a částicemi o velikosti přibližně 12-15 nm na šířku a 800 nm na délku. Jeho genom je tvořen jednovláknennou pozitivně orientovanou RNA (Koganezawa a Yanase, 1990; Jelkmann, 1994).

ASPV byl do dnešní doby popsán jen na úzkém okruhu hostitelských rostlin. Virus je považován za jeden z nejvýznamnějších latentních virů napadajících jabloně a hrušně, vyskytující se celosvětově v produkčních sadech jádovin. Mezi další přirozené hostitele patří kdouloně, hlohy a jeřáby (Neméth, 1986).

Virus se přenáší vegetativním množením (Jelkmann a Paunovic, 2011).

U komerčně pěstovaných odrůd jádovin je infekce většinou bezpříznaková (Desvignes *et al.*, 1999). Symptomy ASPV se obvykle projevují na citlivých odrůdách rostlin. U jabloní dochází k vrásčitosti kmene a větví, případně epinastii listů (Koganezawa a Yanase, 1990).

V České republice byl proveden rozsáhlý výzkum výskytu ASPV v jabloňových sadech a školkách. Výskyt ASPV byl potvrzen u 27,86 % vzorků, tedy u 117 jabloní ze 420 testovaných jedinců (Kundu, 2003).

Virus může být původcem významných ekonomických ztrát, avšak zhodnotit celkový ekonomický dopad infekce je složité. Virová infekce má vliv na samotný růst stromů a tím může dojít k ovlivnění ovocnářské produkce. U napadených stromů může dojít ke snížení růstu výhonů o 29 – 55 % v průběhu vegetace (Cropley a Posnette, 1973; Thomsen, 1975). Jsou však patrné významné rozdíly mezi jednotlivými ročníky a také mezi samotnými odrůdami.

### 1.2.4. VIRUS CHLOROTICKÉ SKVRNITOSTI LISTŮ JABLONĚ

Virus chlorotické skvrnitosti listů jabloně (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV) je typovým zástupcem rodu *Trichovirus*, který patří do čeledi *Betaflexiviridae*, řádu *Tymovirales*

(Anonym 4, 2014). Jedná se o vláknitý lineární virus o velikosti částic 12 x 720 nm. Jeho genom je tvořen jednovláknennou pozitivně orientovanou RNA (Yoshikawa a Takahashi, 1988).

Virus je rozšířen celosvětově, především v tradičních oblastech pěstování jaderovin a peckovin. Hostitelský okruh viru představují převážně dřeviny. Z ovocnářsky významných druhů byl virus detekován na jabloních, hrušních, švestkách, broskvoních, meruňkách, třešních a višních. Lze ho však také nalézt na mandloních, trnkách, kdouloních, mišpulích, hlozích a japonské meruňce (Lister, 1970; Sweet, 1980; Neméth, 1986; Giunchedi, 2003; Myrta *et al.*, 2003; Spiegel *et al.*, 2005).

Virus se přenáší vegetativním množением, tedy očkováním a roubováním (Neméth, 1986).

Intenzita příznaků a závažnost poškození se liší dle druhu rostliny a izolátu viru (Neméth, 1986). U většiny pěstovaných odrůd jaderovin je infekce bezpříznaková, avšak u některých starších odrůd jabloní a hrušní se mohou objevit kruhové žluté skvrny na listech, a případně i plodech (Cropley *et al.*, 1963; Desvignes a Boyé, 1988). U nejcitlivějších druhů a odrůd jaderovin dochází ke vzniku nekrotických skvrn na kmeni a větvích stromu, což může mít za následek i odumření celého stromu (Yanase 1974; Yanase *et al.*, 1979).

V České republice byl při náhodném monitoringu virus detekován téměř ve všech 72 testovaných stromech jabloní a ve 28 ze 126 testovaných hrušní (Polák *et al.*, 1997). Podobně jako u ostatních jabloňových virů, je i v tomto případě složité hodnotit ekonomický význam viru. U většiny kulturně pěstovaných jaderovin je infekce bezpříznaková a pravděpodobně nedochází k významným ztrátám na výnosech. Významné jsou ztráty ve školkách, kdy může dojít k inkompatibilitě roubu a podnože, nebo k zasychání pupenů (Desvignes, 1999).

### **1.3. OCHRANA JABLONÍ PŘED VIROVOU INFEKČÍ**

Jelikož je vegetativní množení hlavním, a často i výhradním způsobem šíření výše popsaných jabloňových virů v přírodě, představuje metoda prevence jedinou spolehlivou ochranu před těmito virovými patogeny. Pro pěstitele této ovocnářské komodity je proto zcela nezbytné využívat pouze zdravou sadbu, čehož lze docílit pouze pravidelnou kontrolou zdravotního stavu certifikovaného množitelského materiálu za využití kvalitních citlivých a spolehlivých diagnostických metod.

Certifikační schémata sadby jsou doporučována různými organizacemi zabývajícími se ochranou rostlin. V rámci evropských zemí se uplatňují standardy EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). Dle těchto standardů je povinnou součástí

certifikace u všech zmiňovaných virů testování potenciální mateční rostliny pomocí dřevinných indikátorových rostlin. Jelikož jsou tyto testy prostorově i časově náročné, jsou nejprve využívány sérologické případně geneticko-molekulární metody pro tzv. předtesty, kterými jsou hned na začátku procesu vyřazeny infikované rostliny. Provedení těchto testů je znatelně rychlejší a prostorově nenáročné. Avšak využívání pouze těchto detekčních technik není zatím formálně povoleno, jelikož tyto techniky nemusí vždy spolehlivě poskytnout výsledky v průběhu celého roku u všech testovaných rostlin (Anonym 2, 1991).

Mezi nejvíce využívané sérologické testy v současnosti patří metoda ELISA, která je pro všechny popisované viry komerčně dostupná. Poprvé byla tato metoda aplikována ve virologii pro detekci viru šarky švestky (*Plum pox virus*, PPV) a virus mozaiky huseníku (*Arabis mosaic virus*, ArMV) a s menšími modifikacemi se používá dodnes (Voller *et al.*, 1976; Clark and Adams, 1977). V České republice je možné pro tyto testy na ApMV, ACLSV a ASGV uplatnit certifikovanou metodiku pro jabloně a hrušně (Svoboda a Polák, 2010).

Z geneticko-molekulárních metod je nejčastěji využíván standardní test reverzní transkripce a polymerázové řetězové reakce (RT-PCR), případně jeho varianty multiplex RT-PCR a immunocapture RT-PCR (IC-RT-PCR) a kvantitativní RT-PCR (RT-qPCR). V minulých letech byla v literatuře popsána celá řada protokolů, jak dané jabloňové viry detekovat (Alrefai *et al.*, 1994; Sánchez-Navarro a Pallas, 1994; Candresse *et al.*, 1995, 1998; Nemchinov *et al.*, 1995; Rowhani *et al.*, 1995; Kinard *et al.*, 1996; Jelkmann a Keim-Konrad, 1997; Crossley *et al.*, 1998; James, 1998, 1999; Malinowski *et al.*, 1998; Saade *et al.*, 2000; Kirby *et al.*, 2001; Menzel *et al.*, 2002; Kundu, 2003; Paunovic a Jevremovic, 2004; Hassan *et al.*, 2006), nicméně do dnešní doby nebyla v České republice publikována žádná certifikovaná metodika pro jejich detekci.



## **2. CÍL METODIKY**

Hlavním cílem předkládané metodiky je poskytnout podrobné a srozumitelné protokoly určené pro rychlou a spolehlivou detekci vybraných virových patogenů jableň pomocí sérologických testů ELISA a molekulárně-genetických testů RT-PCR a kvantitativní RT-PCR. Spolu s protokoly je v předkládané metodice uvedena tabulka s přehledem nejvhodnějších termínů pro odběr konkrétního typu rostlinného materiálu pro detekci jednotlivých virů v průběhu roku.

Metodika vznikla na základě výsledků řešení výzkumného záměru CIGA č. 20142017 „Detekce a kvantifikace viru mozaiky jableň a dalších významných virů jableň pomocí real-time PCR.“

## **3. VLASTNÍ POPIS METODIKY**

V úvodu této kapitoly je nutné zdůraznit, že přítomnost všech čtyř vybraných virů jableň, jmenovitě viru mozaiky jableň, viru žlábkovitosti kmene jableň, viru vrásčitosti kmene jableň a viru chlorotické skvrnitosti listů jableň, se na dřevinách viditelně projevuje jen velmi zřídka, neboli virové infekce mají latentní (bezpríznakový) charakter. Z toho vyplývá, že přítomnost příznaků na listech či kmenu jableň pro nás může být samozřejmě důležitým vodítkem, avšak jejich absence zdaleka neznamena, že strom je zdravý a proto nemusí být podroben dalším diagnostickým testům.

### **3.1. ODBĚR VZORKŮ**

Rostlinný materiál odebíráme ze čtyř až šesti míst rovnoměrně rozmístěných po obvodu celé koruny testovaného stromu. Pro detekci vybraných virových patogenů můžeme jako biologický materiál použít květní i listové pupeny, listy, květy a lýko z výhonů a větví. Odebraný materiál uložíme do igelitového sáčku, který označíme a připojíme k němu informaci o místě a datu odběru, popřípadě popíšeme či fotograficky zdokumentujeme i viditelné makroskopické příznaky.

Vzorek by měl být ihned po odběru uložen na tmavé a chladné místo (např. do chlazeného transportního boxu) a posléze dopraven do diagnostické laboratoře. Poškozené vzorky (např. plesnivé, uschlé) je nutné u všech detekčních metod z testů před uskladněním ihned vyřadit.

Detekční techniky, které byly pro tuto certifikovanou metodiku optimalizovány, se mezi sebou ve spolehlivosti detekce podstatně liší, a to v závislosti na typu odebíraného materiálu a na daném ročním období. Z tohoto důvodu doporučujeme pro zvolenou detekční metodu odebírat vzorky v pro ni optimální době, anebo naopak detekční techniku přizpůsobit době odběru a typu odebíraného vzorku. Doporučené termíny odběru jsou uvedeny v tabulkách v příloze (TABULKA 1) (Winkowska *et al.*, 2016).

### **3.2. SKLADOVÁNÍ A PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO TESTOVÁNÍ**

Při použití sérologických testů ELISA je možné vzorky před samotnou analýzou uchovávat v chladícím zařízení po dobu tří až pěti dnů (teplota 4 °C).

V případě testování vzorků metodami RT-PCR nebo RT-qPCR je uskladnění vzorků v chladícím zařízení zkráceno na tři dny. V případě delšího intervalu mezi odběrem a zpracováním je nezbytné vzorky přemístit do mrazicího boxu (teplota -24 °C či -70°C), a to již nejlépe v požadované navázce pro jednotlivé analýzy, zabalené do alobalu.

Navázka rostlinného materiálu pro jednotlivé detekční metody činí 100 mg. Testovaný vzorek by měl představovat reprezentativní část odebraných rostlinných orgánů (vzorek z 6-8 listů, pupenů, květů, výhonů či větviček). U zdřevnatělých pletiv (výhony nebo větvičky) je nutné nejprve skalpelem odloupnout vrchní borku a na navázku si nožem odebrat pouze zelené lýko. Skalpel je nutné mezi jednotlivými vzorky desinfikovat ponořením nástroje do etanolu a jeho následným ožehnutím nad plamenem.

### **3.3. DETEKCE PATOGENŮ ZA VYUŽITÍ DAS a TAS ELISA**

#### **3.3.1. PRINCIP METODY**

Sérologické metody využívané v rostlinné virologii jsou založené na antigenních vlastnostech virů, tj. na jejich schopnosti indukovat v krvi teplokrevných živočichů tvorbu protilátek. Nejčastěji používaná sérologická metoda je v současné době **ELISA** (*enzyme-linked immunosorbent assay*), ve které se komplex antigen/protilátky absorbuje na jamky plastických mikrotitračních destiček. Metoda v sobě kombinuje specifčnost interakce antigen/protilátka spolu s detekcí patogena pomocí konjugovaného enzymu na protilátku. Aktivita enzymu je měřena spektrofotometricky přidáním příslušného substrátu, který mění barvu v závislosti na množství enzymu v reakci. Intenzita zbarvení se může dále využít pro kvantifikaci patogena v daném vzorku.

### 3.3.2. POTŘEBNÉ VYBAVENÍ

- termostat
- chladicí zařízení s mrazicím boxem
- spektrofotometr
- analytické váhy
- pH metr
- mikropipety a špičky
- 96 jamkové průhledné mikrotitrační destičky s víčky (Immuno<sup>TM</sup>, Nunc)
- 15 ml centrifugační mikrozkušavky se šroubovacím víčkem
- 2 ml sterilní mikrozkušavky s víčkem
- polystyrénové vaničky
- třecí misky a tloučky

### 3.3.3. POTŘEBNÉ CHEMIKÁLIE

- testovací soupravy DAS/TAS ELISA (protilátky, pozitivní a negativní kontroly)
  - (1) Agritest (detekce ApMV)
  - (2) Bioreba (detekce ASGV a ASPV)
  - (3) Loewe (detekce ACLSV)
- POTAHOVACÍ PUFER (pH 9,6). Příprava: 1,59 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 2,93 g NaHCO<sub>3</sub> rozpustíme v destilované vodě a doplníme do 1 l. Pufr uchováme při 4 °C.
- PROMÝVACÍ PUFER PBST (pH 7,3). Příprava: 8 g NaCl, 2,9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 12 H<sub>2</sub>O, 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 g KCl a 0,5 ml Tween 20 rozpustíme v destilované vodě a doplníme do 1 l. Pufr uchováváme při 4 °C.
- EXTRAKČNÍ PUFER (pH 7,4). Příprava: 20 g polyvinyl pyrrolidinu, 2 g BSA rozpustíme v 1 l promývacího pufru. Pufr uchováváme při 4 °C maximálně 1 týden.
- SUBSTRÁTOVÝ PUFER (pH 9,8). Příprava: 97 ml diethanolaminu rozpustíme v destilované vodě a doplníme do 1 l. Pufr uchováváme při 4 °C v tmavé láhvi.
- SUBSTRÁT (4-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate, např. výrobce SIGMA-ALDRICH). Lze uchovávat dlouhodobě při -20 °C.

### 3.3.4. PRACOVNÍ POSTUP

1) Před samotným testováním je nutné si důkladně označit mikrotitrační destičku, aby v průběhu práce nedošlo k záměně protilátek nebo otočení destičky. Dále je třeba mít zpracované schéma s rozvržením vzorků na destičce.

2) Jamky destičky jsou potaženy 100  $\mu$ l potahovacího pufru s polyklonální protilátkou příslušného viru (zásobní roztok IgG je ředěn potahovacím pufrem dle návodu výrobce) a poté jsou 2 hod inkubovány ve 37 °C. Po inkubaci je destička třikrát promyta promývacím pufrem PBST.

3) Ve třetí misce je rozdrčen testovaný rostlinný materiál (navážka 100 mg rostlinného pletiva) v extrakčním pufru (doporučené ředění vzorku výrobcem kitu bývá 1:10 nebo 1:20 w/V). Dále se v protokolu pokračuje dle testovaného patogena:

3A) Detekce ApMV: 100  $\mu$ l vzorku je napipetováno v dupletech do jamek včetně negativní a pozitivní kontroly dodané výrobcem protilátek. Do první dvojice jamek je napipetováno pouze 100  $\mu$ l extrakčního pufru (slepá kontrola). Destička je ponechána přes noc ve 4 °C. Druhý den je destička třikrát promyta a potažena 100  $\mu$ l extrakčního pufru s monoklonálními protilátkami (zásobní roztok IgG je ředěn extrakčním pufrem dle návodu výrobce) a je ponechána 2 hod ve 37 °C. Pak je destička třikrát promyta. Do destičky je napipetováno 100  $\mu$ l extrakčního pufru s protilátkami značenými alkalickou fosfatázou (zásobní roztok IgG-AP je ředěn extrakčním pufrem dle návodu výrobce) a následuje inkubace 2 hod ve 37 °C. Poté je destička čtyřikrát promyta.

3B) Detekce ASPV a ASGV: 100  $\mu$ l vzorku je napipetováno v dupletech do jamek včetně negativní a pozitivní kontroly dodané výrobcem protilátek. Do první dvojice jamek je napipetováno pouze 100  $\mu$ l extrakčního pufru. Destička je ponechána přes noc ve 4 °C. Druhý den je destička třikrát promyta. Poté je destička potažena 100  $\mu$ l extrakčního pufru s protilátkami značenými alkalickou fosfatázou (zásobní roztok IgG-AP je ředěn extrakčním pufrem dle návodu výrobce) a nechána se 4 hod inkubovat ve 37 °C. Pak je destička znovu čtyřikrát promyta.

3C) Detekce ACLSV: 50  $\mu$ l vzorku je napipetováno v dupletech do jamek spolu s 50  $\mu$ l extrakčního pufru s protilátkou značenou alkalickou fosfatázou (zásobní roztok IgG-AP je ředěn extrakčním pufrem dle návodu výrobce). Stejný postup je i v případě pouze

extrakčního pufru a pozitivní a negativní kontroly. Destička je ponechána ve 4 °C. Druhý den je destička čtyřikrát promyta.

4) Do mikrotitrační destičky je přidáno 100 µl substrátového pufru se substrátem (1 mg/ml) a po třech hodinách je výsledek vyhodnocen.

### 3.3.5. VYHODNOCENÍ TESTŮ

Vyhodnocení reakce je založeno na přítomnosti či absenci žlutého zbarvení testovaných vzorků. Intenzita zbarvení se může nejprve vyhodnotit na základě vizuálního pozorování, následně měřením absorbance jednotlivých vzorků pomocí spektrofotometru.

Slepá, negativní a pozitivní kontrola jsou používány pro kontrolu funkčnosti setu a pro kontrolu správného provedení analýzy. Negativní vzorek je vzorek, u kterého nedojde k zbarvení substrátu v obou opakováních, tj. výsledná absorbance je nižší či na úrovni použitých negativních kontrol. Jako pozitivní vzorek je vyhodnocen takový vzorek, jehož hodnota absorbance je u obou opakování vyšší (více než dvojnásobná), než je průměrná hodnota absorbance negativní kontroly plus trojnásobek její směrodatné odchylky.

## 3.4. DETEKCE PATOGENŮ ZA VYUŽITÍ RT-PCR a RT-qPCR

### 3.4.1. PRINCIP METOD

Molekulárně-genetické metody jsou založeny na detekci nukleových kyselin. Pro jejich rozvoj byl klíčový objev polymerázové řetězové reakce (PCR), která umožňuje namnožit DNA nebo její fragmenty do množství potřebného pro diagnostické účely.

RT-PCR je pro detekci a identifikaci virů jednou z nejčastěji používaných metod. V případě detekce rostlinných virů s genomem tvořeným jednovláčennou molekulou RNA je nezbytné před samotnou amplifikační reakcí PCR zahrnout reverzní transkripci (reverse transcription, RT), během níž je RNA enzymaticky zkopírována do komplementární DNA (cDNA). Tato cDNA může být následně použita jako templát pro PCR.

Samotná reakce PCR probíhá v termocykleru, což je zařízení, které dokáže automaticky podle stanoveného programu měnit dostatečně rychle teplotu, čímž je zajištěno postupné provedení jednotlivých kroků metody. Popsaná detekční metoda RT-PCR je reakce s následnou separací PCR produktů na agarózovém gelu a jejich vizualizací pomocí UV transiluminátoru.

Kvantitativní RT-PCR (RT-qPCR) umožňuje, oproti klasické PCR, detekovat hledaného patogena v testovaném materiálu i ve velmi nízké koncentraci. Metoda je založena na přítomnosti fluorescenčního substrátu v reakci, který se váže na přítomnou DNA. Pomocí speciálního termocykléru, který množství vyzářené fluorescence dokáže kontinuálně zaznamenávat, je možné určit, zda a v jakém množství je přítomna hledaná virová cDNA. Dodatečná vizualizace PCR produktů na agarózovém nosiči odpadá.

### 3.4.2. POTŘEBNÉ VYBAVENÍ

#### 3.4.2.1. IZOLACE CELKOVÉ RNA „SILIKA“ (Rott a Jelkmann, 2001)

- analytické váhy
- pH metr
- chladicí zařízení s mrazicím boxem
- spektrofotometr (Nanodrop 2000; ThermoScientific, USA)
- chlazená centrifuga
- horizontální třepačka
- vyhřívaný termoblok
- třecí misky a tloučky
- mikropipety a špičky
- 2 ml sterilní mikrozkušavky s víčkem
- nádoba s drceným ledem
- analytické váhy
- mikrovlnná trouba
- zdroj k elektroforéze
- UV transiluminátor
- horizontální elektroforéza
- elektroforetická vana a hřeben

#### 3.4.2.2. RT-PCR

- termocyklér
- chladicí zařízení s mrazicím boxem
- mikrocentrifuga
- horizontální třepačka

- vyhříváný termoblok

### 3.4.2.3. AGARÓZOVÁ HORIZONTÁLNÍ ELEKTROFORÉZA

- analytické váhy
- mikrovlnná trouba
- zdroj k elektroforéze
- UV transiluminátor
- horizontální elektroforéza
- elektroforetická vana a hřeben
- mikropipety a špičky s filtrem
- 0,5 a 1,5 ml sterilní mikrozkuřavky s víčkem
- nádoba s drceným ledem

### 3.4.2.4.

### 3.4.2.5. RT-qPCR

- termocyklér na real-time se softwarem
- mikrocentrifuga
- dotyková třepačka
- mikropipety a špičky s filtrem
- sterilní PCR destičky a sterilní průhledná víčka nebo uzavírací fólie
- nádoba s drceným ledem

## 3.4.3. POTŘEBNÉ CHEMIKÁLIE

### 3.4.3.1. IZOLACE CELKOVÉ RNA „SILIKA“ (Rott a Jelkmann, 2001)

- GRINDING PUFER (pH 5,4 upravit kyselinou octovou). Složení: 4 M guanidin thiokyanát; 0,2 M octan sodný; 1 M octan draselný; 25 mM EDTA; 2,5% PVP (w/V). Pufr uchováváme při 4 °C. Těsně před použitím je k pufru přidán 2% metabisulfát sodný (w/V).
- 10% N-lauronyl-sarkosin (w/V). Roztok uchováváme při 4 °C.
- jodid sodný. Příprava: 0,75 g Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> rozpustíme ve 40 ml sterilní ddH<sub>2</sub>O a přidáme 36 g 6 M NaI. Roztok uchováváme v tmavé láhvi při 4 °C.

- PROMÝVACÍ PUFR (pH 7,5). Složení: 10 mM Tris-HCl; 0,5 mM EDTA; 50 mM NaCl. Pomocí autoklávu sterilizujeme a poté přidáme absolutní etanol (50 % objemu). Pufr uchováváme při 4 °C.
- SILIKA SUSPENZE (pH 2,0). Příprava: 30 g silika částic rozpustíme ve 250 ml sterilní ddH<sub>2</sub>O, suspenze promícháme a ponecháme do druhého dne sedimentovat. Následující den odstraníme horní fázi suspenze (přibližně 235 ml), zbylý roztok doplníme vodou do 250 ml, opět promícháme a ponecháme 5 hod sedimentovat. 220 ml horní fáze odpipetujeme, zbylý roztok homogenizujeme. Roztok sterilizujeme pomocí autoklávu a uchováváme v tmavé láhvi při 4 °C.
- ledový absolutní etanol
- sterilní ddH<sub>2</sub>O
- tekutý dusík

#### 3.4.3.2. RT-PCR

- sterilní ddH<sub>2</sub>O
- dNTP (ThermoFisher SCIENTIFIC, Cat. No. R0193)
- primer vedoucí (výrobce např. SIGMA ALDRICH)
- primer reverzní (výrobce např. SIGMA ALDRICH)
- náhodný primer (Roche, Cat. No. 000000011034731001)
- M-MLV Reverse Transcriptase (ThermoFisher SCIENTIFIC, Cat. No. 28025013)
- DreamTaq DNA Polymerase (ThermoFisher SCIENTIFIC, Cat. No. EP0702)

#### 3.4.3.3. AGARÓZOVÁ HORIZONTÁLNÍ ELEKTROFORÉZA

- agaróza
- etidium bromid
- 10× TBE (pH 8,0). Příprava: 108 g Tris, 55 g kyselina boritá, 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) rozpustíme v destilované vodě a doplníme do 1000 ml. Pufr sterilizujeme pomocí autoklávu a uchováváme při 4 °C.
- nanášecí barva 6x DNA Loading Dye (ThermoFisher SCIENTIFIC, Cat. No. R0621) standard molekulové hmotnosti O'GeneRuler<sup>TM</sup> 100 bp Plus DNA Ladder (ThermoFisher SCIENTIFIC, Cat. No. SM1153)
- sterilní ddH<sub>2</sub>O



#### 3.4.3.4. RT-qPCR

- Power SYBR® Green RNA-to-C<sub>T</sub><sup>™</sup> 1-Step Kit (ThermoFisher SCIENTIFIC, Cat. No. 4391178)
- reverzní primer (výrobce např. SIGMA ALDRICH)
- vedoucí primer (výrobce např. SIGMA ALDRICH)
- sterilní ddH<sub>2</sub>O

#### 3.4.4. PRACOVNÍ POSTUPY

##### 3.4.4.1. IZOLACE CELKOVÉ RNA „SILIKA“ (Rott a Jelkmann, 2001)

Níže uvedená izolační technika je vhodná metoda extrakce celkové RNA, jak pro klasickou metodu RT-PCR, tak pro metodu RT-qPCR.

- 1) Navážka rostlinného materiálu (100 mg) je převedena do třecí misky a za pomoci tekutého dusíku rozdrčena na drobný prášek.
- 2) Po odpaření dusíku je přidáno 1000 µl grinding pufu, do něhož je před použitím přidán 2% metabisulfát sodný. Vzniklý homogenát je převeden do mikrozkušavky a centrifugován (6000 RPM, 3 min, 4 °C).
- 3) Do nové mikrozkušavky je převedeno 500 µl supernatantu a k němu je přidáno 100 µl 10% N-lauronyl-sarkosinu. Vzorek je inkubován 10 min při teplotě 70 °C a v průběhu inkubace je každé 3 min promícháván na třepačce. Poté je inkubován 5 min na ledu a následuje centrifugace (13000 RPM, 10 min, 4 °C).
- 4) Do nové mikrozkušavky je převedeno 300 µl supernatantu a ke vzorku je přidáno 150 µl chlazeného absolutního etanolu, 300 µl roztoku jodidu sodného a 30 µl silika suspenze. Vzorek je umístěn na horizontální třepačku (600 RPM), kde je inkubován 10 min při laboratorní teplotě a následně centrifugován (6000 RPM, 1 min, 4 °C).
- 5) Poté je supernatant odlit a peleta je promyta 500 µl promývacího pufu, tento krok se jednou opakuje.
- 6) Po odstranění supernatantu je mikrozkušavka s otevřeným víčkem inkubována při laboratorní teplotě zhruba 10 min. Peleta je poté rozpuštěna ve 150 µl sterilní ddH<sub>2</sub>O a následuje inkubace při 70 °C po dobu 4 min a další centrifugace (13000 RPM, 3 min, 4 °C).
- 7) 120 µl supernatantu je převedeno do nové mikrozkušavky. Takto získaný vzorek lze uskladnit v mrazicím boxu při -24 °C nebo ho lze použít pro další analýzy. Opakované zmrazování a rozmrazování RNA způsobuje její postupnou degradaci, proto je vhodné

každý vzorek RNA před uskladněním rozpipetovat do menších objemů, které se mohou postupně využívat v pozdějších analýzách.

#### 3.4.4.2. STANOVENÍ KONCENTRACE A ČISTOTY CELKOVÉ RNA

Po izolaci nukleových kyselin je nutné změřit množství celkové RNA. Koncentrace RNA se určuje spektrofotometricky při vlnové délce 260 nm ( $A_{260} = 1$  koncentrace celkové RNA je 40  $\mu\text{g/ml}$ ).

Kvalita RNA je odvozená také pomocí spektrofotometrie, a to poměrem hodnot absorbance  $A_{260}/A_{280}$ , kdy se doporučená hodnota pohybuje v intervalu 1,6 - 2,0. Pokud jsou naměřené hodnoty mimo doporučené rozmezí, došlo zřejmě při izolaci k neúplné degradaci rostlinných proteinů, či ke kontaminaci vzorku etanolem, fenolem či jinými nežádoucími látkami.

Dalším rizikem izolace celkové RNA je přítomnost takových látek ve vzorku, které nejsou spektrofotometricky detekovatelné, ale také mohou inhibovat navazující enzymatické reakce (RT, PCR, qPCR). Přítomnost těchto inhibitorů je možné odhalit pomocí amplifikace rostlinné messengerové RNA (mRNA) ve vzorku dle protokolu navrženého Menzel *et al.* (2002). Jedná se o amplifikaci rostlinné mRNA, která je v rostlinných vzorcích vždy přítomna (OBRÁZEK 1). Pokud tedy po analýze RT-PCR s specifickými primery NAD/NAD nejsou žádné PCR produkty přítomné, výchozí celková RNA není v pořádku a celá analýza se musí zopakovat. Pracovní postup je totožný s detekcí virů pomocí RT-PCR (kapitola 3.4.4. Pracovní postup: RT-PCR).

#### 3.4.4.3. RT-PCR

Při analýze RT-PCR je pracovní postup rozdělen do tří základních kroků, které je od sebe možné časově oddělit. Jedná se o reverzní transkripci, samotnou polymerázovou řetězovou reakci a elektroforetickou separaci NK na agarózovém horizontálním gelu.

#### REVERZNÍ TRANSKRIPCE (RT)

Během reverzní transkripce vzorky celkové RNA i jednotlivé používané chemikálie uchovávají na ledu. Před jejich použitím do reakcí jsou vzorky promíchány na třepačce a stočeny v mikrocentrifúze.

- 1) Reakce probíhá v reakčním objemu 50  $\mu\text{l}$ . Nejprve je připraven premix o objemu 30  $\mu\text{l}$ , který obsahuje:

- X  $\mu\text{l}$  sterilní ddH<sub>2</sub>O
  - 0,5  $\mu\text{l}$  náhodný primer (finální koncentrace 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )\*
  - přibližně 750 ng celkové RNA.
- 2) Vzorek je 5 min inkubován při 100 °C a poté 2 min ponechán na ledu.
- 3) Následně je k premixu přidáno:
- 10  $\mu\text{l}$  5x First Strand Buffer
  - 4,8  $\mu\text{l}$  sterilní ddH<sub>2</sub>O
  - 2,5  $\mu\text{l}$  každého dNTP (finální koncentrace 0,5 mM)
  - 2,0  $\mu\text{l}$  DTT (finální koncentrace 4 mM)
  - 0,7  $\mu\text{l}$  M-MuLV Reverse Transcriptase (finální koncentrace 40 U/ $\mu\text{l}$ ).
- 4) Mikrozkušavka je ponechána ve 42 °C po dobu 55 min a poté je inkubována při 70 °C 10 min.
- 5) Takto získaná cDNA je následně použita jako templát pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR) nebo může být uchovávána při -21 °C.

\*Využití náhodných primerů během reverzní transkripce nám umožňuje použít následně přepsané vzorky cDNA pro detekci nejen všech čtyř testovaných virů, ale i rostlinné mRNA. Proto jejich využití doporučujeme!

#### POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)

Během PCR vzorky cDNA i jednotlivé používané chemikálie uchovávány na ledu. Před jejich použitím do reakcí jsou vzorky promíchány na třepačce a stočeny v mikrocentrifúze. Vzorky, negativní i pozitivní kontrola jsou pipetovány v dupletech.

Samotná reakce PCR probíhá v celkovém objemu 25  $\mu\text{l}$ . PCR mix obsahuje:

- 18,05  $\mu\text{l}$  sterilní ddH<sub>2</sub>O
- 2,5  $\mu\text{l}$  10x Dream Taq buffer
- 0,25  $\mu\text{l}$  dNTP (finální koncentrace 0,1 mM)
- 0,5  $\mu\text{l}$  reverzního primeru (finální koncentrace 0,2  $\mu\text{M}$ ) (TABULKA 2)
- 0,5  $\mu\text{l}$  vedoucí primeru (finální koncentrace 0,2  $\mu\text{M}$ ) (TABULKA 2)
- 0,2  $\mu\text{l}$  DreamTaq™ DNA Polymerase (finální koncentrace 0,04 U/ $\mu\text{l}$ )
- 3  $\mu\text{l}$  cDNA vzorku.

Podmínky během amplifikace jsou následující:

- |                        |        |        |           |
|------------------------|--------|--------|-----------|
| ▪ počáteční denaturace | 94 °C  | 2 min  | } 35 krát |
| ▪ denaturace           | 94 °C  | 30 s   |           |
| ▪ nasedání primerů     | XX °C* | 30 s   |           |
| ▪ extenze              | 72 °C  | 1 min  |           |
| ▪ konečná extenze      | 72 °C  | 7 min. |           |

\* Teplota nasedání primerů je pro jednotlivé viry různá a je podrobně uvedena v TABULCE 2.

#### ELEKTROFORETICKOU SEPARACI NK NA AGARÓZOVÉM GELU

- 1) Separace PCR produktů je provedena s využitím soupravy pro horizontální elektroforézu. Nejdříve je v mikrovlnné troubě rozvařena 1% agaróza v TBE pufru. Po jejím ochlazení na teplotu přibližně 60 °C je do agarózy přidán roztok etidium bromidu (finální koncentrace 0,5 µl/ml). Gel je přelit do elektroforetické formy, do níž je vložen hřeben pro vytváření jamek a je ponechán přibližně 30 min při laboratorní teplotě ztuhnout.
- 2) Následně je forma s gelem umístěna do elektroforetické cely a převrstvena TBE pufrem. Hřeben je opatrně vyjmut a do první a poslední jamky se nanáší 5 µl standardu molekulové hmotnosti. Do zbylých jamek je převedeno 10 µl PCR produktu smíchaného s 2 µl nanášecího barviva.
- 3) Poté je spuštěna elektroforetická separace nukleových kyselin při intenzitě elektrického napětí zhruba 5 V/cm. Separace trvá přibližně 45 minut. Po jejím ukončení jsou fragmenty vizualizovány na UV transiluminátoru při vlnové délce 260 nm. Výsledné elektroforeogramy jsou dokumentovány automatickým dokumentačním a analytickým systémem.

#### 3.4.4.4. RT-qPCR

V případě analýzy kvantitativní RT-PCR nelze fázi reverzní transkripce a kvantitativní polymerázové reakce detekce, na rozdíl od předešlé detekční techniky, časově ani prostorově oddělit. V rámci metody odpadá potřeba elektroforetické separace nukleových kyselin, reakce je vyhodnocována v průběhu celého procesu pomocí specializovaného termocykléru.

Během RT-qPCR vzorky celkové RNA i jednotlivé používané chemikálie uchovávány na ledu. Před jejich použitím do reakcí jsou vzorky promíchány na třepače a stočeny v mikrocentrifúze. Vzorky, negativní i pozitivní kontrola jsou pipetovány v dupletech.

Samotná reakce v konečném objemu 10  $\mu$ l má toto složení:

- 3,32  $\mu$ l sterilní ddH<sub>2</sub>O
- 5  $\mu$ l 2x Power SYBR<sup>®</sup> Green RT-PCR Mix
- 0,3  $\mu$ l vedoucího primeru (finální koncentrace 0,3  $\mu$ M) (TABULKA 3)
- 0,3  $\mu$ l reverzního primeru (finální koncentrace 0,3  $\mu$ M) (TABULKA 3)
- 0,08  $\mu$ l 125x RT Enzym Mix
- 1  $\mu$ l celkové RNA (100 ng/ $\mu$ l)

Podmínky během reverzní transkripce a amplifikace jsou následující:

- reverzní transkripce 48 °C 30 min
- aktivace polymerázy 95 °C 10 min
- denaturace 95 °C 15 s
- nasedání primerů a extenze 60 °C 1 min } 35 X

Na konci reakce probíhá stanovení křivky tání v opakujícím se cyklu při těchto podmínkách:

- denaturace 95 °C 15 s
- nasedání primerů od 60 do 95 °C.

### 3.4.5. VYHODNOCENÍ TESTU

#### 3.4.5.1. RT-PCR

Vyhodnocení reakce je založeno na přítomnosti či absenci fluorescenčního signálu na výsledném elektroforeogramu po ozáření UV transiluminátorem. V případě pozitivní reakce by měl být signál dostatečně intenzivní a velikostně specifický (velikost signálu je dána velikostí amplifikovaného produktu). V případě detekce ApMV musí být na elektroforeogramu patrný band o velikosti 464 bp, při detekci ASGV je band dlouhý 499 bp, u ASPV je velikost PCR produktu přibližně 264 bp a v případě ACLSV 432 bp (TABULKA 2, OBRÁZEK 2).

Aby byla zajištěna dostatečná spolehlivost jednotlivých testů, doporučujeme, aby byly vzorky testovány v dupletech, a aby ke každé reakci byla přiřazena negativní a pozitivní kontrola. Jako pozitivní kontrolu používáme již dříve ověřený vzorek cDNA získaný

z infikované rostliny daným virem, jako negativní kontrola slouží sterilní ddH<sub>2</sub>O a dále vzorek získaný z viru-prosté rostliny.

Jelikož je citlivost metody RT-PCR vysoká, je nutné dbát se zvýšenou opatrností na čistotu pracovního prostředí a všech použitých roztoků. Dále doporučujeme v laboratoři využívat několik sad pipet určených vždy pouze pro konkrétní potřeby (jedna sada pipet by měla sloužit pouze pro práci se vzorky izolované RNA či cDNA, další sada pipet by měla být používána pouze pro pipetování zásobních roztoků chemikálií a poslední sada pipet pro manipulaci pouze s PCR produkty). Velmi se osvědčila práce spojená s přípravou roztoků pro RT a PCR v laminárním flowboxu, tedy uzavřeném boxu, který se před každou prací sterilizuje pomocí UV záření.

#### 3.4.5.2. RT-qPCR

Vyhodnocení reakce je založeno na detekci hladiny fluorescence substrátu navázaného na DNA, což odráží množství DNA přítomné v jednotlivých cyklech, a tím i množství výchozího templátu DNA, respektive RNA. Výsledkem je rozlišení pozitivních a negativních vzorků podle toho, zda je speciálním softwarem zaznamenána přítomnost vyzářené fluorescence (OBRÁZEK 2, 3 a 4).

Aby byla zajištěna dostatečná spolehlivost jednotlivých testů, doporučujeme, aby byly vzorky testovány v dupletech, a aby ke každé reakci byla přiřazena negativní a pozitivní kontrola. Jako pozitivní kontrolu používáme již dříve ověřený vzorek získaný z infikované rostliny daným virem, jako negativní kontrola slouží sterilní ddH<sub>2</sub>O a dále vzorek získaný z viru-prosté rostliny.

Jelikož je citlivost této metody velmi vysoká, je opět nutné dbát se zvýšenou opatrností na čistotu pracovního prostředí a všech použitých roztoků. Proto opět doporučujeme v laboratoři využívat několik sad pipet určených vždy pouze pro speciální potřeby (stejný postup rozdělení jako v případě RT-PCR). Dále je zde téměř nutností provádět analýzy v laminárním boxu.

## 4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Jednotná metodika shrnující moderní molekulární diagnostické metody pro determinaci významných virů jabloní u nás zatím nebyla vydána. Tato metodika shrnuje několik diagnostických technik a zároveň porovnává jejich spolehlivost na základě termínu odběru

vzorků a typu odebraného rostlinného materiálu. Z tohoto hlediska lze tuto metodiku považovat za novou.

V případě virových chorob je jedinou účinnou ochranou prevence. Pro certifikaci je stále nutné použití testů s indikátorovými rostlinami. To je však velice náročné na čas i prostor. Využití sérologických a molekulárních metod případně jejich kombinace umožňuje snížit počet potenciálních matečních rostlin, které se jeví jako viru-prosté, a tím se snižuje i prostorová a časová náročnost při samotné certifikaci.

## **5. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY**

Metodika je určena především pro specializované laboratoře zabývající se diagnostikou virových patogenů rostlin, a to nejen pro účely dalšího výzkumu, ale i pro praxi. Prostřednictvím laboratoří zaměřených do praxe budou výsledky metodiky využívat i jednotliví ovocnáři. Dalšími uživateli mohou být univerzity a případně střední školy, které mohou popsané diagnostické postupy zařadit do svých cvičení v předmětech zabývajících se chorobami rostlin a diagnostikou jejich původců.

Metodika bude volně dostupná v tištěné podobě, ale především také na webové stránce České zemědělské univerzity v Praze ([www.czu.cz](http://www.czu.cz)).

## **6. EKONOMICKÉ ASPEKTY**

### **6.1. NÁKLADY NA ZAVEDENÍ METODIKY**

Pro laboratoř etablovanou v použití molekulárních metod nepředstavuje převzetí popsaných postupů žádné vícenáklady (investice), protože se zde využívá běžného zařízení, kterým je laboratoř už vybavena (automatické pipety, váhy, chlazené centrifugy, lednice a mrazáky, elektroforéza, termocyklery). Veškeré náklady na zavedení metodiky zde budou směřovat pouze na spotřební materiál.

Pokud by se jednalo o laboratoř, která se teprve chce vybavit, je třeba počítat s náklady dosahujícími obvykle minimálně stovek tisíc s možným přesahem až přes milion Kč v závislosti na požadované úrovni vybavení, která by měla vyplývat z předpokládaného počtu analýz.

### **6.2. PŘÍNOSY ZAVEDENÍ METODIKY**

Ekonomické přínosy zavedení této metodiky lze najít na několika úrovních:

## A) DIAGNOSTICKÁ LABORATOŘ

- snížení materiálových nákladů na adaptaci molekulárních metod v porovnání se zaváděním vlastního postupu s jeho odzkoušením, i když je samozřejmě nutné zvolenou metodu vyzkoušet a ověřit v podmínkách dané laboratoře. Tuto úsporu lze u klasické PCR odhadovat řádově na 5–10 tis. Kč na každý virus. U qPCR (kvantitativní PCR) budou tyto úspory ještě vyšší, odhadem okolo 15 tis. Kč na virus.
- snížení spotřeby pracovního času personálu laboratoře na adaptaci nového postupu. Tuto úsporu lze odhadovat v poměrně širokém rozmezí několika pracovních člověkodnů (hledání a porovnávání postupů popsanych v literatuře, výběr vhodných primerů a jejich testování *in silico*, optimalizace koncentrací jednotlivých složek reakcí a teplot atd.). U qPCR je optimalizace reakcí časově ještě daleko náročnější. Finančně lze tuto úsporu odhadnout na 10–20 tis. Kč na každý virus.

## B) KONCOVÍ UŽIVATELÉ VÝSLEDKŮ DIAGNOSTICKÉ ČINNOSTI

U koncových uživatelů výsledků diagnostické činnosti (při ozdravování materiálu, uznávání sadby, u školkařů a pěstitelů) nelze přínosy přesně kvantifikovat, neboť nemáme k dispozici odpovídající data o nákladech na jednotlivé činnosti či výši ztrát u infikovaných stromů. Všeobecně lze konstatovat, že:

- oproti biologickému testování zdravotního stavu množitelského materiálu dochází ke značné úspoře času (hodiny či maximálně dny proti měsícům až letům u indexace) a prostoru.
- testování ozdraveného materiálu citlivými metodami umožní efektivnější výběr skutečně zdravého materiálu, čímž se ušetří náklady na delší vedení těch rostlin, u kterých méně citlivé metody infekci včas neprokážou.
- podle našich zkušeností mají školkaři zájem na tom, aby prodávali zdravou sadbu, a to i v případě starých odrůd, které se nyní stávají trochu módní záležitostí jak u zahrádkářů, tak i při revitalizaci starých sadů, která nyní probíhá třeba v Praze.
- i když se ekonomický efekt infekce obtížně kvantifikuje i u pěstitelů, také oni mají zájem získat zdravý rostlinný materiál vzhledem k potenciálním ztrátám na výnosu i kvalitě, ke kterým v důsledku virových infekcí může docházet buď přímo, nebo při interakcích s dalšími patogeny a nepříznivými vlivy prostředí.



## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Alrefai, R. H., Shiel, P. J., Domier, L. L., D'Arcy, C. J., Berger, P. H., Korban, S. S. 1994. The nucleotide sequence of *Apple mosaic virus* coat protein gene has no similarity with other *Bromoviridae* coat protein genes. *Journal of General Virology* 75. 2847–2850.
- Anonym 1. 2003. *Crop Protection Compendium*. 2003. CAB International 2003; Wallingford, Oxon, UK.
- Anonym 2. 1991. European and Mediterranean Plant Protection Organization, 1991. Certification schemes virus-free or virus-tested fruit trees and rootstocks. *EPPO Bulletin* 2. 267–277 p.
- Anonym 3. 1999. European and Mediterranean Plant Protection Organization, 1999. Certification schemes – pathogen-tested material of *Malus*, *Pyrus* and *Cydonia*. *EPPO Bulletin* 29. 239-252.
- Anonym 4. 2014. International Committee on Taxonomy of Viruses [online - 2014]. Dostupné z: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
- Bol, J. F. 1999. *Alfalfa mosaic virus* and *Iilarviruses*: involvement of coat protein in multiple steps of the replication cycle. *Journal of General Virology* 80. 1089-1102.
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J., Watson, L., Zurcher, E. J. 1996. Plant viruses online: Descriptions and lists from VIDE Database. Dostupné z: <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>.
- Cameron H.R. and M. Thompson, 1986. Seed transmission of *Apple mosaic virus* in hazelnut. *Acta Horticulturae* 193, 131-132.
- Candresse, T., Lanneau, M., Revers, M., Grasseau, N., Macquaire, G., German, S., Malinowski, S., Dunez, J. 1995. An immunocapture PCR assay adapted to the detection and the analysis of the molecular variability of the *Apple chlorotic leafspot virus*. *Acta Horticulture* 386. 136-147.
- Candresse, T., Kofalvi, S., Lanneau, M., Dunez, J. 1998. A PCR-ELISA procedure for simultaneous detection and identification of *Prunus necrotic ringspot* (PNRSV) and *Apple mosaic* (ApMV) *ilarviruses*. *Acta Horticulture* 472. 219-226.
- Clark, M. F., Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the plant viruses. *Journal of General Virology* 34. 475-483.

- Clover, G. R. G., Pearson, M., N., Elliot, D. R., Tang, Z., Smales, T. E., Alexander, B. J. R. 2003. Characterization of a strain of *Apple stem grooving virus* in *Actinidia chinensis* from China. *Plant Pathology* 52. 371-378.
- Cropley, R., Wolfswinkel, L. D., Posnette, A. F. 1963. The identification of some viruses infecting apple, pear and quince. *Phytopathologica Mediterranea* 2. 132-136 p.
- Cropley, R., Posnette, A.F. 1973. The effect of viruses on growth and cropping of pear trees. *Annals of Applied Biology* 73. 39-43.
- Crossley, S. J., Jacobi, V., Adams, A. N. 1998. IC-PCR amplification of *Apple stem grooving virus* isolates and comparison of polymerase and coat protein gene sequences. *Acta Horticulture* 272. 113-118.
- Desvignes, J. C., Boye, R. 1988. Different diseases caused by the *Chlorotic leaf spot virus* on the fruit trees. *Acta Horticulture* 235. 31-38.
- Desvignes, J. C. 1999. Maladies a virus de arbes fruitiers. CTIFL.
- Desvignes, J. C., Boyé, R., Cornaggia, D., Grasseau, N. 1999. Virus diseases of fruit trees. Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes, Paris.
- Dhingra, K. L. 1972. Transmission of *Apple mosaic virus* by natural root grafting. *Indian Journal of Horticulture* 29. 348–350.
- Fulton R. W. 1967. Purification and serology of *Rose mosaic virus*. *Phytopathology* 57. 1197–1201.
- Fulton, R. W. 1972. *Apple mosaic virus*. CMI/AAB Descriptions of plant viruses 83, UK.
- Giunchedi, L. 2003. Malattie da Virus, Viroidi e Fitoplasmi degli alberi di frutto. Edizione Agricole, Bologna, Italy.
- Gotlieb, A. R., Berbee, J. G. 1973. Line pattern of birch caused by *Apple mosaic virus*. *Phytopathology* 63. 1470-1477.
- Hassan, M., Myrta, A., Polak, J. 2006. Simultaneous detection and identification of four pome fruit viruses by one-tube pentaplex RT-PCR. *Journal of Virology Methods* 133. 124-129.
- Hunter, J. A., Chamberlain, E. E., Atkinson, J. D. 1958. Note on the transmission of *Apple mosaic virus* by natural root grafting. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 1. 80-82.
- Inouye, N., Maeda, T., Mitsuata, K. 1979. *Citrus tatter leaf virus* isolated from Lily. *Annals of Phytopathologica Society Japonica* 42. 712-720.
- James, D. 1998. Factor affecting the detection of *Apple stem grooving virus* by PCR analysis. *Acta Horticulture* 472. 119-124.

- James, D. 1999. A simple and reliable protocol for the detection of *Apple stem grooving virus* by RT-PCR and in a multiplex PCR assay. *Journal of Virology Methods* 83. 1-9.
- Jelkmann, W. 1994. Nucleotide sequences of *Apple stem pitting virus* and of the coat protein gene of a similar virus from pear associated with vein yellows disease and their relationship with potex- and carlaviruses. *Journal of General Virology* 75. 1535-1542.
- Jelkmann, W., Keim-Konrad, R. 1997. An immunocapture polymerase chain reaction and plate trapped ELISA for the detection of *Apple stem pitting virus*. *Journal of Phytopathology* 145. 499-504.
- Jelkmann, W., Paunovic, S. 2011. *Apple stem pitting virus* in Pome Fruits. 8th chapter in *Virus and Virus-like diseases of Pome and Stone fruits*. Ed. Hadidi, A., Barba, M., Candresse, T., Jelkmann, W. ISBN – 978-0-89054-396-2. 35-40.
- Kinard, G. R., Scott, S. W., Barnett, O. W. 1996 Detection of *Apple chlorotic leaf spot* and *Apple stem grooving viruses* using RT-PCR. *Plant Diseases* 80. 616-621.
- Kirby, M.J., Guise, C.M., Adams, A.N. 2001. Comparison of bioassays and laboratory assays for *Apple stem grooving virus*. *Journal of Virology Methods* 93.167-173.
- Koganezawa, H., Yanase, H. 1990. A new type of elongated virus isolated from apple trees containing the stem pitting agent. *Plant Diseases* 74. 610-614.
- Kundu, J. K. 2003. The occurrence of *Apple stem pitting virus* and *Apple stem grooving virus* within field-grown apple cultivars evaluated by RT-PCR. *Plant Protection Science* 39 (3). 88-92.
- Kundu, J. K., Svoboda, J., Polák, J. 2003. Detection of *Apple stem grooving virus* from different tissues of apple trees throughout the year. *Plant Protection Science* 39. 93-96.
- Lister, R. M. 1970. *Apple stem grooving virus*. CMI/AAB Description of plant viruses No. 31. Commonwealth Agriculture Bureaux Kew.
- Lister, R. M., Bar-Joseph, M. 1981. *Closteroviruses*. In: *Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis*, Ed: E. Kurstak. Elsevier/North- Holland, Biomedical Press, Amsterdam. 809.
- Lovisol, O., Accotto, G. P., Masenga, V., Colariccio, A. 2003. An isolate of *Apple stem grooving virus* associated with Cleopatra mandarin fruit intumescence. *Fitopatologia Brasileira* 28. 54-58.
- Malinowski, T., Komorowska, B., Golis, T., Zawadzka, B. 1998. Detection of *Apple stem pitting virus* and *Pear vein yellows virus* using reverse transcription-polymerase chain reaction. *Acta Horticulture* 472. 87-95.

- Menzel W., Jelkmann W., Maiss E. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods* 99. 81-92.
- Mink, G. I. 1989. *Apple mosaic virus*. In: *Virus and virus like diseases of pome fruits and simulating noninfectious disorders*. Ed. P. R. Fridlund. Pullman: Cooperative extension college of agriculture and home economics, Washington state university. 34-39.
- Myrta, A., Di Terlizzi, B., Savino, V., Martelli, G. P. 2003. Virus diseases affecting the Mediterranean stone fruit industry: a decade of surveys. In: *Virus and Virus-like Diseases of Stone Fruits, with Particular Reference to the Mediterranean Regions*. Ed. Myrta, A., Di Terlizzi, B., Savino, V. *Options Mediterranean Serie B*, 45, CIHEAM. 15-23.
- Nemchinov, L., Hadidi, A., Candresse, T., Foster, J. A., Verderevskaya, T. 1995. Sensitive detection of *Apple chlorotic leaf spot virus* from infected apple or peach tissue using RT-PCR, IC-RT-PCR or multiplex IC-RT-PCR. *Acta Horticulture* 386. 51-62.
- Neméth, M. 1986. *Viruses, mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees*. Norwell, MA, USA: Kluwer academic publishers.
- Nickel, O., Targon, M. L. P. N., Fajardo, T. V. M., Machado, M. A., Trivilin, A. P. 2004. Polyclonal antibodies to the coat protein of *Apple stem grooving virus* expressed in *Escherichia coli*: production and use in immunodiagnosis. *Fitopatologia Brasileira* 29. 558-562.
- Paunovic, S., Jevremovic, D. 2004. *Apple stem pitting virus* detection from dormant pome fruits by RT-PCR. *Acta Horticulture* 657. 45-49.
- Paunovic, S., Pasquini, G., Barba, M. 2011. *Apple mosaic virus* in Stone Fruits. 18th chapter in *Virus and Virus-like diseases of Pome and Stone fruits*. Ed. Hadidi, A., Barba, M., Candresse, T., Jelkmann, W. ISBN – 978-0-89054-396-2. 91-95.
- Pethybridge, S. J., Wilson, C. R., Hay, F. S., Leggett, G. W., Sherriff, L. J. 2002. Mechanical transmission of *Apple mosaic virus* in Australian hop (*Humulus lupulus*) gardens. *Annals of Applied Biology* 141. 77–85.
- Polák, J., Zieglerová, J., Bouma, J. 1997. Diagnosis and distribution of *Apple chlorotic leafspot virus* in pome fruits in the Czech Republic. *Horticulture Science (Prague)* 24. 89-94.
- Polák, J., Zieglerová, J. 2001. Distribution of *Apple stem grooving virus* in apple trees in the Czech Republic. *Plant Protection Science* 37. 1-4 p.

- Ribicki, E. P. 1995. The *Bromoviridae*. Virus taxonomy. Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses. 450–457.
- Rowhani, A., Maningas, M. A., Lile, L. S., Daubert, S. D., Golino, D. A. 1995. Development of a detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions. *Phytopathology* 85. 347-352.
- Saade, M., Aparicio, F., Sanchez-Navarro, J. A., Herranz, M. C., Myrta, A., Di Terlizzi, B., Pallas, V. 2000. Simultaneous detection of the three *Ilarviruses* affecting stone fruit trees by nonisotopic molecular hybridization and multiplex reverse-transcription polymerase chain reaction. *Phytopathology* 90. 1330-1336.
- Sánchez-Navarro, J. A., Pallás, V. 1994. Nucleotide sequence of *Apple mosaic ilarvirus* RNA 4. *Journal of General Virology* 75. 1441–1445.
- Sawamura, K., Yamashita, K., Aria, K. 1988. An *Apple stem grooving strain* isolated from European pear (*Pyrus communis*). *Bulletin of Faculty of Agriculture, Hirosaki University*. 50. 22–26.
- Shiel, P. J., Berger, P. H. 2000. The complete nucleotide sequence of *Apple mosaic virus* (ApMV) RNA 1 a RNA 2: ApMV is more closely related to *Alfalfa mosaic virus* than other *Ilarviruses*. *Journal of General Virology* 81. 273–278.
- Spiegel, S., Thompson, D., Varga, A., Rosner, A., James, D. 2005. An *Apple chlorotic leaf spot virus* isolate from ornamental dwarf flowering almond (*Prunus glandulosa* ‘Sinensis’): detection and characterization. *Horticulture Science* 40. 1401–1404.
- Svoboda, J., Polák, J. 2010: Metodika diagnostiky ApMV, ACLSV a ASGV v odrůdách a podnožích jabloně a hrušně pomocí ELISA. Certifikovaná metodika pro praxi. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. ISBN: 978-80-7427-057-4. 25.
- Sweet, J. B. 1980. Fruit tree virus infections of woody exotic and indigenous plants in Britain. *Acta Phytopathologica* 15. 231-238.
- Takahashi, T., Saito, N., Goto, M., Kawai, M. 1990. *Apple stem grooving virus* isolated from Japanese apricot (*Prunus mume*) imported from China. *Res. Bulletin of Plant Protection Series Japonica*. 26. 15–21.
- Tang, J., Olson, J. D., Ochoa-Corona, F. M., Clover, G. R. G. 2010. *Nandina domestica*, a new host of *Apple stem grooving virus* and *Alternanthera mosaic virus*. *Australasian Plant Disease Notes* 5. 25–27.

- Thokchom, T., Rana, T., Hallan, V., Ram, R. R., Zaidi, A. A. 2009. Molecular characterization of the Indian strain of *Apple mosaic virus* isolated from apple (*Malus domestica*). *Phytoparasitica* 37. 375–379.
- Thomsen, A. 1975. Crop reduction in pear trees caused by virus infection. *Acta Horticulture* 44. 119-122.
- Van der Meer, F. A. 1976. Observation on *Apple stem grooving virus*. *Acta Horticulture* 67. 293-304.
- Voller, A., Bartvertt, A., Bidwell, D. E., Clark, M. F., Adams, A. N. 1976: The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of General Virology* 33. 165-167.
- Yanase, H. 1974. Studies on apple latent viruses in Japan. *Bulletin of Fruit Tree Research Station, Japan, Serie C.* 47-109.
- Yanase, H., Yamaguchi, A., Mink, G. I., Sawamura, K. 1979. Back transmission of *Apple chlorotic leaf spot virus* (type strain) to apple, and production of apple topworking disease symptoms in Maruba kaido (*Malus prunifolia* Borkh. var. *ringo* Asami). *Annals of Phytopathological Society of Japan* 45. 369-374.
- Yoshikawa, N., Takahashi, T. 1988. Properties of RNAs and proteins of *Apple stem grooving* and *Apple chlorotic leaf spot viruses*. *Journal of General Virology* 69. 241-245 p.
- Yoshikawa, N., Sasaki, E., Kato, M., Takahashi, T. 1992. The nucleotide sequence of *Apple stem grooving capillovirus* genome. *Virology* 191. 98-105.
- Winkowska L., Grimová L., Ryšánek P. 2016: Quantitative detection of four pome fruit viruses in apple trees throughout the year. *Phytopathologia Mediterranea* 55. 207-224.

## **8. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE**

- Grimová L., Winkowska L., Ryšánek P. 2016: *Apple mosaic virus*. *Phytopathologia Mediterranea* 55. 1-19.
- Grimová L., Winkowska L., Ryšánek P., Svoboda P., Petrzik K., 2013: Reflects the coat protein variability of apple mosaic virus host preference? *Virus Genes* 47. 119-125.
- Grimová L., Winkowska L., Zíka L., Ryšánek P.: Distribution of viruses in old commercial and abandoned orchards and wild apple trees. *Journal of Plant Pathology* (přijato do tisku).
- Winkowska L. 2016: Diagnostika významných virů jableň. Disertační práce, ČZU v Praze, 127 s.

Winkowska L., Grimová L., Ryšánek P., 2013: Virus mozaiky jabloně. *Zahradnictví* 11. 14-17.

Winkowska L., Grimová L., Ryšánek P.; 2014: Seasonal changes in the concentration of *Apple mosaic virus* in apple trees. Sborník abstraktů na konferenci 11<sup>th</sup> European Foundation of Plant Pathology; Krakow, Poland; s. 224.

Winkowska L., Grimová L., Ryšánek P.; 2016: Quantitative detection of four pome fruit viruses in apple trees throughout the year. *Phytopathologia Mediterranea* 55. 207-224.

Winkowska L., Grimová L., Ryšánek P.; 2016: Occurrence of several viruses infecting wild growing stone fruit trees in Central Bohemia. *Scientia Agriculturae Bohemica* (přijato do tisku).

## 8. PŘÍLOHY

TABULKA 1. Srovnání detekčních metod určených pro testování přítomnosti ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV v rostlinném pletivu jabloní v průběhu roku (Winkowska *et al.*, 2016).

			III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.	IX.	X.	XI.	XII.	
ApMV	DASI-ELISA RT-PCR RT-qPCR	PU	+										
			+										
			+										
	DASI-ELISA RT-PCR RT-qPCR	KV	N/A	+									
			N/A	+									
			N/A	+									
	DASI-ELISA RT-PCR RT-qPCR	LI	+	+	+	+	-	-	-	-			
			+	+	+	+	+	+	+	+			
			+	+	+	+	+	+	+	+			
	DASI-ELISA RT-PCR RT-qPCR	LÝ	-	N/A	N/A	+	N/A	N/A	-	N/A	N/A	N/A	-
			+	N/A	N/A	+	N/A	N/A	+	N/A	N/A	N/A	-
			+	N/A	N/A	+	N/A	N/A	+	N/A	N/A	N/A	+

			III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.	IX.	X.	XI.	XII.	
ASGV	DAS-ELISA RT-PCR RT-qPCR	PU	+										
			+										
			+										
	DASI-ELISA RT-PCR RT-qPCR	KV	N/A	-									
			N/A	+									
			N/A	+									
	DASI-ELISA RT-PCR RT-qPCR	LI	+	+	+	+	-	-	-	-			
			+	+	+	+	+	+	+	+			
			+	+	+	+	+	+	+	+			
	DASI-ELISA RT-PCR RT-qPCR	LÝ	+	N/A	N/A	-	N/A	N/A	-	N/A	N/A	N/A	-
			+	N/A	N/A	+	N/A	N/A	+	N/A	N/A	N/A	+
			+	N/A	N/A	+	N/A	N/A	+	N/A	N/A	N/A	+

(PU): pupeny, (KV): květy, (LI): listy a (LÝ): lýko.

(+): spolehlivá detekce

(-): nespolehlivá detekce

N/A: nebylo testováno



TABULKA 1 pokračování. Srovnání detekčních metod určených pro testování přítomnosti ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV v rostlinném pletivu jabloní v průběhu roku (Winkowska *et al.*, 2016).

			III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.	IX.	X.	XI.	XII.	
ASPV	DAS-ELISA RT-PCR RT-qPCR	PU	+										
			+										
			+										
	DASI-ELISA RT-PCR RT-qPCR	KV	N/A	+									
			N/A	+									
			N/A	+									
	DAS-ELISA RT-PCR RT-qPCR	LI	+	+	+	+	+	+	+	+	-		
			+	+	+	+	+	+	+	+	+		
			+	+	+	+	+	+	+	+	+		
	DASI-ELISA RT-PCR RT-qPCR	LÝ	+	N/A	N/A	+	N/A	N/A	+	N/A	N/A	N/A	+
			+	N/A	N/A	+	N/A	N/A	+	N/A	N/A	N/A	+
			+	N/A	N/A	+	N/A	N/A	+	N/A	N/A	N/A	+

			III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.	IX.	X.	XI.	XII.	
ACLSV	DAS-ELISA RT-PCR RT-qPCR	PU	+										
			+										
			+										
	DASI-ELISA RT-PCR RT-qPCR	KV	N/A	+									
			N/A	+									
			N/A	+									
	DAS-ELISA RT-PCR RT-qPCR	LI	+	+	+	+	+	+	-	-			
			+	+	+	-	+	-	+	+			
			+	+	+	+	+	+	+	+			
	DASI-ELISA RT-PCR RT-qPCR	LÝ	-	N/A	N/A	+	N/A	N/A	+	N/A	N/A	N/A	+
			-	N/A	N/A	+	N/A	N/A	+	N/A	N/A	N/A	+
			+	N/A	N/A	+	N/A	N/A	+	N/A	N/A	N/A	+

(PU): pupeny, (KV): květy, (LI): listy a (LÝ): lýko.

(+): spolehlivá detekce

(-): nespolehlivá detekce

N/A: nebylo testováno

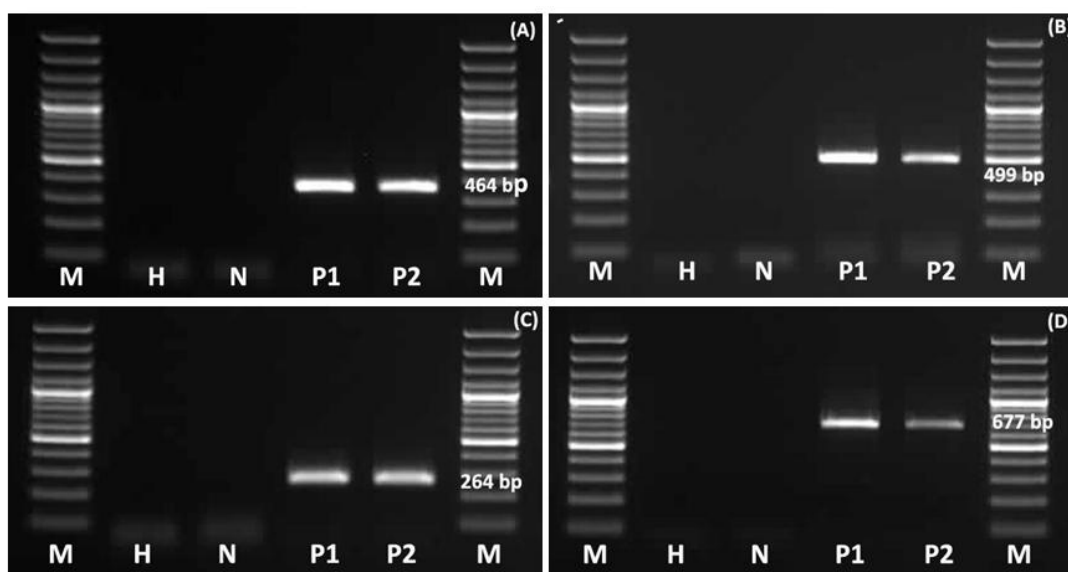
**TABULKA 2. Seznam primerů použitých pro detekci ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV pomocí RT-PCR.**

<b>Virus</b>	<b>Primer</b>	<b>Typ</b>	<b>Nukleotidová sekvence 5' → 3'</b>	<b>Ta</b>	<b>Délka produktu</b>	<b>Autor</b>
<b>ApMV</b>	161Z8	F	TCCTGAGCAGTCGAGAAGTG	58 °C	464 bp	Petrzik, unpublished
	161Z9	R	CGTTATCACGTACAAATCCCT			
<b>ASGV</b>	ASGVUs	F	CCCCTGTTGGATTTGATACACCTC	66 °C	499 bp	James, 1999
	ASGV2as	R	GGAATTTACACGACTCCTAACCCTCC			
<b>ASPV</b>	ASPCs	F	CTCTTGAACCAGCTGATGGC	60 °C	264 bp	Jelkmann a Keim- Konrad, 1997
	ASPas	R	ATAGCCGCCCGGTTAGGTT			
<b>ACLSV</b>	ACLSVs	F	TTCATGGAAAGACAGGGGCAA	58 °C	432 bp	Menzel <i>et al.</i> , 2002
	ACLSVas	R	AAGTCTACAGGCTATTTATTATAAGTCTAA			

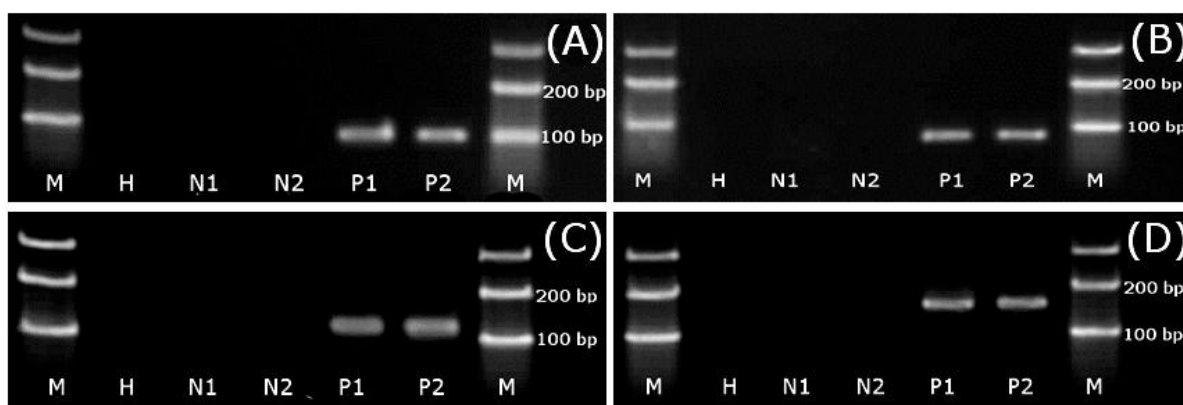
**TABULKA 3. Seznam primerů použitých pro detekci ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV pomocí kvantitativní RT-PCR (Winkowska *et al.*, 2016).**

<b>Virus</b>	<b>Primer</b>	<b>Typ</b>	<b>Nukleotidová sekvence 5' → 3'</b>	<b>Délka produktu</b>	<b>Pozice (nt)</b>
<b>ApMV</b>	ApMVXF1	F	CAAGCGAACCCGAATAAGG	87 bp	1231 – 1318 (NC_003480)
	ApMVXR1	R	CTAACCTCCCAAGCTGTCC		1300 – 1318 (NC_003480)
<b>ASGV</b>	ASGVF1	F	GGATTTAGGTCCCTCTCAGC	70 bp	5600-5619 (NC_001749)
	ASGVR1	R	CTTGTTGAAGCACGTCTTCC		5651-5670 (NC_001749)
<b>ASPV</b>	ASPVF3	F	GAACTGCGCAGAGGAAG	104 bp	77 – 94 (NC_003462)
	ASPVR3	R	CATGYTTGTCCTTCTCYAC		163 – 181 (NC_003462)
<b>ACLSV</b>	ACLSVF2	F	GAGGCTCTATTCACATCTTG	148 bp	5617 – 5636 (NC_001409)
	ACLSVR2	R	CATGYTTGTCCTTCTCYAC		5747 – 5765 (NC_001409)

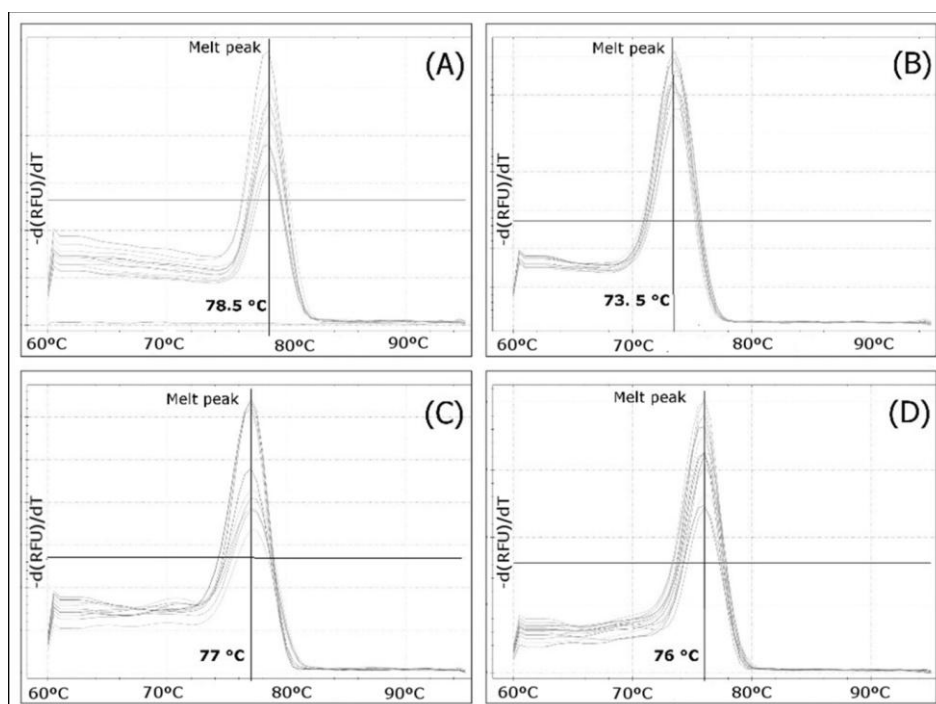
OBRÁZEK 1. Detekce ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV metodou RT-PCR s využitím primerů (A): 161Z8/161Z9 (464 bp); (B): ASGVUs/ASGV2as (499 bp); (C): ASPCs/ASPas (264 bp) a (D): ACLSVs/ACLVSas (677 bp). Elektroforeogramy RT-PCR produktů po separaci na agarózovém gelu barveným etidium bromidem. (M): DNA marker O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder; (H): negativní kontrola ddH<sub>2</sub>O; (N1): negativní kontrola získaná z viru-prosté jabloně; (P1) a (P2): RT-PCR produkty získané z infikovaných jabloní viry ApMV (A), ASGV (B), ASPV (C) a ACLSV (D).



**OBRÁZEK 2. Test specificity primerů navržených pro účely RT-qPCR pro detekci ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV.** Použité primery byly (A): ApMVXF1/ApMVXR1 (87 bp); (B): ASGVF1/ASGVR1 (70 bp); (C): ASPVF3/ASPVR3 (104 bp) a (D): ACLSVF2/ACLSVR2 (148 bp). (M): DNA marker O'RangeRuler 20 bp DNA Ladder; (H): negativní kontrola ddH<sub>2</sub>O; (N1): negativní kontrola získaná z viru-prosté jabloně; (N2): negativní kontrola získaná z viru-prosté hrušně; (P1) a (P2): RT-PCR produkty získané z ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV infikovaných jabloní. Agarózový gel barvený etidium bromidem.



**OBRÁZEK 3. Křivka tání produktů za využití SYBR Green I pro detekci ApMV (A), ASGV (B), ASPV (C) a ACLSV (D) pomocí RT-qPCR reakce.**



OBRÁZEK 4. Příklad výsledků reakce RT-qPCR s využitím primerů (A): ApMVXF1/ApMVXR1; (B): ASGVF1/ASGVR1; (C): ASPVF3/ASPVR3 a (D): ACLSVF2/ACLSVR2. U negativní kontroly a vzorků, ve kterých nebyly hledané viry detekovány, nedošlo během reakce ke vzniku žádného fluorescenčního signálu.

