

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra ochrany rostlin



Metody diagnostiky vybraných virů ovocných plodin
s využitím PCR
Disertační práce

Autor: Mgr. Lucie Valentová
Školitel: prof. Ing. Pavel Ryšánek, CSc.
Konzultant: RNDr. Radek Čmejla, Ph.D.

Praha 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma Metody diagnostiky vybraných virů ovocných plodin s využitím PCR vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací a doporučení školitele.

Souhlasím se zveřejněním disertační práce dle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v platném znění, a to bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Praze dne 25.1.2023

Mgr. Lucie Valentová

Poděkování

Děkuji mému školiteli panu prof. Ing. Pavlu Ryšánkovi, CSc. za odborné vedení při zpracovávání disertační práce. Dále bych chtěla poděkovat svým kolegům z VÝZKUMNÉHO A ŠLECHTITELSKÉHO ÚSTAVU OVOCNÁŘSKÉHO HOLOVOUSY s.r.o., kde mi bylo umožněno provést experimentální část disertační práce. Jmenovitě bych ráda poděkovala svému konzultantovi panu RNDr. Radku Čmejlovi, Ph.D. za věcné připomínky k disertační práci a za vstřícnou spolupráci. Na závěr bych ráda poděkovala svým nejbližším – manželovi a dětem Danielovi, Štěpánovi a Alexandře za podporu, trpělivost a pochopení, které mi po celou dobu studia poskytovali.

Abstrakt

Tato práce se zabývá problematikou diagnostiky rostlinných virů ovocných plodin, zejména metodou na principu real-time PCR. Tyto detekční systémy jsou jedněmi z nejcitlivějších metod pro detekci virů (nejen) v rostlinách a pro některé viry, např. LChV-1, LChV-2, BRV, SMoV, SCV, jsou v současnosti i jediným možným způsobem jejich diagnostiky, neboť pro ně neexistují detekční protilátky. V rámci disertační práce byly vyvinuty a validovány multiplexní detekční systémy pro viry maloplodosti třešně LChV-1 a LChV-2, pro viry jahodníku SMYEV, SCV, SVBV, SMoV, SPV-1, StrV-1 a OLV-1 a pro viry rybízu BRV a GVbAV. Pro jednotlivé viry byla provedena analýza dostupných diagnostických metod a byly navrženy nové detekční systémy v multiplexním uspořádání, které byly validovány pro použití v moderní diagnostické laboratoři, která se musí řídit mezinárodními standardy pro zajištění věrohodného testování. Validace proběhla dle validačního schématu metodiky EPPO PM 7/98 (5) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. Během validace byly stanoveny výkonnostní parametry (specifita, senzitivita, opakovatelnost a reprodukovatelnost) pro jednotlivé PCR reakce. Zároveň bylo ověřeno, že specifita a senzitivita detekčních systémů konkrétních virů je shodná v multiplexním i v simplexním uspořádání.

Pomocí validovaného systému pro detekci virů maloplodosti třešně LChV-1 a LChV-2 byl proveden průzkum výskytu virů v produkčních výsadbách třešňí a višňí na území České republiky. Z výsledků testování byla např. zjištěna korelace mezi výskytem LChV-2 a stářím sledovaných stromů. Detekční systémy pro testování virů jahodníku byly využity během hodnocení hospodářské škodlivosti viru StrV-1 a pro monitoring přítomnosti virů v rostlinném materiálu, který byl odebrán např. v produkčních výsadbách, v rostlinách uchovávaných v technické izolaci v certifikačním stupni superelita nebo v nakoupené sadbě. Diagnostickou soupravou pro stanovení virů rybízu byl zmapován výskyt virů BRV a GVbAV na území ČR. Výskyt jednotlivých virů byl v řadě testovaných materiálů potvrzen.

Výsledky poukazují na smysluplnost vývoje daných detekčních systémů a monitorování jednotlivých virů v testovaných skupinách vzorků. Multiplexování primerů pro detekci více virů jedné plodiny do jedné reakce navíc celé testování zjednodušuje, zrychluje a v neposlední řadě zlevňuje. Všechny diagnostické systémy byly poskytnuty laboratoři ÚKZÚZ, která je již využívá pro testování zdravotního stavu rostlin při kontrole rozmnožovacího materiálu.

Abstract

This thesis deals with the problem of diagnostics of plant viruses of fruit crops, especially by the method based on the principle of real-time PCR. These detection systems are one of the most sensitive methods for detection of viruses not only in plants and for some viruses, e.g. LChV-1, LChV-2, BRV, SMOV, SCV, they are currently the only possible way of their diagnosis as no detection antibodies for them exist. In the framework of this thesis, multiplex detection systems were developed and validated for sweet and sour cherry viruses LChV-1 and LChV-2, for strawberry viruses SMYEV, SCV, SVBV, SMOV, SPV-1, StrV-1 and OLV 1, and for currant viruses BRV and GVBaV. For each virus, an analysis of available diagnostic methods was carried out, and new detection systems in a multiplex arrangement were designed and validated for use in a modern diagnostic laboratory that must follow international standards to ensure reliable testing. Validation was done according to the validation scheme of EPPO PM 7/98 (5) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. During the validation, the performance parameters (specificity, sensitivity, repeatability and reproducibility) for each PCR reaction were determined. Concurrently, it was verified that the specificity and sensitivity of the detection systems for specific viruses were identical in both multiplex and simplex arrangements.

Using a validated system for the detection of LChV-1 and LChV-2, a survey of virus occurrence in production plantations of cherries in the Czech Republic was carried out. The results of the testing showed, for example, a correlation between the occurrence of LChV-2 and the age of the monitored trees. The detection systems for strawberry virus testing were used during a study of StrV-1 economic impacts and for monitoring the presence of the viruses in plant material collected e.g. in production plantings, in nuclear stock kept in technical isolation as super elite or in purchased seedlings. The presence of BRV and GVBaV viruses in the territory of the Czech Republic was mapped using the currant virus diagnostic kit. Occurrence of individual viruses was confirmed in many materials tested.

The results point to the usefulness of the development of the detection systems and monitoring of individual viruses in the tested groups of samples. Moreover, multiplexing primers for the detection of multiple viruses infecting one crop into one reaction simplifies, speeds up and also makes the whole testing cheaper. All diagnostic systems were provided to the laboratory of the ÚKZÚZ, which already uses them to test the health status of plants during the control of propagation material.

Obsah

1	Úvod.....	11
2	Literární přehled	12
2.1	Diagnostické metody	12
2.1.1	Hodnocení vizuálních příznaků	12
2.1.2	Biologický indexing.....	13
2.1.3	Elektronová mikroskopie	14
2.1.4	Sérologické metody	14
2.1.5	Molekulárně genetické metody	16
2.1.5.1	RT-PCR (Reverzní transkripce - polymerázová řetězová reakce)	16
2.1.5.2	Real-time PCR (kvantitativní PCR, qPCR).....	17
2.1.5.2.1	Detekce PCR produktů pomocí interkalačních barviv	17
2.1.5.2.2	Detekce PCR produktů pomocí sond	18
2.1.5.2.3	Hydrolyzační sondy	18
2.1.5.3	Shrnutí – výhody a nevýhody	19
2.2	Odborná způsobilost laboratoří.....	19
2.3	Charakteristika a diagnostika vybraných virů	20
2.3.1	Viry způsobující maloplodost třešně	20
2.3.1.1	Stručná charakteristika a symptomatologie virů LChV-1 a LChV-2.....	21
2.3.1.2	Diagnostika virů LChV-1 a LChV-2.....	22
2.4	Viry jahodníku	23
2.4.1	Stručná charakteristika a symptomatologie virů jahodníku.....	23
2.4.1.1	Virus okrajového žloutnutí listů jahodníku - Strawberry mild yellow edge virus (SMYEV).....	23
2.4.1.2	Virus kadeřavosti jahodníku - Strawberry crinkle virus (SCV)	24
2.4.1.3	Virus lemování žilek jahodníku - Strawberry vein banding virus (SVBV)	25
2.4.1.4	Virus strakatosti jahodníku - Strawberry mottle virus (SMoV)	25

2.4.1.5	Strawberry polerovirus-1 (SPV-1)	26
2.4.1.6	Strawberry virus 1 (StrV-1).....	26
2.4.1.7	Olive latent virus 1 (OLV-1)	27
2.4.2	Diagnostické metody virů jahodníku	27
2.5	Viry rybízu	29
2.5.1	Stručná charakteristika a symptomatologie virů rybízu	29
2.5.1.1	Blackcurrant reversion virus (BRV, Virus zvratu rybízu).....	29
2.5.1.2	Gooseberry vein banding associated virus (GVBaV)	30
2.5.2	Diagnostické metody virů rybízu.....	31
3	Cíle a hypotéza disertační práce	31
4	Metodika	32
4.1	Výkonnostní charakteristiky real-time PCR reakce.....	33
4.1.1	Specificita	33
4.1.1.1	Viry způsobující maloplodost třešně	34
4.1.1.2	Viry jahodníku	34
4.1.1.3	Viry rybízu.....	35
4.1.2	Senzitivita	35
4.1.3	Opakovatelnost	36
4.1.4	Reprodukovatelnost	36
4.2	Použité laboratorní metody a postupy	37
4.2.1	Preanalytická fáze	37
4.2.2	Analytická fáze	37
4.2.2.1	Izolace RNA	38
4.2.2.2	Reverzní transkripce	38
4.2.2.3	Real-time PCR reakce	39
4.2.2.4	End-point PCR.....	39
4.2.2.5	Purifikace DNA fragmentů z gelu	40

4.2.2.6	Sekvenování PCR produktů	40
4.2.3	Post-analytická fáze	41
4.2.3.1	Real-time PCR.....	41
4.2.3.2	End-point PCR.....	41
4.2.3.3	Sekvenování	41
4.3	Využití detekčních systémů v praxi.....	42
4.3.1	Viry způsobující maloplodost třešně	42
4.3.1.1	Metodika experimentu.....	42
4.3.2	Viry jahodníku	42
4.3.2.1	Hodnocení hospodářské škodlivosti	42
4.3.2.1.1	Testování a příprava rostlin.....	43
4.3.2.1.2	Hodnocení rostlin	44
4.3.2.2	Monitoring virů jahodníku na území ČR.....	45
4.3.3	Viry rybízu.....	46
5	Výsledky a diskuze	47
5.1	Diagnostický systém pro detekci virů způsobujících maloplodost třešně a jeho využití v praxi	47
5.1.1	Výkonnostní charakteristiky multiplexní real-time PCR reakce	47
5.1.1.1	Specificita	47
5.1.1.2	Senzitivita	49
5.1.1.3	Opakovatelnost	50
5.1.1.4	Reprodukovatelnost.....	51
5.1.2	Využití detekčního systému pro diagnostiku virů způsobujících maloplodost třešně	52
5.2	Diagnostický systém pro detekci virů jahodníku a jeho využití v praxi.....	54
5.2.1	Výkonnostní charakteristiky multiplexní real-time PCR reakce	54
5.2.1.1	Specificita	55
5.2.1.2	Senzitivita	57

5.2.1.3	Opakovatelnost	66
5.2.1.4	Reprodukovatelnost	68
5.2.2	Využití detekčního systému pro diagnostiku virů jahodníku	70
5.2.2.1	Hospodářská škodlivost	70
5.2.2.2	Monitoring virů jahodníku	76
5.3	Diagnostický systém pro detekci virů rybízu a jeho využití v praxi	78
5.3.1	Výkonnostní charakteristiky multiplexní real-time PCR reakce	78
5.3.1.1	Specifická	78
5.3.1.2	Senzitivita	79
5.3.1.3	Opakovatelnost	82
5.3.1.4	Reprodukovatelnost	83
5.3.2	Využití detekčního systému pro diagnostiku virů rybízu	83
6	Závěry a využití poznatků v praxi	85
6.1	Návrh a validace detekčního systému na principu real-time PCR v multiplexním uspořádání pro viry maloplodosti třešně LChV-1 a LChV-2 v rostlinném materiálu.	85
6.2	Vývoj a validace detekčního systému na principu real-time PCR v multiplexním uspořádání pro viry jahodníku SMYEV, SCV, SVBV, SMoV, SPV-1, StrV-1 a OLV-1 v rostlinném materiálu.	85
6.3	Vývoj a validace detekčního systému na principu real-time PCR v multiplexním uspořádání pro viry rybízu BRV a GVBaV v rostlinném materiálu	87
7	Publikace a ostatní výstupy	87
7.1	Impaktované publikace	87
7.2	Metodiky	88
7.3	Průmyslově chráněné výstupy	88
7.3.1	Patent	88
7.3.2	Užitný vzor	88
7.4	Funkční vzorek	88
7.5	Ostatní publikace	89

8	Finanční podpora	89
9	Seznam použitých zkratk	91
10	Seznam použité literatury	93

1 Úvod

Jako každý živý organismus, tak i rostliny jsou hostitelem virů, malých nebuněčných parazitů, které u rostlin mohou vyvolávat poškození, jenž je často dostačující k tomu, aby způsobilo významné finanční ztráty v oblasti zemědělství - ovocnářství. Jak popisuje Strange a Scott (2005) poškození plodin v důsledku virových chorob je obtížné předvídat. Závisí na mnoha faktorech, jak se onemocnění vyvine; např. na území, kde se virus vyskytuje, na kmeni viru a jeho virulenci, na kultivaru a odolnosti hostitelské rostliny i na době infekce.

Je tedy namístě se zabývat diagnostikou těchto patogenů, neboť efektivní diagnostická metoda může přispět k jejich včasnému odhalení a zabránění tak obrovským ztrátám nejen v produkčních sadech. Ztráty mohou být vyvolány např. zakládáním porostů již infikovaným rozmnožovacím materiálem nebo šířením virů zavlečených do výsadeb pomocí jejich vektorů.

Diagnostika rostlinných virů má své uplatnění nejen při kontrole zdravotního stavu a certifikaci rozmnožovacího materiálu a monitoringu přítomnosti virů v určité lokalitě, ale i při dohledu nad zdravotním stavem rostlin, které jsou objektem exportu a importu. Protože pro virové choroby rostlin neexistuje žádná účinná léčba, je jedinou ochranou proti jejich rozšiřování prevence, jejímž základem je testování rostlinného materiálu. Diagnostika virových onemocnění rostlin nabývá na důležitosti také ve spojení s globalizací obchodu (dohoda o volném obchodu), mezinárodní obchodní výměnou rostlinného materiálu a rychlou změnou klimatu, která podporuje přenos virů, jejich hostitelů a vektorů ze zemí jejich přirozeného výskytu do dalších zemí (Špak 2009; Jeong et al. 2014). Jak je výše uvedeno, diagnostika rostlinných virů je v oblasti zemědělství významná.

V předkládané disertační práci je v první části literární rešerše uveden přehled diagnostických metod rostlinných virů se zaměřením na jejich principy, přednosti a nedostatky. V druhé části je pak k jednotlivým virům, které byly předmětem vývoje detekčních systémů, uvedena jejich stručná charakteristika a přehled diagnostických metod.

Na základě aktuální potřeby v oblasti diagnostiky byly pro vývoj vybrány viry maloplodosti třešně little cherry virus 1 (LChV-1) a little cherry virus 2 (LChV-2), jahodníkové viry strawberry mild yellow edge virus (SMYEV), strawberry crinkle virus (SCV), strawberry vein banding virus (SVBV), strawberry mottle virus (SMoV) a strawberry polerovirus 1 (SPV-1) a viry rybízu blackcurrant reversion virus (BRV) a gooseberry vein banding associated virus (GVBaV), pro které byly vyvinuty diagnostické metody na principu real-time PCR v multiplexním uspořádání. Dále byly zařazeny viry strawberry virus 1 (StrV-1) a olive latent

virus 1 (OLV-1). Oba byly nalezeny během řešení projektu, který se zabýval problematikou jahodníkových virů. StrV-1 byl popsán jako nově objevený virus a OLV-1 jako virus, který byl v ČR poprvé objeven v hostitelské rostlině jahodníku (Fránová et al. 2019).

Detekční systémy byly validovány dle validačního schématu metodiky EPPO PM 7/98 (5) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. Veškeré testování probíhalo v laboratoři, která je akreditována podle ČSN EN ISO/IEC 17025:2018 Všeobecné požadavky na kompetenci zkušebních a kalibračních laboratoří. Problematice odborné způsobilosti laboratoří je věnována poslední část literární rešerše.

2 Literární přehled

2.1 Diagnostické metody

Obecně lze k diagnostice virů říci, že pro viry ve srovnání s ostatními patogeny rostlin, jako jsou houby a bakterie, které mohou být diagnostikovány pomocí světelné mikroskopie, jsou vyžadovány přístrojově, časově i finančně náročnější detekční metody. Arous et al. (2018) ve své studii uvádí, že mnoho diagnostických laboratoří pro diagnostiku patogenů rostlin vyniká v detekci a diagnostice kultivovatelných patogenů, jako jsou houby a bakterie, ale jen málo laboratoří rutinně testuje nekultivovatelné patogeny, jako jsou viry.

Pro diagnostiku rostlinných virů existuje celá škála metod, které byly vyvinuty na odlišných principech. Jedná se například o metody založené na vizuálním hodnocení symptomů, biologický indexing, elektronová mikroskopie, sérologické a molekulární metody. V současné době jsou pro diagnostiku nejčastěji využívány metody sérologické a molekulárně genetické. Boonham et al. (2014) se ve své studii zmiňuje, že obrovský převrat v diagnostice rostlinných virů v 70. letech způsobil objev sérologické metody ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay). Do tohoto objevu byla detekce virů prováděna převážně odborníky s dlouholetou praxí v symptomatologii, biologickými metodami, které jsou založeny na pozorování symptomů na citlivých odrůdách a v neposlední řadě také transmisní elektronovou mikroskopií a precipitačními metodami.

2.1.1 Hodnocení vizuálních příznaků

Diagnostickou metodu posuzující zdravotní stav rostlin na základě vizuálního hodnocení symptomů považuje Jeong et al. (2014) za stále užitečnou, avšak často

vyhodnocenou s chybnými výsledky, neboť příznaky podobné virózám mohou být vyvolány i abiotickými faktory, kterými jsou např. reakce rostlin na nepříznivé počasí, nutriční nerovnováha, a dalšími biotickými činiteli, jako jsou např. poškození způsobené škůdci, houbami nebo bakteriemi. Lima et al. (2012) výčet důvodů, proč nelze bezchybně diagnostikovat infekce rostlinných virů na základě symptomů rozšiřuje ještě o další. Autor uvádí, že záleží na odrůdě rostlin, na kmeni viru, dále na skutečnosti, že různé viry mohou u stejných druhů rostlin vyvolat podobné příznaky, symptomy mohou být vyvolány synergickým účinkem více virů nebo příznaky mohou být velmi slabé anebo žádné. U rostlinných viróz se dost často setkáváme s tím, že viry přežívají v rostlinách v latenci. Jedná se o období, kdy není možné diagnostikovat virus pomocí vizuálního rozpoznání příznaků (van der Want & Dijkstra 2006). Diagnostika virových chorob podle symptomů je složitější a náročnější než u jiných rostlinných patogenů.

2.1.2 Biologický indexing

Biologický indexing, neboli testování rostlin na dřevinných nebo bylinných indikátorech, je metoda sloužící především pro hodnocení zdravotního stavu rostlin při certifikaci rozmnožovacího materiálu. Princip metody spočívá v hodnocení vizuálních reakcí indikátorových rostlin na přítomnost patogena. Biologické testování dřevin se ve většině případů provádí metodou dvojitého očkování. Na podnož je naočkováno očko indikátorové rostliny a asi po 14 dnech je pod toto očko naočkováno očko testované rostliny. Indikátorem jsou na testovaný patogen citlivé odrůdy patřičného ovocného druhu, na kterých se v krátké době objevují viditelné symptomy. Byly vytvořeny podrobné seznamy citlivých odrůd, např. EPPO certifikační schémata příslušných ovocných plodin.

Technika biologického indexingu je časově náročná, např. pro jabloně je požadována doba testování až dvě plodná období (4 - 5 let). Metoda není vhodná pro větší množství vzorků a v případě virů přežívajících v latenci vykazuje falešně negativní výsledky (Marinho et al. 1998; Bertozzi et al. 2002). Další nevýhodou je prostorová náročnost, neboť testování musí probíhat v izolovaných prostorách, aby v případě positivity testovaných vzorků nedocházelo k zavlečení rostlinných patogenů do okolí. Dále je nutné indikátorové rostliny a podnože uchovávat v izolaci, aby bylo zabráněno přístupu hmyzu (vektorů virů), a tím byl zaručen jejich bezvirózní zdravotní stav. V případě smíšených infekcí nemusí dojít k odlišení jednotlivých virů, především jsou-li viry příbuzné (Marinho et al. 1998). Výsledky testování mohou záviset také na klimatických podmínkách, kdy mohou příznaky na indikátorových rostlinách vlivem

vyšších teplot vymizet (Constable et al. 2013). Spolehlivost biologických testů též závisí na provedení očkování a následném přijmutí očka indikátoru nebo testované rostliny. V případě vysokého procenta nepřijatých oček, dochází ke snížení věrohodnosti negativních výsledků (Al Rwahnih et al. 2015).

Výhodou biologického indexingu je, že tímto testováním lze u ovocných plodin odhalit symptomy vyvolané viry neznámého původu, které není možné rutinně detekovat sérologickými nebo molekulárně genetickými metodami (mimo metod High-Throughput Sequencing (HTS)). Vzhledem k tomu, že se virus v indikátorové rostlině namnoží, se považuje metoda biologického indexingu za velmi citlivou. Nicméně některé viry, přestože se v hostiteli množí, nejsou schopny na hostitelské rostlině vyvolat symptomy, které by vedly k identifikaci daného viru (López et al. 2009). Metoda je také vhodná pro výzkum biologických vlastností virů.

2.1.3 Elektronová mikroskopie

Další detekční metodou v oblasti rostlinné virologie je transmisní elektronová mikroskopie (TEM). Elektronová mikroskopie není v rutinní diagnostice rostlinných virů běžně používána, a to jak z důvodů finančně náročných požadavků na vybavení, tak díky nutnosti odborného vzdělání obsluhujícího personálu, který musí mít zkušenosti s přípravou preparátů a jejich vyhodnocováním. Další nevýhodou je časová náročnost přípravy vzorků i vlastního pozorování (Rott et al. 2017).

2.1.4 Sérologické metody

Přestože se výše zmíněné metody pro diagnostiku virů stále používají, je v rutinních diagnostických zkušebních laboratořích celosvětově nejvíce používaná imunochemická metoda ELISA (z angl. enzyme-linked immunosorbent assay). Jejím principem je rozpoznání přítomnosti antigenu detekovaného viru v rostlinném materiálu prostřednictvím specifických protilátek. Není detekován přímo komplex antigen-protilátka, ale změna barvy substrátu, která je vyvolána působením enzymu navázaného na další protilátce. Protilátky, většinou se jedná o protilátky třídy IgG, jsou získávány např. opakovanou imunizací živočichů. Pokusným zvířatům (obratlovcům) je aplikován antigen testovaného viru, který musí být připraven v dostatečném množství a čistotě. Aplikace antigenu u pokusných zvířat vyvolá imunitní reakci, na základě které jeho imunitní buňky produkují protilátky, které jsou pak purifikovány z jeho séra. Tímto způsobem vznikají polyklonální protilátky, které rozpoznávají různé epitopy na

jednom antigenu na rozdíl od monoklonální protilátky detekující pouze jeden epitop na antigenu (Lima et al. 2012). Veškeré interakce antigen – protilátka probíhají za specifických podmínek zpravidla v mikrotitračních destičkách s 96 jamkami.

Objevem metody ELISA došlo v 70. a 80. letech k velikému pokroku v oboru diagnostiky rostlinných virů. Až do poloviny 70. let byly hlavní sérologickou diagnostickou metodou testy založené na interakci mezi proteiny ve formě virového antigenu s protilátkami (např. aglutinace v agaru, kapkové testy) (Špak 2009). ELISA je metoda založená na platformě, kterou s drobnými úpravami lze využít pro rozsáhlou skupinu virů. Velkým kladem pro tuto metodu je, že pro pracovníky, kteří tuto metodu provádějí, je dostačující si osvojit metodu jako takovou, není potřeba se jí učit pro každý virus zvlášť. Další výhodou je, že vlastní reakce probíhá ve standardní 96jamkové destičce, což umožňuje zpracování více vzorků najednou i případnou automatizaci analýz (Vemulapati et al. 2014) a tím je ušetřena i doba potřebná k provedení testů. Dojde také ke snížení nákladů jak na pracovní sílu, tak i na laboratorní materiál. Všechny tyto úspory nepochybně přispívají k větší dostupnosti a použitelnosti této metody pro rutinní testování v laboratořích (Boonham et al. 2014).

Nevýhody metody ELISA jsou např. potřeba většího množství testovaného vzorku (oproti metodě PCR) nebo dlouhé inkubační doby. Vytvoření nového diagnostického kitu pro detekci virů je časově zdlouhavé, zejména na přípravu protilátek, a ne vždy je kit zaveden. Jestliže se nepodaří získat v dostatečném množství a čistotě antigen nového viru, který je nutný pro přípravu protilátek, nelze virus touto metodou testovat. Také může docházet k falešně pozitivním reakcím, což je vyvoláno nespecifickými reakcemi nebo zkříženou reaktivitou (Kfir & Genthe 1993). Metoda není vhodná k rozlišení kmenů virů, protože jednak obalové proteiny virů, které reagují s použitými protilátkami, mohou být pro určité rody vysoce konzervativní, nebo znaky, které vedou k rozlišení jednotlivých kmenů, nejsou vázány na obalový protein viru (Boonham et al. 2014). Diagnostiky na principu metody ELISA bývají méně citlivé a přesné než techniky molekulárně biologické. Noorani et al. (2013) uvádí, že senzitivita metody ELISA klesá vzhledem k nízkým titrům nebo přítomnosti inhibičních látek (polysacharidy, fenolické látky) v rostlině. Zlepšení citlivosti metody ELISA úspěšně ve své studii řešili Fegla a Kawanna (2013), a to přidáním chemických látek (0.1% Triton X-100, macerozym) do extrakčního pufu.

2.1.5 Molekulárně genetické metody

Jednou z hlavních technik molekulární biologie, která se používá k diagnostice virových chorob rostlin, je polymerázová řetězová reakce (PCR – Polymerase Chain Reaction) (Makkouk & Kumari 2006). López et al. (2009) zmiňuje, že metoda PCR se všemi svými variantami je základním nástrojem v diagnostice rostlinných virů, ať již samostatně nebo přednostně v kombinaci s jinými technikami.

Metoda je založená na principu enzymatického množení vybrané sekvence DNA. Amplifikace daného úseku DNA probíhá cyklicky ve třech teplotních krocích: denaturace, annealing (nasedání primerů) a elongace (syntéza nových molekul, prodloužení řetězce DNA).

Pro separaci a vizualizaci nově syntetizovaných amplikonů DNA se nejčastěji používá gelová elektroforéza s využitím agarózových gelů jako nosných médií.

Předmětem předkládané práce je vývoj diagnostických metod na principu real-time PCR v multiplexním uspořádání pro detekci rostlinných virů, zejména RNA virů. Proto se zde zmíním pouze o relevantních modifikacích metody PCR.

2.1.5.1 RT-PCR (Reverzní transkripce - polymerázová řetězová reakce)

V případě detekce RNA virů je nutné před vlastní PCR zařadit reverzní transkripci. Jedná se o enzymovou reakci, při které dochází k přepisu genetické informace z molekuly RNA do molekuly cDNA (komplementární DNA). Tato reakce probíhá v přítomnosti enzymu reverzní transkriptáza, která syntetizuje k templátové molekule RNA komplementární řetězec DNA. Počátkem syntézy je úsek molekuly RNA, na který nasedají primery (směs náhodných hexanukleotidů nebo primery Oligo (dT)). cDNA pak může vstoupit jako templát do PCR reakce (Webster et al. 2004).

Metodu RT-PCR lze provést jedno- nebo dvoukrokově. Při jednokrokové (one-tube) detekci probíhá reverzní transkripce a PCR současně v jedné zkumavce. Protože se během jednotlivých kroků neotvírají reakční zkumavky, je tímto způsobem sníženo riziko kontaminace PCR reakce. Nevýhodou tohoto postupu však je, že přepsaná cDNA je použita pouze pro konkrétní PCR reakci a nemůže být použita opakovaně. U dvoukrokové RT je vyšší riziko kontaminace při otevírání zkumavek, to lze ale odstranit dodržováním zásad správné laboratorní praxe (používání špiček s filtrem, oddělené místnosti pro jednotlivé kroky RT-PCR, dodržování hygieny v laboratoři) (Wacker & Godard 2005).

2.1.5.2 Real-time PCR (kvantitativní PCR, qPCR)

Metody na principu real-time PCR jsou závislé na povaze cílových sekvencí primerů a sond využívaných v testování. Aby nebyla ohrožena citlivost testu, musí být tyto sekvence specifické pro cílový virus a musí být dobře konzervovány napříč různými kmeny nebo typy viru. Metoda real-time PCR na rozdíl od konvenční PCR k vyhodnocení výsledných amplikonů nevyužívá gelovou elektroforézu, ale v průběhu každého cyklu PCR reakce je zaznamenávána fluorescence, která je přímo úměrná množství amplifikovaného PCR produktu (Watzinger et al. 2006). Zdrojem fluorescence mohou být fluorescenční barviva, která se vážou na DNA, nikoliv na volný substrát. Pro detekci produktů PCR se využívá několik přístupů. V případě diagnostiky rostlinných virů jsou nejpoužívanější techniky založeny na využití fluorescenčně značených sond, které se specificky vážou na cílovou sekvenci, nebo na fluorescenčních barvivech, která se nespecificky vážou na dvouřetězcovou DNA. Přestože jsou oba přístupy potenciálně rychlé a citlivé, jsou jejich principy testování a výsledné náklady na test odlišné (Dorak 2006).

2.1.5.2.1 Detekce PCR produktů pomocí interkalačních barviv

Pro způsob detekce pomocí nespecifické vazby barviva jsou používána barviva např. SYBR® Green nebo EvaGreen®, která se v rámci PCR reakce během syntézy nových amplikonů nespecificky vážou pouze do dvouvláknové DNA (Popp & Bauer 2015). Během kroků annealingu a elongace se zvyšuje množství navázaného barviva do nově syntetizovaných řetězců DNA, které vede ke zvýšení intenzity fluorescence, která je měřena na konci každé elongační fáze a odráží počet produktů PCR generovaných během amplifikačního procesu. Jakmile je DNA během PCR cyklu znovu denaturována, molekuly interkalačního barviva jsou uvolněny do roztoku, což má za následek pokles fluorescence (Watzinger et al. 2006).

K celkové intenzitě fluorescenčního signálu v případě použití interkalačních barviv přispívají i nespecifické produkty PCR nebo dimery primerů, což může vést k nepřesné kvantifikaci cílových amplikonů. Proto se doporučuje na konci PCR reakce provést analýzu teploty tání (melting analýza) PCR produktů, čímž dojde ke kontrole specifity amplifikovaných fragmentů. Principem je, že nespecifické produkty mají jiný profil tání, což je dáno jiným počtem vazeb vodíkových můstků (Dorak 2006).

Výhodou použití interkalačních barviv je, že výsledky nejsou ovlivněny mutacemi v cílové sekvenci, což může být prospěšné při detekci RNA virů, které se vyznačují vysokou

rychlostí mutací (Watzinger et al. 2006). Nevýhodou je, že při použití interkalačních barviv není výhodné provádět multiplexování a detekci více cílů v jedné reakci.

2.1.5.2.2 Detekce PCR produktů pomocí sond

Sondy představují fluorescenčně značený oligonukleotid, který během amplifikace specificky nasedá k cílové sekvenci hledaného viru. Existuje celá škála sond, která se liší podle typu použitého fluorescenčního barviva nebo podle uspořádání (lineární nebo strukturní). Jak ve své studii uvádí Watzinger et al. (2006), v diagnostice virů se nejčastěji používají právě fluorescenčně značené oligonukleotidové sondy, jako jsou např. hydrolyzační sondy, hybridizační sondy nebo molekulární majáky (Molecular beacons).

Metody, které jsou předmětem této práce, byly vyvíjeny real-time PCR s využitím hydrolyzačních sond, proto zde budou podrobněji popsány pouze tyto sondy.

2.1.5.2.3 Hydrolyzační sondy

Hydrolyzační sondy jsou oligonukleotidy, které mají na svých koncích kovalentně navázány dva fluorochromy. Na 5'konci jsou označeny fluorochromem reportérem a na 3'konci zhášedčem fluorescence (quencher), který brání fluorescenci reportéru. Reportérová část sondy je excitována absorpcí světla o vhodné vlnové délce, v přítomnosti zhášedče je však energie excitovaného stavu sondy přenesena na molekulu zhášedče a emise fluorescence reportérem je potlačena. Tento fyzikální jev se nazývá Försterův rezonanční energetický přenos (FRET) (Clegg 1995). Přenos energie funguje účinně jen na velmi krátké vzdálenosti v řádu nanometrů a rychle klesá, když se molekuly reportéru a zhášedče od sebe vzdálí. Účinkem endonukleázové aktivity Taq polymerázy dojde k uvolnění reportéru z oligonukleotidu (degradace sondy), přenos energie do zhášedcí molekuly je zrušen a reportér začne emitovat fluorescenci, která je zaznamenávána na konci kroku elongace během každého cyklu PCR. Intenzita fluorescence přímo koresponduje s množstvím PCR produktu v reakci. Čím více se syntetizuje DNA, tím více se zvyšuje množství uvolněných reportérových molekul, což vede k vyššímu signálu fluorescence (Holland et al. 1991; Mulhardt 2010).

Metody založené na použití sond jsou více specifické. Vysoká specifičnost je dána tím, že v reakci je nutné na vybraný úsek genomu detekovaného viru navázat nejméně tři na sobě nezávislé oligonukleotidy, dva specifické primery a sondu (Boonham et al. 2014).

2.1.5.3 Shrnutí – výhody a nevýhody

Obdobnou důležitost, jakou má ELISA v diagnostice virů, v současnosti získávají metody na principu PCR, zejména real-time PCR. Pro tyto metody na principu detekce nukleových kyselin lze také, jako pro metodu ELISA, připravit jeden hlavní protokol, který je vhodný s menšími úpravami pro testování širokého souboru virů. Testování je možné také provádět ve větším počtu najednou např. s využitím 96 jamkových destiček. Výhodou PCR oproti ELISA je, že lze testy pro jednotlivé viry multiplexovat a detekovat tak více virů v jedné reakci současně. Metody na principu PCR se postupně zavádějí ve zkušebních laboratořích po celém světě, kde, jak uvádí Boonham et al. (2014), se v posledních letech častěji dává přednost metodám real-time PCR před ELISA.

Z důvodů častých kontaminací nebyla zpočátku klasická metoda PCR používána pro běžnou rutinní diagnostiku. Ke kontaminacím docházelo zejména během otevírání zkumavek, kdy se z důvodu separace fragmentů DNA pomocí gelové elektroforézy nanášely amplikony získané proběhlou PCR reakcí. Do prostředí laboratoře se tak mohlo při otevření zkumavek v případě pozitivního výsledku uvolnit malé množství DNA. Problém kontaminací byl částečně vyřešen zavedením přístroje real-time PCR, kdy vizualizace produktu probíhá současně s cyklováním PCR a není tedy potřeba otevírat zkumavky s velkým množstvím amplifikované DNA (Boonham et al. 2014). Jak popisuje Mumford et al. (2000), další výhodou detekce virů metodu real-time PCR je, že není potřeba pracovat s barvivou pro vizualizaci amplikonů v gelu, např. ethyidium bromidem, který je považován za mutagen a kancerogen.

Metody na principu PCR (RT-PCR, real-time PCR) jsou citlivější a spolehlivější pro nízké hladiny titru viru v rostlině, dokonce i v přítomnosti inhibičních látek (polysacharidy, fenolické látky) pocházejících z rostliny (Bariana et al. 1994). Moderní metody izolace pomocí kolonek problém inhibice víceméně eliminovaly. Nevýhodou PCR metod v klasickém v simplexovém uspořádání (tj. jedna reakce zahrnuje test jednoho patogenu) je, že jsou drahé a časově náročné, zejména v případě potřeby testování většího počtu vzorků (Wei et al. 2009). Proto je vhodné tyto metody vyvíjet v multiplexním uspořádání, tj. v jedné reakci je testováno několik různých patogenů naráz. Tento způsob se stává hojně využívanou technikou, protože umožňuje rychlé, spolehlivé a nákladově přijatelnější testování (Thompson et al. 2003).

2.2 Odborná způsobilost laboratoří

V současné době diagnostické laboratoře podílející se na detekci rostlinných virů čelí rostoucím požadavkům na správnost a ověřování svých výsledků (Roenhorst et al. 2018). Tento

fakt vede k tomu, že jsou laboratoře pro provádění specifických zkoušek akreditovány podle normy ISO 17025 Všeobecné požadavky na kompetenci zkušebních a kalibračních laboratoří. Cílem akreditace je zajistit, aby všechny testy v laboratoři byly prováděny validovanými metodami, což znamená, že musí být poskytnut objektivní důkaz, že daná zkouška je vhodná pro zamýšlený účel testování. Dále akreditace slouží k prokazování odborné způsobilosti a nestrannosti laboratoří poskytujících služby v oblasti posuzování shody, tzn. v oblasti posuzování kvality, bezpečnosti, zdravotní nezávadnosti a spolehlivosti výrobků či služeb. Jedná se o oficiální uznání, že tyto laboratoře jsou způsobilé provádět specifické činnosti (zkoušky, testování patogenů). Dokladem o akreditaci v České republice je Osvědčení o akreditaci, které vystavuje národní akreditační orgán - Český institut pro akreditaci, o. p. s. (<https://www.bozpinfo.cz/akreditacni-system-ceske-republiky>).

Vzhledem k tomu, že je Česká republika členem EU, platí v naší zemi další normy (standards), podle kterých se v laboratořích řídí diagnostika rostlinných patogenů. Jedná se o normy popsané Evropskou organizací na ochranu rostlin (EPPO, European and Mediterranean Plant Protection Organization): PM 7/84 (3) Basic requirements for quality management in plant pest diagnostic laboratories (Základní požadavky na jakost managementu v laboratořích diagnostiky rostlinných škůdců) a PM 7/98 (5) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity (Zvláštní požadavky pro laboratoře připravující se na akreditaci diagnostiky rostlinných škůdců) (EPPO 2021a, 2021b). Ze standardu PM 7/98 (5) vyplývá, že v případě diagnostiky založené na sérologických nebo molekulárně biologických metodách, lze test považovat za validovaný v případě, že u metody byly stanoveny její výkonnostní parametry: analytická senzitivita, analytická specifita, opakovatelnost a reprodukovatelnost (Roenhorst et al. 2018).

2.3 Charakteristika a diagnostika vybraných virů

V další části textu budou popsány charakteristiky virů, pro které byly vyvíjeny nové diagnostické metody na principu multiplexní real-time PCR.

2.3.1 Viry způsobující maloplodost třešně

V roce 2021 zaujímaly plodné výsadby třešní 724 ha (z 802 ha celkem) a plodné výsadby višní 1 164 ha (z 1 242 ha celkem). Během roku 2020 se vyrobilo celkem 168,5 tisíc kusů školkařských výpěstků třešní a 68 tisíc kusů višní. Pro zajímavost, v roce 2020 se v České

republiky vyprodukovalo celkem 7,5 tisíc tun třešní a 8,4 tisíc tun višní (Němcová & Buchtová 2021).

Výnos třešní (*Prunus avium* L.) a višní (*Prunus cerasus* L.) mohou významně ovlivnit viry LChV-1 (Little cherry virus -1 LChV-1) a LChV-2 (Little cherry virus -2 LChV-2), které vyvolávají virové onemocnění maloplodost třešně (LChD – Little Cherry Disease). Ochrana před těmito patogeny spočívá především v pěstování rostlin založených ze zdravého viruprostého rozmnožovacího materiálu. Je velmi důležité dbát na kvalitu množitelského materiálu a zakládat nové výsadby z testovaného materiálu, pocházejícího z certifikovaných matečnic, protože ztráty, které mohou viry vyvolat, mohou být ekonomicky významné. Mezi hlavní příznaky onemocnění LChD patří neúplné dozrávání a menší velikost plodů, což snižuje stupeň jakosti plodů. Typicky nahořklá chuť plodů charakteristická pro maloplodost způsobuje, že plody nejsou vhodné ke konzumaci a tím jsou prakticky neprodejné. Životaschopnost napadených stromů se rychle snižuje.

2.3.1.1 Stručná charakteristika a symptomatologie virů LChV-1 a LChV-2

Viry maloplodosti třešně LChV-1 a LChV-2 jsou taxonomicky zařazeny do čeledi *Closteroviridae*, LChV-1 pak do rodu *Velarivirus* a LChV-2 do rodu *Ampelovirus*. Virové částice LChV-1 jsou velmi dlouhé a ohebné, jejich délka je 1 786 až 1 820 nm. Částice LChV-2 jsou vláknité s délkou 1 667 nm a šířkou 11,2 nm (Barba et al. 2015). Genom virů je tvořen jednou molekulou (+)ssRNA. Byly zveřejněny kompletní genomové sekvence třech izolátů LChV-1 (Keim-Konrad & Jelkmann 1996; Jelkmann et al. 1997; Matic et al. 2009b; Candresse et al. 2013). Genom viru zahrnuje 17 kb a je uspořádán do osmi otevřených čtecích rámců (ORF). Kompletní genomovou sekvenci kmene USA6b Little cherry virus-2 (LChV-2) určili Rott a Jelkmann (2005), genom má délku 15 045 nukleotidů a zahrnuje 11 otevřených čtecích rámců.

Přenos LChV-1 a LChV-2 byl prokázán vegetativním množením podnoží, očkováním a roubováním (Katsiani et al. 2015). V případě viru LChV-2 byl ještě popsán přenos pomocí vektoru červce javorového (*Phenacoccus aceris*) (Raine et al. 1986; Rott & Jelkmann 2001) a červce *Pseudococcus maritimus* (Mekuria et al. 2013).

Mezi nejzávažnější příznaky onemocnění patří ty, které souvisejí s poškozením plodů. Typickými příznaky jsou malé plody trojúhelníkového tvaru, nepřirozeně špičaté, nahořklé chuti, neúplně vyzrálé, světle červené barvy (Eastwell & Bernardy 2001). V období na přelomu léta a podzimu lze na napadených stromech pozorovat červenofialové až bronzové zabarvení

listů. Toto období je také vhodné pro odběr vzorků určených k detekci virů LChV-1 a LChV-2, neboť jsou v infikovaných rostlinách vyšší titry virů (Osman et al. 2012). Viry maloplodosti třešně se v rostlině často vyskytují také v latentní formě, kdy se neprojevují na rostlině žádné zřetelné příznaky.

2.3.1.2 Diagnostika virů LChV-1 a LChV-2

Dle různých autorů jsou metody na principu PCR pro identifikaci virů LChV-1 a LChV-2 v rostlinném materiálu používány nejčastěji. K dispozici jsou i jiné metody detekce virů, které jsou založeny na odlišných principech. Avšak tyto metody jsou pro rutinní diagnostiku nevhodné. Metoda vizuálního hodnocení symptomů je z důvodů latentních a nezřetelných příznaků infekce nedostačující. Jak uvádí Schlesingerová (2012), biologická metoda na dřevinných indikátorech je spolehlivá pouze pro virus LChV-2, neboť při testování izolátů LChV-1 se příznaky projevují velice slabě nebo vůbec. V případě, že se symptomy projeví, nelze jednoznačně určit, o který typ viru se jedná. Přípravou protilátek pro vývoj imunoenzymatických metod se zabýval Matic et al. (2009a). Podařilo se jim připravit antisérum, které bylo specifické, ale ne dostatečně citlivé. V současné době tedy nejsou dostupné komerční kity pro detekci virů maloplodosti LChV-1 a LChV-2 na principu sérologických metod.

Na klasickou RT-PCR s gelovou separací pro detekci virů LChV-1, LChV-2 se zaměřili např. Rott a Jelkmann (2001), Jelkmann et al. (2008), Schröder a Petruschke (2010), Ciešlińska a Morgaš (2010) a Osman et al. (2012). Na vývoji multiplexních klasických RT-PCR, ve kterých byly viry maloplodosti kombinovány s dalšími virem napadajícími třešně, se podíleli např. Isogai et al. (2004), Noorani et al. (2013) a Zong et al. (2014). Další modifikací PCR metod pro detekci virů LChV-1 a LChV-2 je nested RT-PCR, kterou ve své práci uvádí Katsiani et al. (2015) nebo real-time PCR založená na použití interkalačního barviva (Jelkmann et al. 2008; Zong et al. 2015). Metodu real-time PCR v simplexním uspořádání pro detekci viru LChV-1 ve své studii řešil Katsiani et al. (2018). Identita viru LChV-1 byla ověřena také pomocí HTS (Candresse et al. 2013). Pro virus LChV-1 byla vyvinuta detekční technika založená na jedнокrokové izotermální amplifikaci (reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP) (Tahzima et al. 2019). Mekuria et al. (2014) navrhl pro detekci viru LChV-2 izotermální metodu založenou na principu rekombinázové polymerázové amplifikace (reverse transcription-recombinase polymerase amplification, RT-RPA).

2.4 Viry jahodníku

Pěstování jahodníku má v České republice dlouholetou tradici a v posledních letech došlo k výraznému nárůstu zájmu malospotřebitelů o sadbu jahodníku. V České republice se v roce 2018 vyrobilo přibližně 7,3 miliónů sadby jahodníku. O dva roky později v roce 2020 bylo připraveno 12,6 milionů sazenic jahodníku. V roce 2020 byly jahodníky pěstovány na celkové ploše cca 1 625 ha a celková sklizeň se v roce 2020 pohybovala okolo 7 tisíc tun (Němcová & Buchtová 2021).

Rostliny jahodníků bývají napadány různými škůdci, širokým spektrem hub nebo viry, pro které bohužel neexistuje účinná chemická ochrana, pouze ochrana preventivního charakteru. Ta je zajištěna produkcí viruprostého rozmnožovacího materiálu, potlačením výskytu vektorů a dodržováním opatření v rámci agrotechnických zásahů (Babini et al. 2004). Virová onemocnění jsou významným faktorem, který negativně ovlivňuje výrobu certifikovaného sadbového materiálu jahod. V České republice se produkce rozmnožovacího materiálu řídí zákonem č. 219/2003 Sb. a navazující vyhláškou č. 96/2018 Sb. o množitelských porostech a rozmnožovacím materiálu ovocných rodů a druhů a jeho uvádění do oběhu.

Na jahodnicích parazituje spousta virů, avšak nejvýznamnějšími z ekonomického pohledu jsou viry, které ovlivňují výnos a produkci jahodníku v produkčních plochách. Mezi ty řadíme viry strawberry mild yellow edge virus (SMYEV), strawberry crinkle virus (SCV), strawberry vein banding virus (SVBV) a strawberry mottle virus (SMoV) (Spiegel & Martin 1998). Thompson et al. (2003) ve své práci popisuje, že se ztráty na výnosech mohou pohybovat od 30 % do 80 %. Výše ztrát závisí na tom, zda viry v rostlině přežívají samostatně nebo v komplexu s jinými mšicemi přenosnými viry.

2.4.1 Stručná charakteristika a symptomatologie virů jahodníku

2.4.1.1 Virus okrajového žloutnutí listů jahodníku - Strawberry mild yellow edge virus (SMYEV)

Virus SMYEV je zástupcem rodu *Potexvirus*, čeledi *Alphaflexiviridae*, jehož genom je tvořen jednou molekulou (+)ssRNA o velikosti 5 966 nukleotidů, počítáno bez polyadenylového konce (Thompson & Jelkmann 2004). Částice viru jsou vláknité o velikosti 480 × 13 nm (Jelkmann et al. 1990). Uspořádání genomu je typické pro potexviry, skládá se z pěti otevřených čtecích rámců (ORF), které kódují gen pro virovou RNA dependentní RNA polymerázu, triple gene block (TGB) a obalový protein (Lamprecht & Jelkmann 1997).

SMYEV se stal se prvním jahodníkovým virem, který byl klonován a sekvenován (Martin & Tzanetakis 2006). Kompletní nukleotidové sekvence pocházely z izolátu D74 z Německa a MY18 ze Severní Ameriky (Thompson & Jelkmann 2004).

Vyskytuje se po celém světě, poprvé byl popsán v roce 1922 v Kalifornii. Je přenášen mšicemi *Chaetosiphon fragaefolii* perzistentním způsobem, vyžaduje dobu nabývacího sání a přenosu přibližně 2 a 8 dní (Thompson & Jelkmann 2004). Virus je dále přenášen roubováním (Lamprecht & Jelkmann 1997) či vegetativním množením. Není známá rezistence jahodníku k viru SMYEV, avšak existují odrůdy, které jsou vůči viru tolerantní, virus v nich může přežívat v latenci a nezpůsobuje žádné příznaky. U citlivých kultivarů jahodníku se mohou vyvinout příznaky – zakrslost, okrajová chloróza nebo výskyt drobných plodů. Charakteristickým symptomem je žloutnutí okrajů listů, které zasahuje do mezižilkových pletiv (Maas 1998; Martin & Tzanetakis 2006).

2.4.1.2 Virus kadeřavosti jahodníku - Strawberry crinkle virus (SCV)

Virus kadeřavosti jahodníku, jehož genom je tvořen (-)ssRNA je taxonomicky zařazen do rodu *Cytorhabdovirus*, čeledi *Rhabdoviridae*. Baciloformní viriony jsou velké 74-88 nm × 163–383 nm (Posthuma et al. 2000). Schoen et al. (2004) uvádí, že genom viru SCV zahrnuje 14 547 nukleotidů a obsahuje sedm otevřených čtecích rámců (ORF) kódujících N, P2, P3, M, G, P6 a L proteiny. Genom viru sekvenoval i Koloniuk et al. (2018), ten analyzoval dva izoláty, jejichž délky byly 14 545 a 14 559 nukleotidů.

Onemocnění způsobené tímto virem bylo poprvé popsáno v roce 1932 v Oregonu (Zeller & Yaughan 1932). Virus je perzistentně přenášen mšicemi *Chaetosiphon fragaefolii* a *Chaetophon jacobii* (Richardson et al. 1972), mechanickým přenosem a vegetativním množením. Latentní doba viru je za optimálních podmínek od 10 do 19 dnů. Při nízkých teplotách účinnost přenosu klesá, což dokazuje nízký výskyt viru v chladnějších produkčních oblastech (Martin & Tzanetakis 2006).

Na citlivých kultivarech jsou příznaky viru charakterizované deformací listů, chlorotickými skvrnami a žloutnutím celých částí listů. Dalšími symptomy, které se mohou na rostlinách objevovat, jsou zakrnělost, deformita rostlin (Maas 1998), snížení výnosu jahod, zmenšení plodů a velikosti listů (Dara 2015).

2.4.1.3 Virus lemování žilek jahodníku - Strawberry vein banding virus (SVBV)

Virus lemování žilek jahodníku patří do rodu *Caulimovirus*, čeledi *Caulimoviridae* a do skupiny dsDNA-RT virů. Nukleotidová sekvence viru se skládá z kruhové molekuly dsDNA s jedním jednořetězcovým zlomem na každém vlákně DNA. Genom o velikosti kolem 8 kbp je rozdělen do sedmi otevřených čtecích rámců. Izometrické částice viru mají v průměr okolo 45 nm (Petrzik et al. 1998; Hull 2002).

Podle rešerše Chen et al. (2016) se virus vyskytuje po celém světě. Je přenášen mšicemi semiperzistentně *Chaetosiphon* sp. (Dickison et al. 2017) a roubováním (Petrzik et al. 1998).

Výraznější příznaky lze na rostlinách pozorovat v případech, že se u rostlin infikovaných SVBV vyskytují ještě další mšicemi přenosné viry. Ve své studii Chen et al. (2016) popisuje příznaky způsobené SVBV v rostlinách lesních jahodníků. Ty se na rostlinách projeví žloutnutím podél hlavních listových žil, nárůstem kratších stolonů, snížením růstu rostlin, menšími plody a významným snížením výnosu a kvality plodů.

2.4.1.4 Virus strakatosti jahodníku - Strawberry mottle virus (SMoV)

Virus strakatosti jahodníku z čeledi *Secoviridae* nebyl zatím taxonomicky zařazen do příslušného rodu. Zpočátku byl virus veden jako mírný kmen viru SCV. Později byl SMoV uznán jako samostatný virus, a to na základě způsobu přenosu mšicemi, neboť je mšicemi přenášen semiperzistentně, zatímco SCV perzistentně (Thompson & Jelkmann 2003).

Viriony jsou izometrické, mají přibližně 28 nm v průměru. Genom viru je tvořen dvěma segmenty (+)ssRNA. RNA1 je dlouhá 7 036 nukleotidů a RNA2 5 619 nukleotidů. RNA1 kóduje polyprotein P1 s doménami pro putativní RNA helikázu, C-proteázu a RNA-dependentní RNA polymerázu. RNA2 kóduje polyprotein P2, který obsahuje domény související s pohybem viru a enkapsidací a vykazuje podobnosti s doménou obalového proteinu Satsuma dwarf virus (Thompson et al. 2002; Bhagwat et al. 2016). V současné době jsou k dispozici sekvence devíti izolátů SMoV nalezených v České republice (Koloniuk et al. 2018) v Nizozemí (Thompson et al. 2002) a v Kanadě (Bhagwat et al. 2016).

SMoV je nejrozšířenějším zástupcem skupiny mšicemi přenosných virů napadajících rostliny jahodníku, vyskytuje se po celém světě. Mšicemi *Chaetosiphon fragaefolii* se přenáší semiperzistentním způsobem, potřebná doba pro nabytí viru je 4 - 6 hodin a pro přenos 2 - 3 hodiny (Thompson & Jelkmann 2003). Ciešlínska (2019) zmiňuje, že virus mohou přenášet i mšice *Aphis gossypii*.

Thompson et al. (2002) ve své práci popisuje, že ačkoliv jsou všechny druhy jahodníků (včetně komerčních odrůd) k viru SMoV náchylné, virus se většině případů vyskytuje latentně. Projeví-li se přeci jen nějaké symptomy, listy jsou malé, zkadeřené, okraje nažloutlé, stočené směrem nahoru. Infikované rostliny mohou mít růžicovitý vzhled.

2.4.1.5 Strawberry polerovirus-1 (SPV-1)

Nález SPV-1 je spojen s výskytem onemocnění odumírání jahodníku (strawberry decline, SD), které bylo vyvoláno synergickými účinky smíšené virové infekce, mezi jejíž příznaky patří zakrnělé listy, červenaní listů, křehké kořeny a malé plody (Martin & Tzanetakis 2013; Xiang et al. 2015). Protože toto onemocnění na východním pobřeží Kanady vážně zasáhlo školkařský průmysl, začal se jím Xiang et al. (2015) podrobněji zabývat a v roce 2013 identifikoval virus, který byl na základě fylogenetické analýzy zařazen do rodu *Polerovirus*, čeledi *Luteoviridae*.

Monitorováním SPV-1 u jahodníků, které vykazovaly podobné příznaky s onemocněním strawberry decline, se zjistilo, že se virus SPV-1 často vyskytuje v koinfekci s virem SMYEV (Xiang et al. 2015; Thekke-Veetil & Tzanetakis 2016). Na základě své studie Thekke-Veetil a Tzanetakis (2016) doporučují virus zařadit mezi viry, které se rutinně testují v rozmnožovacím materiálu, což by mohlo vést ke snížení jeho výskytu a šíření v komerčních výsadbách.

Výskyt viru byl také popsán v České republice a v Argentině (Luciani et al. 2016).

2.4.1.6 Strawberry virus 1 (StrV-1)

Strawberry virus 1 je jedním z virů, který byl objeven během řešení projektu zabývajícím se testováním virů jahodníku molekulárními metodami, konkrétně metodou HTS. Virus byl zařazen do rodu *Cytorhabdovirus*, čeledi *Rhabdoviridae*. Uspořádání jeho genomu je podobné ostatním známým rhabdovirům (Walker et al. 2011), s výjimkou jedinečného ORF (pojmenovaného P7) mezi geny G a L (Fránová et al. 2019). Další zmínka o témže viru byla zveřejněna Ding et al. (2019), který ho nazval strawberry-associated virus 1 (SaV1). V roce 2021 He et al. uvedli, že našli virus, který je vzdáleně příbuzný se SaV1 a je genetickou variantou StrV-1 (Fránová et al. 2019).

Na infikovaných rostlinách se většinou typické symptomy nevyskytují, zpravidla se jedná o nespecifické projevy, jako jsou např. předčasné červenaní, nepravidelné prosvětlování žilek listů, zakrslost nebo nekrózy. Virus je často v rostlinách přítomen v latentní podobě, kdy

je diagnostikován molekulárními metodami, avšak na rostlině nejsou patrné žádné projevy, které by poukazovaly na jeho přítomnost. Jak uvádí Fránová et al. (2019), mšice *Aphis fabae* a *A. ruborum* jsou hlavním vektorem, které virus přenáší. Dalším způsobem přenosu je vegetativní množení rostlin.

2.4.1.7 Olive latent virus 1 (OLV-1)

Olive latent virus 1 je dalším virem, který byl detekován během testování jahodníků molekulární metodou HTS (Fránová et al. 2019). Jedná se o virus, který patří do skupiny IV: (+)ssRNA, do rodu *Alphanecrovirus*, čeledi *Tombusviridae*. Jeho genom je velký asi 3,7 kbp a skládá se z pěti otevřených čtecích rámců (ORF), které kódují pět proteinů. ORF1 kódující 23 kDa polypeptid se pravděpodobně účastní replikace RNA (RNA-dependentní RNA polymerázu; RdRp). Pro pohyb mezi buňkami jsou potřebné malé peptidy o velikosti 8 kDa a 6 kDa, které jsou kódovány ORF2 a ORF3. ORF4 kóduje 30 kDa obalový protein, který je nezbytný pro sestavení částic viru a jejich systémové šíření (Félix et al. 2007; Varanda et al. 2014). První záznam o tomto viru pochází z jižní Itálie, kde byl detekován v olivovníku *Olea europaea* L. (Gallitelli & Savino 1985). Virus má široký okruh hostitelských druhů, byl nalezen např. v tulipánech (Kanematsu et al. 2001) v rajčatech (Borodynko et al. 2010) nebo v rostlinách citrusů (Martelli et al. 1996).

2.4.2 Diagnostické metody virů jahodníku

Aby rutinní diagnostika virů určená pro kontrolu zdravotního stavu rozmnožovacího materiálu nebo napadených rostlin v produkčních výsadbách jahodníku byla účinná, musí být rychlá a přesná. Spoléhat se na metody založené na principu hodnocení symptomů je z důvodu absence příznaků na rostlině jahodníku nedostačující (Thompson et al. 2003). Viry mohou v rostlině přežívat v latentní podobě, rostlina může být ve fázi, kdy ještě nelze vizuálně detekovat příznaky viru nebo není vhodné období, např. příliš vysoké teploty, kdy symptomy virů mizí.

Biologický indexing na bylinných indikátorech pro detekci virů jahodníku je sice metoda velmi přesnou, ale příliš pomalou a obtížně použitelnou pro větší počet vzorků. Tato metoda je vhodná pro základní výzkum biologie virů či pro testování rostlin zařazených jako matečnice v certifikačním schématu. Nevýhodou této metody je, že u smíšených jahodníkových infekcí není zaručeno, že bude přenesen celý komplex virů ze zdrojové rostliny a bude zaručena jejich přesná identifikace (Thompson et al. 2003).

Mikroskopické metody jsou obdobně jako biologické techniky vhodné pro výzkum biologických vlastností virů jahodníku. Metody jsou příliš finančně náročné a zdlouhavé pro rutinní testování velkého množství vzorků.

V současné době jsou sérologické metody pro rutinní diagnostiku rostlinných virů žádané, a to pro svou rychlost a cenu za jeden test. Tyto diagnostické metody lze aplikovat na celou škálu virů. Nevýhodou je, že pro přípravu protilátek určených k testování musí být k dispozici v dostatečné kvalitě určité množství testovaného viru. Ze skupiny mšicemi přenášených jahodníkových virů lze pouze SMYEV detekovat metodou ELISA, neboť virus má schopnost se v rostlině vyskytovat v dostatečné koncentraci nutné pro provedení sérologické detekce (Luciani et al. 2018). Komerčně vyráběné kity využívající imunochemickou metodu ELISA jsou také dostupné pro testování OLV-1.

Dle současného výzkumu se pro diagnostiku virů jahodníku SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 a nově detekovaných StrV-1 a OLV-1 jeví jako nejvhodnější molekulárně biologické metody. V odborné literatuře se pro viry jahodníku setkáme se spoustou navržených diagnostických systémů na principech PCR v simplexním nebo v multiplexním uspořádání (různé kombinace virů). Protože viry napadají hostitelské rostliny většinou v komplexech, je pro ně vhodné navrhnout diagnostiku v multiplexním uspořádání, tedy detekovat všechny viry v jednom testu. Uvedla bych zde souhrnně literární rešerši metod na principu PCR pro všechny uvedené viry jahodníku v různém multiplexním uspořádání.

Thompson et al. (2003) navrhl pro viry SCV, SMYEV, SVBV a SMoV multiplexní RT-PCR s gelovou vizualizací amplikonů. Součástí vývoje detekční metody jahodníku byla detekce transkriptu pro gen *ndh B*, který slouží jako marker pro kontrolu kvality izolace RNA a přípravy cDNA. Klasickou metodu RT-PCR v simplexním uspořádání použil Constable et al. (2010), který sledoval přítomnost virů (SCV, SMYEV, SVBV a SMoV) ve vzorcích jahodníků v závislosti na ročním období. Chang et al. (2007) zavedl systém detekce SMYEV, SMoV a SVBV na principu multiplexní RT-PCR s použitím templátu, který představoval současně izolovanou celkovou DNA a RNA. Byla publikována další detekční metoda pomocí klasické multiplexní RT-PCR, kde byly společně do detekčního systému zahrnuty viry SMYEV a SMoV (Zhihong et al. 2006).

Byla navržena real-time PCR detekce v simplexním uspořádání se sondami TaqMan a interkalačním barvivem (SYBR Green I) pro viry SMYEV, SMoV a SCV v komplexu s dalšími patogeny jahodníku (houby, bakterie) (Cubero et al. 2009). Mumford et al. (2004) vyvinul pro diagnostiku viru SCV metodu real-time PCR s využitím TaqMan sondy.

Pro virus SPV-1 je z literatury známa jeho detekce pouze v simplexním uspořádání (Thekke-Veetil & Tzanetakis 2016; Luciani et al. 2016). Pro detekci OLV-1 byly v odborné literatuře popsány různé modifikace metod založených na principu PCR, ty však byly většinou použity pro testování olivovníku, nikoliv jahodníku.

Izolace kvalitní RNA je často negativně ovlivněna přítomností vysokých koncentrací polysacharidů a fenolických látek. Vzhledem k její špatné kvalitě může docházet v reakcích RT-PCR k inhibicím, což může vést k falešně negativním výsledkům. Různými metodami izolace RNA v rostlinách jahodníku se ve svých experimentech zabýval Yu et al. (2012).

2.5 Viry rybízu

Rybíz patří do skupiny ovocných plodin „drobné ovoce“. Jeho pěstování má v České republice dlouholetou tradici. Plocha plodných produkčních výsadb červeného a bílého rybízu v roce 2019 představovala 534 ha a černého rybízu činila 320 ha. K polovině roku 2019 bylo z těchto ploch celkem sklizeno 1 214 t červeného a bílého rybízu a 264 t černého rybízu. Během roku 2018 se vyprodukovalo celkem 381 670 školkařských výpěstků rybízu (Němcová & Buchtová 2021).

Stejně jako rostliny jahodníku jsou rybízy napadány nebuněčnými organismy viry, před nimiž neexistuje ochrana. Jediným účinným opatřením je prevence v podobě produkce bezvirózního rozmnožovacího materiálu, potlačení výskytu vektorů a dodržování vhodných agrotechnických postupů (Babini et al. 2004). Kontrola zdravotního stavu rybízu je v České republice dána zákonem č. 219/2003 Sb., na který navazuje vyhláška č. 96/2018 Sb. o množitelských porostech a rozmnožovacím materiálu ovocných rodů a druhů a jeho uvádění do oběhu. Mezi důležité viry, které mohou ovlivňovat kvalitu výsledné produkce rybízu, jsou viry Blackcurrant reversion virus (BRV) a Gooseberry vein banding associated virus (GVBaV).

2.5.1 Stručná charakteristika a symptomatologie virů rybízu

2.5.1.1 Blackcurrant reversion virus (BRV, Virus zvratu rybízu)

Virus zvratu rybízu je taxonomicky zařazen do rodu *Nepovirus*, čeledi *Secoviridae*. Jeho částice jsou izometrické a mají průměr 27 nm. Genom viru je tvořen dvěma segmenty (+)ssRNA; RNA1 a RNA2, které mají délku 7 700 a 6 700 nt. Obě RNA na svých 3' koncích jsou polyadenylované. Na základě velikosti molekuly RNA2 je virus zařazen do třetí podskupiny nepovirů (Latvala et al. 1998).

První zmínky o výskytu viru pocházejí z Nizozemí a později z Anglie (Příbylová et al. 2002). Virus je přenášen roztočem vlnovníkem rybízovým (*Cecidophyopsis ribis*) (Jones 2000) a vegetativním množením rozmnožovacího materiálu (roubováním a očkovaním). Přestože je virus zařazen do rodu *Nepovirus* (viry přenášené nematody), je prvním zástupcem rodu, jehož vektorem nejsou nematoda, ale roztoči (Mažeikienė et al. 2019),

Pojmenování viru zvratu rybízu je odvozeno od symptomů, které virus na hostitelské rostlině vyvolává. Jedná se o příznaky, většinou u listů, kdy se rostlina svým vzhledem tzv. „navrací“ zpět k primitivnějším divokým formám rybízu. Napadené rostliny se nakonec stávají neproduktivními. Podle závažnosti příznaků na rostlinách se rozlišují dvě formy onemocnění, Evropská forma a závažnější forma R, která byla objevena ve Finsku a zemích bývalého Sovětského svazu. Listy většiny kultivarů rybízu jsou obvykle méně početné, jejich velikost se zmenšuje a listy díky vzniku nerovnoměrně zoubkovanému okraji a protáhlejšímu a užšímu tvaru svým vzhledem připomínají list kopřivy (Jones 2000).

2.5.1.2 Gooseberry vein banding associated virus (GVBaV)

Virus GVBaV patří do rodu *Badnavirus*, čeledi *Caulimoviridae* a představuje neobalené baciliformní částice, které měří 30 × 120 nm (Jones et al. 2001). Jeho genom o velikosti 7,1-7,6 kb je zastoupen cirkulární dsDNA-RT a obsahuje tři ORF. Funkce proteinu P1 není známa, P2 je spojen s virionem (virion-associated protein) a protein P3 je polyprotein tvořen pohybovým proteinem, obalovým proteinem, aspartátovou proteázou a RT/RNázou domény H1 (King et al. 2011).

Virus byl poprvé zaznamenán Blatným v bývalém Československu (Converse 1987). Vyskytuje se po celé Evropě a byl nalezen i v Severní Americe. Vektory, hlavně mšicemi *Aphis Grossulariae*, *Nasonovia ribisnigri* a *Hyperomyzus* spp., je virus přenášen semiperzistentním způsobem. Virus se snadno přenáší také vegetativním rozmnožováním – roubováním nebo očkovaním (Converse 1987).

Při napadení rostlin se onemocnění projevuje charakteristickým chlorotickým lemováním listové žilnatin. U některých kultivarů dochází k významnému snížení růstu a výnosu (Xu et al. 2011). U angreštu se příznaky projevují viditelněji než u černého a červeného rybízu (Jones et al. 2001). Účinná kontrola onemocnění způsobená virem GVBaV závisí na výsadbě zdravého rozmnožovacího materiálu a na kontrole a regulaci výskytu mšic (Jones 2000).

2.5.2 Diagnostické metody virů rybízu

Ze současného stavu poznatků o virech rybízu BRV a GVBaV vyplývá, že společná detekce těchto virů nebyla studována, problematika detekce virů byla ve většině případů řešena samostatně, a to s využitím metod založených na principu PCR nebo elektronové mikroskopie.

Vývojem detekčních metod na principu IC-RT-PCR (Immuno-capture reverse-transcriptase PCR) pro diagnostiku viru BRV se zabývali Latvala et al. (1997) a Lemmetty et al. (1997). Jejich metodiku později převzali Jones a McGavin (2002). Ti využili již publikovanou Lemmettyho sekvenci, pro jejíž amplifikaci navrhli nové primery s vyšší teplotou annealingu. V rámci další optimalizace metody použili nested PCR a upravili protokol pro izolaci RNA. Analýzu viru zvratu rybízu studovala i Příbylová et al. (2002). Virus detekovala pomocí elektronové mikroskopie a RT-PCR s gelovou vizualizací. Později virus sekvenovala (Příbylová et al. 2008). Metodou RT-PCR (BRV), elektronovou mikroskopií a sekvenováním (GVBaV) zkoumal viry rybízu Besse et al. (2010). Další metodou PCR pro detekci viru BRV byla metoda real-time PCR s využitím barviva SYBR Green (Zurn et al. 2019). V nedávné době byl výskyt virů BRV a GVBaV ověřen pomocí HTS (Rajamäki et al. 2019).

Jones et al. (2001) se během své studie viru GVBaV zabýval purifikací a izolací jeho DNA jako vstupního templátu pro jeho detekci metodou na principu klasické PCR. V rámci studia variability genomu viru GVBaV provedl Petrzik et al. (2012) kompletní genomovou sekvenaci izolátu viru získaného z červeného rybízu. Xu et al. (2011) zjišťoval sekvenováním a klonováním genetickou rozmanitost viru GVBaV a jeho fylogenetické zařazení do rodu Badnavirus.

3 Cíle a hypotéza disertační práce

Cílem disertační práce je vývoj a validace multiplexních detekčních systémů pro vybrané viry ovocných plodin na základě aktuálních požadavků v oblasti diagnostiky rostlinných virů a jejich využití v praxi.

Konkrétní cíle disertační práce byly formulovány takto:

- Vyvinout a validovat multiplexní detekční systém založený na principu real-time PCR pro viry maloplodosti třešně LChV-1 a LChV-2.
- Vyvinout a validovat multiplexní detekční systémy založené na principu real-time PCR pro viry jahodníku SMYEV, SCV, SVBV, SMoV, SPV-1, StrV-1 a OLV-1.

- Vyvinout a validovat multiplexní detekční systém založený na principu real-time PCR pro viry rybízu BRV a GVBaV.
- Pomocí validovaného detekčního systému pro viry maloplodosti třešně LChV-1 a LChV-2 provést průzkum výskytu virů v produkčních výsadbách třešní a višní.
- S využitím validovaného detekčního systému pro viry jahodníku stanovit hospodářskou škodlivost StrV-1.
- Na území ČR provést monitoring virů jahodníku SMYEV, SCV, SVBV, SMoV, SPV-1, StrV-1 a OLV-1,
- Pomocí validovaného detekčního systému pro viry rybízu BRV a GVBaV zmapovat výskyt virů v ČR.

Práce je založená na následujících hypotézách:

- PCR reakce probíhá v simplexním uspořádání se stejnými výkonnostními parametry jako reakce v multiplexním uspořádání a lze tak zvolit ekonomicky výhodné testování virů v jedné reakci.
- Nově objevené viry napadající ovocné plodiny způsobují hospodářské ztráty.

4 Metodika

Pro vývoj metod byly na základě aktuálních potřeb v oblasti rutinní diagnostiky vybrány viry maloplodosti třešně (LChV-1 a LChV-2), viry jahodníku (SMYEV, SCV, SVBV, SMoV, SPV-1, StrV-1 a OLV-1) a viry rybízu (BRV a GVBaV).

Testování výkonnostních charakteristik real-time PCR reakce všech vyjmenovaných virů probíhala podle postupu, který je doporučen organizací EPPO ve standardě PM 7/98 (5) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. V rámci vývoje a validace metod byly primárně na syntetických standardech testovány následující výkonnostní charakteristiky real-time PCR: specifická, senzitivita, opakovatelnost a reprodukovatelnost. Splněním všech požadavků uvedených v PM 7/98 (5) lze metodu na molekulárně biologickém principu považovat za validovanou.

Pro návrh detekčních systémů a jejich ověření byly používány různé laboratorní metody a postupy, jejichž metodika provedení byla shodná pro všechny skupiny vybraných virů. V následujícím textu budou představeny kroky, které vedly k analýze výkonnostních charakteristik real-time PCR reakce - specifická, senzitivita, opakovatelnost a reprodukovatelnost, následně budou popsány standardizované pracovní postupy používané v

akreditované laboratoři, podle kterých byly jednotlivé metody prováděny. Na závěr kapitoly bude uvedena metodika testování vedoucí k využití či ověření detekčních systémů v praxi.

4.1 Výkonnostní charakteristiky real-time PCR reakce

4.1.1 Specificita

Specificita pro vybrané viry byla nejprve ověřena *in silico*, poté s využitím syntetických standardů a následně na pozitivních a negativních vzorcích určité ovocné plodiny. V prvním kroku byla provedena rešeršní analýza aktuálně používaných detekčních metod. Pro každý virus byly porovnány jeho dostupné sekvence v databázích a v odborné literatuře. Na základě výsledků multiple-alignment analýz dostupných sekvencí provedené v programu Vector NTI Advance (Thermo Fisher Scientific) byly pro návrh primerů a sond vybrány nejvhodnější oblasti virových genomů. Při výběru vhodné oblasti bylo primárně přihlíženo k tomu, aby tento úsek byl specifický pro daný patogen a zároveň dostatečně konzervovaný, aby byly detekovány všechny případné kmeny konkrétního viru. Navržená cílová oblast byla ještě analyzována pomocí Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), aby byl vyloučen výskyt této oblasti u příbuzných organismů. Pro návrh primerů a sond a pro porovnávání jednotlivých sekvencí byl použit program Vector NTI Advance (Thermo Fisher Scientific).

Protože byly detekční systémy vyvíjeny vždy v multiplexu, byla specificita jednotlivých složek multiplexu testována jak v simplexním, tak i v multiplexním uspořádání. K tomuto testování sloužily syntetické standardy typu Ultramer. Pro další analýzy bylo nezbytné, aby PCR v simplexním i multiplexním uspořádání vykazovala 100% specificitu.

Pro zajištění maximální specificity detekčních systémů byly ještě systémy testovány na vzorcích pocházejících z rostlinného materiálu. Materiál různé povahy (produkční výsadby, rozmnožovací materiál, vzorky pocházející z genofondů, nakoupená sadba v obchodech) byl odebrán v různých lokalitách České republiky. Z rostlinného materiálu byla izolována RNA, ze které byla připravena cDNA, která sloužila k dalším analýzám, jejímž cílem bylo zachytit co nejvíce kmenů virů s odlišnou sekvencí. Variabilita sekvencí pak byla využita v konkrétních případech ke zvýšení specificity detekčních systémů, a to v případě potřeby úpravou systému primerů a sond.

4.1.1.1 Viry způsobující maloplodost třešně

Na základě výsledků literární rešerše byla provedena multiple-alignment analýza vybraných sekvencí pro viry LChV-1 a LChV-2. V databázi GenBank byla pro návrh primerů a sond pro detekci viru LChV-1 jako referenční sekvence vybrána sekvence č. Y10237 a pro LChV-2 sekvence č. AF531505. V případě viru LChV-2 se jednalo o sekvenci kmene USA6b, kterou se ve své studii zabývali Rott a Jelkmann (2005). Pomocí BLAST byla vyloučena přítomnost navržené oblasti u příbuzných virů. Navržené primery byly samostatně bez sondy vyzkoušeny na pozitivních a negativních vzorcích rostlinné povahy end-point PCR metodou dle níže uvedených postupů. Pro ověření specifity byl pro detekci LChV-1 použit pár primerů LCH1_7634F a LCH1_7942R (Jelkmann et al. 2008) a pro detekci LChV-2 pár primerů LCV2LO2 a LCV2UP2. Amplikony u pozitivních vzorků byly vyříznuty z gelu a purifikovány kitem GeneAll Expin Combo GP. Získané fragmenty DNA byly sekvenovány pomocí osmikapilárního genetického analyzátoru AB 3500.

4.1.1.2 Viry jahodníku

Pro analýzu variability dostupných sekvencí jednotlivých virů jahodníku pocházejících z odborné literatury a databáze GenBank byla použita metoda multiple alignment. Ze všech vybraných konzervovaných oblastí genomů izolátů pro daný virus byly vybrány referenční sekvence, které vykazovaly nejvyšší shodu. V Tabulce 1 je uveden přehled referenčních sekvencí, které byly vybrány v GenBanku a následně použity pro návrh primerů a sond.

Tabulka 1. Referenční sekvence pro viry jahodníku

Název viru	Referenční sekvence
SMYEV	NC_003794, KR350471
SCV	MH129615, MH129616, AY331387
SVBV	NC_001725, KX950840
SMoV	NC_003445, KU200457
SPV-1	NC_025435
StrV-1	MK211270, MK211271, MK211272
OLV-1	NC_001721

Pro návrh primerů a sond a pro ověření specifity detekčních systémů StrawVir I, určeného pro multiplexní detekci virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1, a StrawVir II pro viry StrV-1 a OLV-1 byl vytvořen soubor 422 vzorků. Analyzované vzorky byly získány z různých lokalit a byly různého původu - produkční výsadby, nakoupená sadba, rozmnožovací materiál. Všechny odebrané vzorky listů byly ihned po odběru šokově zmrazeny tekutým dusíkem a uloženy v -80 °C v 2ml mikrozkuřkách. Po ukončení odběrů vzorků jahodníku

byla pomocí uvedených postupů níže ze zmražených vzorků izolována RNA a následně z ní připravena cDNA. V případě potřeby úpravy detekčního real-time PCR systému byla provedena PCR reakce s využitím gelové elektroforézy. Amplikony u pozitivních vzorků byly vyříznuty z gelu, přečištěny a sekvenovány.

4.1.1.3 Viry rybízu

Bylo provedeno porovnání dostupných sekvencí virů BRV a GVBAV získaných z odborné literatury a databáze GenBank. Jako referenční sekvence byla pro návrh primerů a sond pro BRV použita sekvence GenBank číslo NC_003509 pro segment 1 a NC_003502 pro segment 2; pro GVBAV sekvence GenBank číslo NC_018105. Specifická real-time PCR systému byla ověřena na pozitivních a negativních vzorcích, které byly získány z různých lokalit na území České republiky. Celkem bylo odebráno 204 vzorků listů černého, červeného a bílého rybízu. Odběry byly rozděleny do 5 kategorií – produkční výsadby, soukromé zahrádky, materiál pro výzkumné účely, nakoupená sadba, genofondy (genetické zdroje).

Z odebraných vzorků byla izolována RNA, následně z ní připravena cDNA, která sloužila jako vstupní materiál do PCR reakce. Nejdříve byly vzorky testovány na přítomnost BRV a GVBAV metodou end-point PCR s gelovou vizualizací na 1,5 – 3% agarózovém gelu za použití tzv. vnějších primerů. Tyto primery amplifikovaly oblast genomu viru, uvnitř které byly navrženy primery a sondy detekčního systému pro real-time PCR reakci. Amplikony u pozitivních vzorků byly vyříznuty z gelu, přečištěny a sekvenovány. Na základě srovnání získaných sekvencí byl stanoven popis genetické variability kmenů jednotlivých virů. Tato informace byla zohledněna při návrhu primerů a sond detekčního real-time PCR systému v multiplexním uspořádání. Dále byla pomocí syntetických standardů a přirozeně infikovaných vzorků testována specifická virů BRV a GVBAV v multiplexním a simplexním uspořádání.

4.1.2 Senzitivita

Pro každý detekční systém byla pomocí syntetického standardu příslušného viru stanovena senzitivita. Ze syntetické pozitivní kontroly o známé koncentraci 1 µg/µl bylo pro LChV-1 připraveno takové ředění, aby bylo v PCR 20 000, 2 000 a 200 kopií/reakce a pro LChV-2 26 000, 10 400 a 5 200 kopií/reakce. Pro viry rybízu a jahodníku byla připravena taková ředění, která odpovídala následujícímu počtu kopií v PCR - 100 000, 50 000, 5000, 500, 50, 5 kopií/reakce. Koncentrace byla na kopie přepočítána pomocí DNA Calculator; <http://www.molbiotools.com/dnacalculator.html>. Byla stanovena senzitivita jak v

multiplexním, tak v simplexním uspořádání a analytická senzitivita. Multiplexní systémy musí mít srovnatelnou senzitivitu i kinetiku se simplexní reakcí. Analytická senzitivita byla stanovena jako nejnižší dosažené ředění (limitní ředění), při kterém byly všechny testované vzorky daného ředění pozitivní s nezměněnými amplifikačními parametry. Pro limitní ředění byla stanovena směrodatná odchylka a variační koeficient analyzovaných vzorků.

Ze závislosti hodnot Ct na koncentraci byla pro každý virus pomocí softwaru cyklu Rotor-Gene Q 5 plex HRM Platform sestrojena kalibrační křivka. Ze sklonu amplifikačních křivek (M) byla určena hodnota účinnosti amplifikace (Efficiency). Spolehlivost PCR reakce byla dána korelačním koeficientem lineární regrese (R^2).

4.1.3 Opakovatelnost

Opakovatelností metody se rozumí stanovení variability měření při analýze vzorků, kterou provádí stejná osoba za identických podmínek. Pro kvalitativní analýzu byla opakovatelnost stanovena jako procento pozitivních nálezů ze všech provedených testů pro každý virus. Opakovatelnost byla stanovena při limitním ředění syntetického standardu, které bylo zjištěno při stanovení analytické senzitivity. Pro vlastní analýzu byly připraveny tři série v opakování po osmi vzorcích o stejné koncentraci, které byly analyzovány v rámci jednoho PCR běhu za identických podmínek jedním pracovníkem.

U každé série byl stanoven variační koeficient a celkový průměrný variační koeficient pro porovnání variability získaných hodnot Ct mezi jednotlivými sériemi.

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 %).

4.1.4 Reprodukovatelnost

Reprodukovatelností se rozumí stanovení variability měření při analýze vzorků, které nezávisle na sobě provádějí různí pracovníci. Pro kvalitativní analýzu byla reprodukovatelnost stanovena jako procento pozitivních nálezů ze všech provedených testů pro každý virus. Reprodukovatelnost byla určena při limitním ředění syntetického standardu, které bylo zjištěno při stanovení analytické senzitivity. Pro analýzu byly připraveny tři série v opakování po osmi vzorcích, které se analyzovaly ve třech nezávislých PCR bězích provedených různými pracovníky.

Pro každou sérii vzorků byl stanoven variační koeficient, který sloužil pro porovnání variability získaných hodnot Ct mezi jednotlivými pracovníky. Opakovatelnost a reprodukovatelnost poskytuje informace o úrovni nejistoty výsledku testu (EPPO 2021b).

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 %).

4.2 Použité laboratorní metody a postupy

Vlastní metodiku pro detekci rostlinných virů v rostlinném materiálu lze rozdělit do třech fází - **preanalytická fáze** - odběr vzorků, přeprava vzorků, příjem vzorků do laboratoře, **analytická fáze** - izolace RNA, reverzní transkripce, end-point PCR, real-time PCR reakce, Sangerovo sekvenování, izolace DNA z gelu a **postanalytická fáze** - vyhodnocení, analýza dat.

4.2.1 Preanalytická fáze

Velice důležitým a kritickým bodem v diagnostice rostlinných virů je odběr vzorků, a to jak z hlediska doby odběru, tak i odebírané části rostlin. Aby byla zajištěna co nejvyšší koncentrace viru v rostlině, byl odběr rostlinného materiálu prováděn převážně v jarních měsících (březen až květen). V případě virů maloplodosti LChV-1 a LChV-2 a rybízových virů BRV a GVBaV byly odebírány letorosty nebo mladé listy. Pro detekci jahodníkových virů byly odebírány mladé listy. Pro rutinní diagnostiku, kdy je potřeba testovat vzorky i během roku, lze rostlinný materiál odebírat až do konce října. Protože se viry v rostlinách vyskytují nerovnoměrně, byly vzorky listů nebo letorostů odebírány po celém obvodu stromu či keře, ze všech světových stran. Celkem bylo odebíráno 8 -12 listů nebo 4 letorosty. U jahodníku byla odebrána ze čtyř trojčetných listů vždy jedna třetina. Odebrané a náležitě označené vzorky byly co nejrychleji dopraveny do laboratoře, v případě teplejších dnů byly vzorky ihned po odběru vloženy do předchlazené polystyrenové nádoby, a poté dopraveny do laboratoře.

Po evidenci vzorků byl rostlinný materiál okamžitě zpracován, nebo byl ve 2ml zkumavkách šokově zamrazen v tekutém dusíku a do doby zpracování uchován v mrazicím boxu při teplotě $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.2 Analytická fáze

Z odebraných vzorků byla izolována celková RNA, která byla reverzní transkripcí přepsána do cDNA. Ta byla podle potřeby analyzována buď metodou real-time PCR nebo

end-point PCR. Vzorky určené k sekvenování byly vyříznuty z gelu a purifikovány. Přečištěné fragmenty DNA byly použity jako vstupní materiál pro Sangerovo sekvenování.

4.2.2.1 Izolace RNA

Izolace RNA byla provedena komerčním kitem Ribospin™ Plant, (GeneAll Biotechnology, Co., Ltd.) na bázi kolon podle návodu výrobce. Homogenizace vzorku byla provedena v tekutém dusíku s navázkou 50 mg. V případě čerstvého materiálu byla z každého listu odebrána část, která byla homogenizována v předem tekutým dusíkem vymražené třecí misce. U vzorků, které byly ihned po odběru zamrazeny, homogenizace probíhala obdobně. Natřený prášek v množství 50 mg byl přenesen do 2ml zkumavky, do které bylo přidáno 450 μ l pufru RPL, obsah byl vortexem promíchán a inkubován 3 minuty při laboratorní teplotě. Směs byla přenesena pomocí ustřižené špičky na EzPure kolonku (žlutá barva) a centrifugována 2 minuty při otáčkách 12 000 RPM. 350 μ l proteklého lyzátu bylo přeneseno do nové 1,5ml zkumavky, do které bylo přidáno 350 μ l 70% etanolu. 700 μ l vzniklé směsi bylo odebráno na kolonku (typ W), centrifugováno 1 minutu při 12 000 RPM. Proteklá tekutina byla ze sběrné zkumavky vylita a na kolonku bylo přidáno 500 μ l pufru RBW. Vzorek byl centrifugován 1 minutu při 12 000 RPM, proteklá tekutina byla opět odstraněna a na kolonku byla přidána směs 2 μ l DNase I a 70 μ l pufru DRB. Vzorek byl inkubován 10 minut, na kolonku bylo přidáno 500 μ l pufru RBW, proběhla další inkubace vzorku 2 minuty, vzorek byl 1 minutu při 12 000 RPM centrifugován. Proteklá tekutina byla vylita do odpadu, na kolonku bylo přidáno 500 μ l pufru RNW a byla centrifugována 1 minutu při 12 000 RPM. Tento krok s přidávkem pufru RNW byl zopakován ještě jednou. Pro odstranění zbytku pufru RNW byl vzorek centrifugován 1 minutu při 12 000 RPM. Po stočení byla kolonka typu W opatrně přenesena do nové 1,5ml zkumavky, na kolonku bylo přidáno 50 μ l RNase-free vody, vzorek se nechal stát 1 minutu při laboratorní teplotě a nakonec byl centrifugován 2 minuty při 12 000 RPM. Ihned po izolaci byla pomocí spektrofotometru Nanodrop Lite stanovena koncentrace a čistota izolované RNA (poměr absorbancí A260/A280). Izolovaná RNA by měla mít čistotu alespoň 1,8. Získaná RNA byla po změření okamžitě zamrazena v mrazicím boxu při teplotě -80 °C a dále použita pro další krok - reverzní transkripci.

4.2.2.2 Reverzní transkripce

Pro přípravu cDNA byly do 0,2ml PCR zkumavky pipetovány 4 μ l náhodných primerů o koncentraci 50 ng/ μ l (Roche), 1 μ l 10 mM dNTPs (Genaxxon,), 1- 5 μ l celkové RNA (celkové

množství RNA v reakci do 1 µg) a do celkového objemu reakční směsi 13 µl byla přidána RNase-free voda. Směs ve zkumavce byla zahřata v PCR cykleru na 65 °C po dobu 5 minut. Po uplynutí této doby byl vzorek prudce zchlazen ve vymraženém kovovém stojánku a krátce centrifugován. Poté byly přidány 4 µl 5× First-Strand Buffer, 2 µl 0,1 M DTT a 1 µl (200 U) M-MLV reverzní transkriptázy (vše je součástí M-MLV Reverse Transcriptase, 200 U/µl (Invitrogen)). Zkumavka s reakční směsí o objemu 20 µl byla vložena zpět do cykleru, ve které byl nastaven následující teplotní profil: 37 °C/2 min, 25 °C/10 min, 37 °C/50 min a finální zchlazení 4 °C. Takto připravená cDNA byla použita dál do vlastní real-time PCR reakce nebo byla uložena v mrazicím boxu v -20 °C.

4.2.2.3 Real-time PCR reakce

PCR reakce probíhala ve 20 µl reakční směsi, která obsahovala 10 µl qPCR 2x Blue Master Mix (Top-Bio), 7 µl RNase free vody, 1 µl specifického premixu, jehož součástí byly primery a sondy specifické pro konkrétní virus a 2 µl cDNA vzorku. Real-time PCR analýza probíhala v real-time PCR cykleru Rotor-Gene Q 5 plex HRM Platform (Qiagen) s využitím sond. V navrhnutých systémech byly dle účelu použity sondy s následujícími fluorofory: FAM – zelený kanál, HEX – žlutý kanál, ROX – oranžový kanál, Cy5 – červený kanál a IRDye700 – karmínový kanál. Primery a sondy byly navrženy tak, aby bylo možné použít univerzální teplotní profil. Teplotní podmínky PCR: počáteční denaturace 94 °C 5 min, 50 cyklů: denaturace 94 °C 20 s, hybridizace primerů 58 °C 20 s; čtení v příslušném barevném kanálu, elongace 72 °C 20 s.

4.2.2.4 End-point PCR

PCR reakce probíhala ve 20 µl reakční směsi, která obsahovala 10 µl qPCR 2x Blue Master Mix (Top-Bio), 7 µl RNase free vody, 1 µl specifického premixu, jehož součástí byly primery specifické pro konkrétní virus a 2 µl cDNA vzorku. PCR analýza probíhala v PCR cykleru BIO-RAD, C1000 Touch. Teplotní podmínky PCR byly: úvodní denaturace: 94 °C 5 min, 40 cyklů: 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 1 cyklus: 72 °C 5 min a finální chlazení: 8 °C do manuálního ukončení. Vzorky byly po ukončení PCR reakce vizualizovány pomocí gelové elektroforézy na 1,5% - 3% agarózovém gelu, hustota gelu odpovídala velikosti detekovaného amplikonu.

4.2.2.5 Purifikace DNA fragmentů z gelu

Izolace DNA fragmentů byla provedena komerčním kitem GeneAll Expin Combo GP, (GeneAll Biotechnology) na bázi kolon. Z gelu na UV prosvětlovači byly vyříznuty proužky odpovídající testovaným virům. Poté byly přeneseny do 1,5ml zkumavky a bylo přidáno 500 μ l pufru GB. Vyříznutá část gelu se nechala při pokojové teplotě rozpustit. Po rozpuštění v případě, že byl izolován fragment DNA kratší než 200 bp, bylo do zkumavky přidáno 100 μ l isopropanolu. Směs byla přenesena na SV kolonku, která byla umístěna ve sběrné zkumavce. Poté byla centrifugována 1 minutu při 12 000 RPM, proteklá tekutina byla vylita a na kolonku bylo přidáno 500 μ l pufru GB. Opět proběhla centrifugace 1 minutu při 12 000 RPM, proteklá tekutina byla vylita a na kolonku bylo přidáno 700 μ l pufru NW. Vzorek se nechal inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě a poté byl centrifugován 1 minutu při 12 000 RPM, proteklá tekutina byla vylita a kolonka ve sběrné zkumavce bez přidavku dalšího pufru byla centrifugována 1 minutu při 12 000 RPM, aby došlo k úplnému odstranění pufru NW. Po stočení se SV kolonka opatrně vsunula do čisté 1,5ml zkumavky, na kolonku bylo přidáno 30-100 μ l pufru EB (podle koncentrace PCR produktu) a byla 1 minutu inkubována při laboratorní teplotě. Centrifugací po dobu 1 minuty při 12 000 RPM byla DNA eluována do zkumavky. Eluovaná DNA byla ihned zamrazena v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo použita do sekvenační reakce.

4.2.2.6 Sekvenování PCR produktů

Sekvenační reakce byla připravena pomocí kitu BigDye Terminator RR kit v3.1 (Thermo Fisher Scientific) nebo kitu Gerbera Sequencing Kit v3.1 (SEQme). Reakční směs o objemu 10 μ l obsahovala 2 μ l BigDye Terminator RR kit v3.1, 1 μ l BigDye Seq buffer 5x, 1 μ l primeru (5 μ M) a 6 μ l PCR purifikovaného produktu. Připravená sekvenační reakce v 0,2ml zkumavce byla vložena do cykleru BIO-RAD, C1000 Touch. Teplotní podmínky PCR reakce byly: 1 cyklus: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 35 cyklů: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 4 min, finální chlazení 8 $^{\circ}\text{C}$. Po ukončení PCR běhu bylo k sekvenační reakci přidáno 45 μ l SAM Solution a 10 μ l BigDye XTerminator Solution (Thermo Fisher Scientific). Vzorek byl ve vortexu třepán 30 minut. Následně byl stočen 2 minuty ve stolní centrifuze a pipetován do sekvenační destičky, ve které byl analyzován na osmikapilárním genetickém analyzátoru ABI 3500 (Thermo Fisher Scientific).

4.2.3 Post-analytická fáze

V této fázi byla vyhodnocována data získaná real-time PCR, end-point PCR metodou a sekvenováním.

4.2.3.1 Real-time PCR

Vyhodnocení real-time PCR reakce bylo prováděno odečtením hodnot Ct vzorků v příslušném barevném kanálu. Současně byl vyhodnocován i systém kontrol zajišťující validitu výsledků, zejména se jednalo o Interní kontrolu kvality (IPC), kontrolu kvality PCR reakce (syntetická pozitivní kontrola) a negativní kontrolu.

Interní kontrola kvality byla do testování zařazena jednak pro kontrolu izolace RNA a přípravy cDNA a zároveň sloužila jako inhibiční kontrola PCR reakce. Jednalo se o detekci mitochondriálního transkriptu *Nad5*. Protože tento gen je přítomen v každé rostlině a PCR reakce každého vzorku musí vyjít pozitivně, lze na základě výsledků získaných dlouhodobým testováním mitochondriálního transkriptu *Nad5* definovat rozmezí hodnot Ct pro daný ovocný druh. IPC byla testována jako samostatná PCR reakce nebo v případě, že byl v multiplexním uspořádání volný karmínový kanál, byla testována v multiplexu přímo s detekovanými viry.

Syntetická pozitivní kontrola (syntetický standard pro konkrétní virus) byla komerčně připravena v podobě tzv. ssDNA Ultrameru (IDT), jehož sekvence pokrývala cílovou oblast detekce daného viru. Ultramer byl z původní koncentrace 1 µg/µl naředěn na koncentraci 2 pg/µl a použit jako pozitivní kontrola pro přípravu a průběh PCR reakce. Pro testování syntetických pozitivních kontrol bylo definováno rozpětí hodnot Ct. Negativní kontrola (PCR reakce bez přidaného templátu, tzv. netemplátovaná kontrola - NTC) byla testována v každém PCR běhu.

4.2.3.2 End-point PCR

Amplikony získané metodou end-point PCR byly po separaci na agarózovém gelu hodnoceny na základě velikostí. Souběžně byly hodnoceny i pozitivní a negativní kontroly, které byly zařazovány do každého PCR běhu.

4.2.3.3 Sekvenování

Získané sekvence byly analyzovány v programu Chromas a porovnány se sekvencemi uloženými v databázi GenBank.

4.3 Využití detekčních systémů v praxi

4.3.1 Viry způsobující maloplodost třešně

Detekční systém pro viry maloplodosti třešně byl ověřen na souboru vzorků, které byly odebrány pro testování virů v rámci spolupráce s Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským (ÚKZÚZ). Cílem bylo provést průzkum výskytu virů v různých produkčních výsadbách třešňi a višňi v České republice. Dle standardizovaných postupů bylo odebráno a na viry LChV-1 a LChV-2 v naší laboratoři testováno celkem 222 vzorků. Byla hodnocena přítomnost virů LChV-1 a LChV-2 v závislosti na odrůdě a stáří výsadby.

4.3.1.1 Metodika experimentu

Protože se jednalo o spolupráci s ÚKZÚZ, v naší laboratoři byla testována pouze část všech vzorků odebraných v rámci průzkumu výskytu virů maloplodosti třešně. Níže uvedený postup bude popisovat pouze část experimentu, která byla provedena v naší laboratoři. V březnu 2021 bylo na území Těchlovic, jedné z největších historických pěstitelských oblastí třešňi v České republice, ve 37 různých výsadbách testováno po šesti stromech. Jednotlivé výsadby se od sebe lišily ve vybraných odrůdách a ve stáří stromů. Hodnoceny byly odrůdy třešňi Kordia, Regina, Grace Star, Tamara, Napoleonova, Těchlovan, Karešova, Carmen a Burlat. Co se týkalo stáří výsadby, byly testovány stromy, které byly vysázeny mezi lety 1977 - 2019. Aby byla zajištěna co největší reprezentativnost vzorku, byly ze všech světových stran z každého sledovaného stromu odebrány čtyři letorosty. Poté byly výhony ponechány rašit při laboratorní teplotě do fenologické fáze BBCH 53, ve které dochází k prasknutí pupenů, oddělování šupin a ke zviditelnění světla zelených částí. V této fenofázi byly pupeny odebrány do 2ml zkumavky a do doby zpracování uskladněny při -80 °C. Všechny takto zpracované vzorky byly postupně testovány pomocí výše uvedených postupů. Pro detekci virů LChV-1 a LChV-2 použila obě pracoviště multiplexní real-time PCR systém vyvinutý v naší laboratoři.

4.3.2 Viry jahodníku

4.3.2.1 Hodnocení hospodářské škodlivosti

Pro jahodníky byly navrženy dva diagnostické systémy, StrawVir I pro detekci virů SMYEV, SCV, SVBV, SMOV a SPV-1 a StrawVir II pro detekci virů StrV-1 a OLV-1. Během let 2019 – 2021 byly pozorovány a detekčními soupravami StrawVir I a StrawVir II testovány

dvě skupiny (A, B) rostlin jahodníku, které byly zastoupeny dvěma odrůdami Karmen a Darselect. V každé skupině a odrůdě byly hodnoceny StrV-1 pozitivní rostliny a rostliny na virus negativní. StrV-1 pozitivní rostliny byly uměle očkovány roubováním listů pocházejících z infikovaných rostlin. U všech rostlin byla hodnocena hospodářská škodlivost podle následujících parametrů: vizuální symptomy na rostlině, násada květů, hmotnost a velikost plodů, obsah refraktometrické sušiny, pevnost dužniny a nárůst zelené hmoty včetně počtu šlahounů.

4.3.2.1.1 Testování a příprava rostlin

Aby bylo zajištěno, že vstupní rostliny nejsou infikovány nejvíce rozšířenými jahodníkovými viry, byl před zahájením pokusu detekčním kitem StrawVir I a StrawVir II testován zdravotní stav všech použitých rostlin. Kit StrawVir II byl dále používán při kontrole přítomnosti StrV-1 v pozitivních rostlinách. Tímto kitem byly rostliny testovány dvakrát ročně, před a po ukončení produktivní sezóny jahodníků. Vzorky byly odebírány a zpracovány laboratorními metodami a postupy uvedenými v kapitole 4.2.

Pro testování hospodářské škodlivosti viru StrV-1 byly do květináčů nasázeny rostliny, které byly testovány s negativním výsledkem metodou real-time PCR na viry SMYEV, SCV, SVBV, SMoV, SPV-1 a StrV-1 a metodou ELISA na viry RpRSV, SMYEV, ArMV, TBRV a SLRSV. Pro testování ELISA byly využity komerční kity od firmy Bioreba. Viruprosté rostliny byly umístěny v izolaci, kde byly ochráněny před možnými okolními infekcemi. V dubnu 2019 bylo v rámci souboru rostlin A nasázeno a testováno na výše uvedené viry celkem 104 rostlin odrůdy Karmen a 104 rostlin odrůdy Darselect. Z tohoto počtu zůstalo k dispozici pro roubování celkem 92 rostlin odrůdy Karmen a 92 rostlin odrůdy Darselect. V červenci 2019 byly na rostliny roubovány listy pocházející z donorových testem ověřených StrV-1 pozitivních a StrV-1 negativních rostlin *Fragaria vesca* klon EMK. U každé odrůdy byla naroubována vždy polovina rostlin pozitivními donorovými rostlinami a polovina negativními. Naroubované rostliny byly přeneseny do dvou síťových izolátorů, pozitivní a negativní rostliny zvlášť.

Soubor rostlin B byl připraven obdobným způsobem, jako soubor A. Rostliny byly do květináčů vysázeny v dubnu 2020, 50 rostlin odrůdy Karmen a 50 rostlin odrůdy Darselect. Přeživší rostliny byly naroubovány v červenci 2020 a umístěny do síťových izolátorů. V Tabulce 2 je uveden počet rostlin, které se účastnily hodnocení hospodářské škodlivosti. Celkem tedy bylo hodnoceno 114 rostlin, s tím že ve skupině A probíhalo hodnocení ve dvou letech.

Tabulka 2. Počet rostlin, které byly předmětem hodnocení hospodářské škodlivosti, uvedeno včetně odrůd

Hodnocené rostliny (n)	Darselect StrV-1 (+)	Darselect StrV-1 (-)	Karmen StrV-1 (+)	Karmen StrV-1 (-)
Skupina A – 1. rok	5	20	10	20
Skupina A – 2. rok	5	20	10	20
Skupina B – 1. rok	15	7	19	18
Celkem rostlin v rámci odrůdy	20	27	29	38
Celkem rostlin na odrůdu		47	67	
Celkem rostlin		114		

4.3.2.1.2 Hodnocení rostlin

4.3.2.1.2.1 Vizuální symptomy na rostlině

V období od druhé poloviny dubna 2020 a 2021 byla prováděna kontrola symptomů 1x za 14 dní až do konce plodnosti jahodníku. Hodnocen byl celkový vzhled rostliny, symptomy na listech, šlahounech, květech a plodech. Popis symptomů se prováděl na základě následujícího hodnocení: 0 bez příznaků, 1 příznaky, N nehodnoceno (v době prohlídky nebyla hodnocená část rostliny k dispozici).

Škála hodnocených příznaků:

- a) celkový vzhled rostliny – zakrslost, rostlina celkově neprospívá
- b) viditelné příznaky na listech – chlorotické a nekrotické léze, mozaiky, skvrnitost, žloutnutí žilek, žloutnutí listů
- c) viditelné deformace listů – zúžení, vrásčitost, kroucení do stran, kadeření, epinastie (nerovnoměrný růst vrchní strany listu, vlivem epinastie dochází k jeho svinování směrem dolů), vadnutí listů, délka řapíků, ozubení listové čepele
- d) viditelné příznaky na květech – počet a barva okvětních lístků, tvar a umístění kališních lístků
- e) růst nových šlahounů – délka šlahounů, nově se vytvářející rostlina na konci šlahounů – abnormální vzhled

4.3.2.1.2.2 Násada květů

V období kvetení se na rostlině jahodníku hodnotil počet květů. Pro každou rostlinu se zaznamenal počet květů a počet květenství.

4.3.2.1.2.3 **Hmotnost a velikost plodů**

Sbíraly se všechny plody sledovaných rostlin ve sklizňové zralosti a vážily se na digitálních váhách s přesností na jedno desetinné místo. Měření jahod se provádělo v nejširší části plodu pomocí posuvného měřítka s přesností na 1 mm. Plody se sklízely a vážily včetně kališních lístků a stopky. Na základě své hmotnosti a velikosti byly plody tříděny dle obchodní normy EU (č. 843/2002) do jakostních tříd: Výběr, I. Jakost, II. jakost a nestandard.

4.3.2.1.2.4 **Obsah refraktometrické sušiny**

Parametr měření obsahu refraktometrické sušiny (cukernatost) v plodech sloužil k hodnocení vnitřní kvality plodů. Měření se provádělo pomocí digitálního refraktometru HI 96801 (HANNA instruments, USA) v jednotkách % Brix na principu optické metody založené na lomu světla. Cukernatost byla hodnocena u všech plodů, které byly zváženy, změřeny a byly zařazeny do jakostní třídy.

4.3.2.1.2.5 **Pevnost dužniny**

Dalším znakem hodnocení vnitřní kvality plodů byla penetrace (pevnost plodů), která byla měřena pomocí přístroje Durofel (Copa-Technology, Francie) v jednotkách durofel unit. Pevnost plodů byla stanovena u všech sebraných plodů hodnocených rostlin.

4.3.2.1.2.6 **Nárůst zelené hmoty**

V rámci tohoto parametru byla u každé rostliny hodnocena celková hmotnost nadzemních částí rostlin, hmotnost listů a počet nově narostlých šlahounů.

4.3.2.2 **Monitoring virů jahodníku na území ČR**

Pro účely zmapování výskytu jednotlivých virů v populaci jahodníku na území ČR byl sestaven soubor 422 vzorků, které pocházely z různých oblastí a představovaly různý stupeň certifikovaného materiálu. Níže budou popsána jednotlivá místa odběru a uvedeny podmínky, za kterých byly odběry provedeny.

V roce 2018 byl v České republice v produkčních výsadbách zahájen monitoring ekonomicky významných virů jahodníku. Celkem bylo odebráno 234 vzorků a navštíveno 27 odběrových míst, která se vyskytují na území šesti krajů – Středočeský, Ústecký, Hlavní město Praha, Vysočina, Královéhradecký a Pardubický. V každé lokalitě byly odebrány minimálně 4 vzorky od jedné odrůdy. Vybírány byly minimálně 2 rostliny, které vykazovaly

viditelné příznaky na listech jako např. různé mozaiky nebo chlorózy, zdeformované, zkadeřené nebo zakrslé listy, světlé lemování podél žilek a dvě rostliny, které se jevily jako bezpříznakové.

Na jaře v roce 2019 bylo ve 14 zahradnictvích a obchodních řetězcích na území východních a severovýchodních Čech nakoupeno celkem 278 rostlin jahodníku. Do testování byly zařazeny od každého prodejce a od každé odrůdy tři rostliny. V případě, že některé rostliny vykazovaly symptomy, byly do testování vybrány navíc. Celkem bylo z počtu 278 nakoupených rostlin testováno 108 vzorků jahodníků.

Diagnostickými soupravami byly testovány rostliny umístěné v technické izolaci, tzv. matečnice v certifikačním stupni Superelita. Přednostně byly analyzovány viry, které se dle vyhlášky 96/2018 Sb. nemusí povinně testovat v rozmnožovacím materiálu. Celkem bylo do testování zařazeno 80 rostlin.

4.3.3 Viry rybízu

Přítomnost virů rybízu BRV a GVBaV byla testována celkem v pěti různých kategoriích materiálu. Nejvíce rostlin pocházelo z genofondů, kde byly v květnu 2019 odebrány listy z celkem 74 rybízů. Jednalo se jak o rybíz červený, černý, bílý, tak i o speciální odrůdu nazývanou Gabreta. Ve stejném období byl také proveden odběr vzorků ze 38 rostlin pocházejících z pěti produkčních výsadeb černého nebo červeného rybízu. Vybrané lokality se nacházely maximálně 10 km od Holovous. Dalších 31 rostlin pocházelo z různých soukromých zahrádek na území České republiky. Většinou to byly rybízy, u nichž nebyl znám původ, odrůda a ani rok výsadby. Rostliny byly odebírány v období 5/2019 – 7/2019. Na jaře 2019 bylo ve 14 zahradnictvích a obchodních řetězcích ve východních a severovýchodních Čechách nakoupeno 32 kontejnerovaných rostlin. Poslední testovanou skupinou bylo 31 rybízů, které byly zařazeny do kategorie materiál pro výzkumné účely.

S výjimkou vzorků získaných nákupem sadby v obchodních řetězcích a zahradnictvích byly v ostatních kategoriích přednostně odebírány listy rybízu s viditelnými příznaky, typickými pro viry BRV nebo GVBaV. Pro testování BRV byly odebírány listy, které byly užší a počet listových laloků byl menší než u listů zdravého keře, zářezy listů byly hlubší, zoubkování bylo ostřejší, list byl svým vzhledem podobný listu kopřivy (Obrázek 1). Větve se silněji větvaly, docházelo ke „křovitosti“ keřů. Další příznaky, na základě kterých byly odebírány vzorky, bylo fialové zbarvení mladých květních pupenů. Pro analýzu GVBaV byly přednostně odebírány listy, u kterých se projevovalo žluté lemování listové žilnatinou nebo různé

typy chlorózu (Obrázek 1). Dále byly pro odběr listů vybírány rostliny se slabšími a kratšími letorosty nebo rostliny menšího růstu.



Obrázek 1. Příznaky viru BRV- kopřivovitý vzhled listu (foto vlevo) a příznaky viru GVBaV – chloróza (foto vpravo)

5 Výsledky a diskuze

Přehled výsledků je uspořádán podle diagnostických systémů, které byly navrženy pro konkrétní skupinu virů.

5.1 Diagnostický systém pro detekci virů způsobujících maloplodost třešně a jeho využití v praxi

5.1.1 Výkonnostní charakteristiky multiplexní real-time PCR reakce

5.1.1.1 Specificita

V programu Vector NTI Advance byla provedena multiple-alignment analýza vybraných sekvencí pro viry LChV-1 a LChV-2 a byly navrženy primery a sondy, jejichž finální verze je uvedena v Tabulce 3.

Tabulka 3. Primery a sondy pro detekci LChV-1 a LChV-2, včetně velikosti amplifikovaného úseku

LChV-1:	84 bp
Forward primer:	GCYACTGATACTGATACGWCTAGCTCG
Reverse primer 1:	TTTCTCCTACCGCGACGTGG
Reverse primer 2:	CTAATTTCTTCTACCTCGACGTGG
Sonda:	FAM-AATACTTGCGAAACATGAAGAGCTCC-BHQ1
LChV-2:	149 bp
Forward primer:	TCTTTAAGTTGAGTTTGGAGYTGGG
Reverse primer 1:	CACACGCCCAAYTTTCGTAC
Reverse primer 2:	CACACGTCCCATTTTTGTCACTAG
Sonda:	HEX-CACCTGTTGCAACTCCATACTTTTGTAG-BHQ1

Sekvence primerů a sond jsou chráněny užitným vzorem č. CZ 32045 U1 a patentem č. CZ 308827 B6.

Pro LChV-1 byla použita sonda značená fluoroforem FAM a pro LChV-2 sonda s fluoroforem HEX. Porovnáním sekvencí LChV-1 bylo zjištěno, že oblast genu pro obalový protein je konzervativnější než jiné oblasti, proto byly do tohoto úseku navrženy primery a sonda. Tuto oblast si pro návrh primerů a sondy vybrali také Katsiani et al. (2018), kteří se zabývali vývojem real-time PCR reakce pro testování LChV-1 v simplexním uspořádání. Ti pro zachycení co nejvíce izolátů viru zvolili v reakci celkem tři sady primerů a sondu s očekávanou velikostí všech amplikonů 134 bp. V našem případě byla variabilita viru vyřešena návrhem degenerovaných primerů. S primery, které byly navrženy také do oblasti genu pro obalový protein, ve své studii pracovali Glasa et al. (2015), Park et al. (2018) nebo Diaz-Lara et al. (2020), kteří revidovali a upravili systém publikovaný Katsiani et al. (2018). V literatuře jsou popsány i další oblasti genomu LChV-1 vhodné pro návrh primerů (RdRp, HSP70h), ale v těchto případech se nejednalo čistě o analýzy určené pro diagnostiku viru, ale o studie zaměřující se např. na genetickou variabilitu, epidemiologii viru, charakterizaci jednotlivých izolátů nebo evoluci viru (Katsiani et al. 2015; Lim et al. 2015; Tahzima et al. 2019). Pro návrh primerů a sond pro LChV-2 byl vybrán úsek genu, který kóduje RNA-dependentní RNA polymerázu (RdRp). Tuto oblast ve své práci zvolili i Wright et al. (2021), zatímco Park et al. (2018) cílili své primery do oblasti genu pro protein p53.

Specifická systém byla ověřena na pozitivních a negativních vzorcích, které byly před analýzou real-time PCR testovány metodou end-point PCR se sadou primerů, která je uvedena v Kapitole 4.1.1.1 Viry způsobující maloplodost třešně. Nebyla pozorována žádná amplifikace s negativními vzorky rostlin třešně a ani s netemplátovanou kontrolou (NTC), což dokazuje vysokou specifitu testu, která byla testována jak v multiplexním, tak simplexním uspořádání. Pozitivní nálezy byly dále ověřeny sekvenováním.

5.1.1.2 Senzitivita

Pro vyhodnocení senzitivity byly porovnány hodnoty Ct, které byly získány testováním syntetického standardu pro určitý virus v různých koncentracích v multiplexním nebo simplexním uspořádání. Z výsledků detekce uvedených v Tabulkách 4 a 5 plyne, že hodnoty Ct jsou pro oba viry v obou provedeních srovnatelné a že multiplexování nemá vliv na výsledek testu. Hodnota analytické senzitivity pro LChV-1 byla stanovena na 500 kopií/reakce, neboť pro koncentraci 200 kopií/reakce nebyly všechny vzorky pozitivní. Na základě výsledků testování senzitivity LChV-2, kdy pro ředění 5200 kopií/reakce byla průměrná hodnota Ct 27,30, bylo provedeno další testování vzorků s nižší koncentrací a jako analytická senzitivita detekce byla stanovena koncentrace 650 kopií/reakce, u které vyšly všechny vzorky pozitivně. Pro oba viry bylo pro jejich koncentraci odpovídající analytické senzitivitě metody provedeno testování (Tabulky 6 a 7), ze kterého byly určeny průměrná hodnota, směrodatná odchylka a variační koeficient. Hodnoty variačního koeficientu pro LChV-1 0,62 % a pro LChV-2 1,21 % vypovídají o nízké variabilitě provedených PCR reakcí pro danou koncentraci.

Tabulka 4. Stanovení senzitivity pro LChV-1 - vliv multiplexování

Ředění kopie/reakce	Simplex			Multiplex		
	Hodnota Ct	SD	Průměr	Průměr	SD	Hodnota Ct
20 000	24,16	0,0150	24,18	24,02	0,0750	23,94
20 000	24,19					24,09
2 000	27,39	0,0638	27,34	27,54	0,1621	27,62
2 000	27,38					27,68
2 000	27,25					27,31
200	31,35	0,3679	30,72	32,35	0,7128	31,39
200	30,47					32,55
200	30,58					neg
200	30,47					33,10

Tabulka 5. Stanovení senzitivity pro LChV-2 - vliv multiplexování

Ředění kopie/reakce	Simplex			Multiplex		
	Hodnota Ct	SD	Průměr	Průměr	SD	Hodnota Ct
260 000	25,49	0,1300	25,36	25,32	0,0050	25,32
260 000	25,23					25,31
10 400	26,46	0,1050	26,57	27,03	0,1850	26,84
10 400	26,67					27,21
5 200	27,96	0,2337	27,63	27,30	0,0860	27,20
5 200	27,45					27,29
5 200	27,48					27,41

Tabulka 6. Stanovení analytické senzitivity detekce LChV-1

Série	Ct hodnoty pro koncentraci 500 kopií/reakce							
S1	29,04	29,11	29,16	29,33	29,33	29,34	29,43	29,58
S2	29,07	29,24	29,26	29,28	29,28	29,34	29,43	29,51
S3	28,93	28,95	29,03	29,25	29,37	29,37	29,49	29,57
Průměr	29,28		Směrodatná odchylka		0,18	Variační koeficient		0,0062

Tabulka 7. Stanovení analytické senzitivity detekce LChV-2

Série	Ct hodnoty pro koncentraci 650 kopií/reakce							
S1	29,89	29,93	29,97	30,08	30,13	30,18	30,18	30,20
S2	29,49	29,68	29,70	29,76	29,77	30,07	30,11	30,83
S3	29,72	29,76	29,77	29,78	29,96	30,06	30,87	30,88
Průměr	30,03		Směrodatná odchylka		0,36	Variační koeficient		0,0121

Ze získaných hodnot Ct metodou real-time PCR v multiplexním uspořádání pro jednotlivé koncentrace byla pro oba viry sestrojena kalibrační křivka a byly vyhodnoceny parametry jako korelační koeficient R^2 a účinnost amplifikace (Efficiency). Hodnota korelačního koeficientu pro LChV-1 byla 0,994 a účinnost amplifikace 92 %; pro LChV-2 byl korelační koeficient 0,991 a účinnost amplifikace 97 %. Zařazením degenerovaných primerů do PCR reakce pro detekci LChV-1 a LChV-2 by se dalo předpokládat, že dojde ke snížení účinnosti PCR reakce, přesto však jsou hodnoty účinnosti pro detekci LChV-1 podobné jako měli ve své studii Katsiani et al. (2018) 96,7 % nebo Diaz-Lara et al. (2020) 107,9 %. Účinnost PCR reakce pro detekci LChV-2 v simplexním uspořádání, kterou ve své práci sledovali Diaz-Lara et al. (2020), byla 106,8 %.

5.1.1.3 Opakovatelnost

Pro LChV-1 byla opakovatelnost stanovena při ředění syntetického standardu 500 kopií/reakce a pro LChV-2 při ředění syntetického standardu 650 kopií/reakce. Průměrný variační koeficient, který reflektuje interní nejistotu měření, byl vypočítán z Ct hodnot, které pocházely ze tří nezávislých měření, která byla provedena jedním pracovníkem laboratoře, na stejném přístroji, stejnou metodou a za použití stejných reagensů. Hodnoty Ct jsou uvedeny v Tabulkách 6 a 7. Pro LChV-1 byla hodnota variačního koeficientu $0,0059 \pm 0,0015$, což odpovídá variabilitě testování jednotlivých běhů 0,59 %. Variační koeficient pro LChV-2 byl $0,0107 \pm 0,0050$ s variabilitou testování jednotlivých běhů 1,07 % (Tabulky 8 a 9).

Tabulka 8. Statistické parametry pro stanovení opakovatelnosti detekce LChV-1

Série	Průměr	SD	VK
S1	29,29	0,17	0,0057
S2	29,30	0,12	0,0042
S3	29,25	0,23	0,0079
Průměrné hodnoty	29,28	0,17	0,0059
		SD VK	0,0015

Tabulka 9. Statistické parametry pro stanovení opakovatelnosti detekce LChV-2

Série	Průměr	SD	VK
S1	30,07	0,12	0,0038
S2	29,93	0,39	0,0131
S3	30,10	0,46	0,0153
Průměrné hodnoty	30,03	0,32	0,0107
		SD VK	0,0050

5.1.1.4 Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost byla pro LChV-1 určena při ředění 500 kopií standardu v reakci a pro LChV-2 při ředění 650 kopií/reakce. Pro tato ředění byla provedena tři nezávislá opakování v různých bězích, přičemž nebyly pozorovány žádné významné odchylky hodnot Ct. Z výsledků uvedených v Tabulkách 10 a 11 je patrné, že reprodukovatelnost metody vyjádřená variačním koeficientem pro LChV-1 je 0,87 % a pro LChV-2 je 1,71%. Tyto hodnoty jsou nízké a poukazují na skutečnost, že použití detekčního systému v multiplexním uspořádání různými pracovníky nemá zásadní vliv na výsledky testování.

Tabulka 10. Stanovení reprodukovatelnosti detekce LChV-1

Běh/Série	Ct hodnoty pro koncentraci 500 kopií/reakce							
I/S1	28,89	29,05	29,05	29,13	29,22	29,22	29,23	29,43
II/S1	29,04	29,11	29,16	29,33	29,33	29,34	29,43	29,58
III/S1	29,44	29,50	29,55	29,59	29,66	29,69	29,73	29,85
I/S2	28,89	28,94	28,98	29,08	29,10	29,16	29,28	29,36
II/S2	29,07	29,24	29,26	29,28	29,28	29,34	29,43	29,51
III/S2	29,52	29,52	29,59	29,64	29,67	29,74	29,81	29,85
I/S3	28,91	28,94	29,02	29,08	29,20	29,28	29,28	29,39
II/S3	28,93	28,95	29,03	29,25	29,37	29,37	29,49	29,57
III/S3	29,33	29,37	29,41	29,46	29,50	29,63	29,72	29,75
Průměr	29,34		Směrodatná odch.	0,26	Variační koeficient	0,0087		

Tabulka 11. Stanovení reprodukovatelnosti detekce LChV-2

Běh/Série	Ct hodnoty pro koncentraci 650 kopií/reakce							
I/S1	29,89	29,93	29,97	30,08	30,13	30,18	30,18	30,20
II/S1	29,86	30,04	30,29	30,29	30,48	30,53	31,03	31,26
III/S1	29,13	29,31	29,50	29,59	29,67	29,74	30,14	31,74
I/S2	29,49	29,68	29,70	29,76	29,77	30,07	30,11	30,83
II/S2	29,61	29,65	29,80	29,8	29,86	29,89	30,05	30,32
III/S2	29,17	29,27	29,27	29,32	29,48	29,56	29,59	29,71
I/S3	29,72	29,76	29,77	29,78	29,96	30,06	30,87	30,88
II/S3	29,37	29,64	29,70	29,70	29,73	29,73	29,77	29,91
III/S3	29,05	29,09	29,12	29,18	29,28	29,38	29,44	29,47
Průměr	29,85		Směrodatná odch.	0,51	Variační koeficient	0,0171		

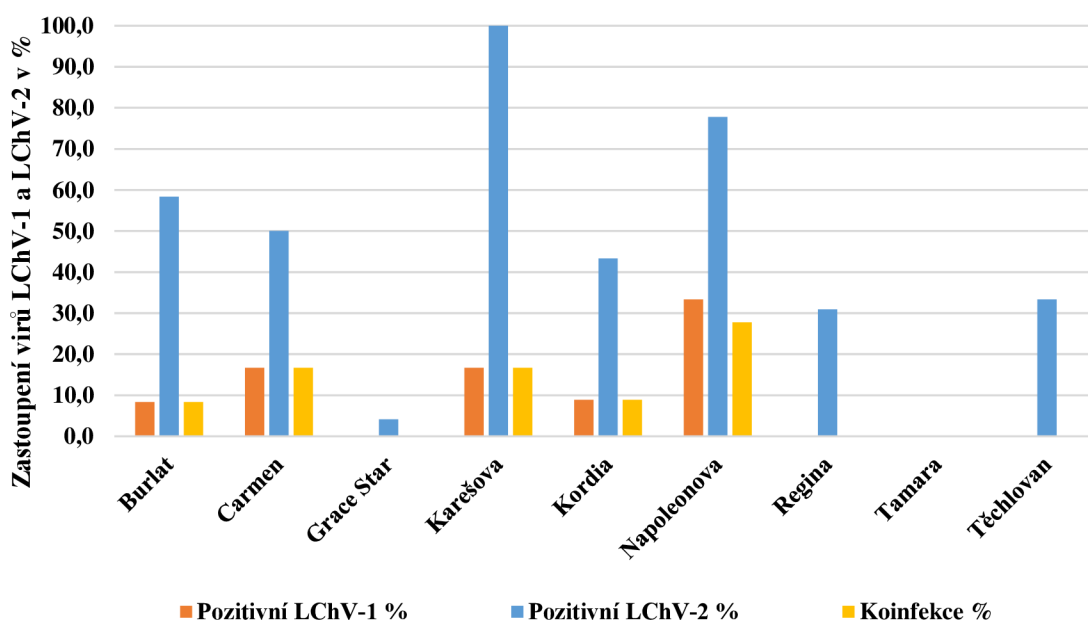
Popis vývoje systému pro real-time PCR detekci virů LChV-1 a LChV-2, jeho validace a použití jsou uvedeny v certifikované metodice „Real-time PCR detekce virů Little cherry virus 1 (LChV-1) a Little cherry virus 2 (LChV-2) v biologickém materiálu“ (Čmejla & Valentová 2018a).

5.1.2 Využití detekčního systému pro diagnostiku virů způsobujících maloplodost třešně

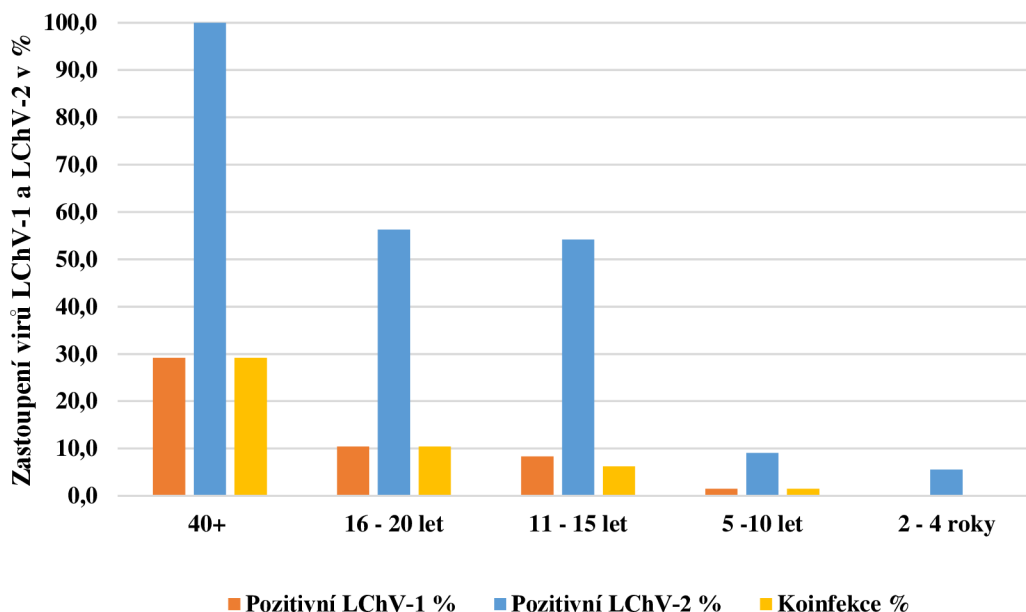
Diagnostický systém pro testování virů maloplodosti třešně LChV-1 a LChV-2 byl v praxi využit pro sledování výskytu virů ve vybraných výsadbách třešní v České republice. Metodika odběru a provedení je uvedena v kapitole 4.3.1.1. Metodika experimentu. Projekt byl prováděn ve spolupráci s Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským, který ve své části odebraných vzorků použil pro diagnostiku LChV-1 a LChV-2 výše popsany detekční systém. Do testů prováděných na našem pracovišti bylo zařazeno celkem 222 stromů, které se vyskytovaly na území Těchlovic. V rámci testování bylo hodnoceno 9 odrůd a stáří stromů v pěti kategoriích. Výsledky jednotlivých testování jsou shrnuty v Grafech 1 - 2.

V Grafu 1 byla sledována přítomnost virů ve vybraných odrůdách. Testovány byly odrůdy – Burlat, Carmen, Grace Star, Karešova, Kordia, Napoleonova, Regina, Tamara a Těchlovan. Z Grafu 1 je patrné, že ve všech odrůdách je nejvíce rozšířen LChV-2 a u každé odrůdy kromě Napoleonovy, byly vždy rostliny pozitivní na oba viry zároveň. Jako jediná zdravá byla odrůda Tamara, ale v tomto případě je negativita této odrůdy dána patrně stářím stromů, které bylo v kategorii 2 – 4 roky. Předpokládá se, že čím je rostlina mladší, tím je menší riziko výskytu virů maloplodosti, neboť dle certifikačního schématu musí být školkařské výpěstky, které jsou používány pro zakládání nových sadů, bez přítomnosti virů LChV-1 a LChV-2. Na stáří stromů versus výskyt virů LChV-1 a LChV-2 poukazuje Graf 2. Z tohoto grafu vyplývá, že čím starší strom, tím se zvyšuje procento pozitivity; toto tvrzení platí pro oba

viry. Teorií, proč tomu tak je, může být několik. Jak je výše uvedeno, je povinností vysazovat na viry negativní školkařské výpěstky, u mladých rostlin by se tedy tyto viry neměly vůbec vyskytovat. Občasná pozitivita mladých stromů může být dána použitím rozmnožovacího materiálu získaného ze zahraničí. Výskyt virů může pocházet i z podnoží nebo z rostlin, které nebyly ještě řádně na viry maloplodosti testovány, ať už u nás v ČR nebo v zahraničí. Důvodem, že rostliny nebyly testovány, je fakt, že ještě nedávno nebyly k dispozici vhodné detekční systémy pro diagnostiku těchto virů. V minulosti tak nové výsadby mohly být zakládány LChV-1 a LChV-2 infikovanými stromy. A protože po celou dobu jejich růstu, rostliny nevykazovaly žádné symptomy, nebyl důvod rostliny na viry LChV-1 a LChV-2 testovat. V nedávné době došlo v Těchlovicích k masivnímu výskytu symptomů, které se projevovaly výraznou redukcí velikosti a hořkostí plodů. Byl zahájen průzkum virů, který odhalil 100% přítomnost LChV-2 ve starých výsadbách.



Graf 1. Přítomnost virů LChV-1 a LChV-2 u vybraných odrůd třešní



Graf 2. Závislost přítomnosti virů LChV-1 a LChV-2 na stáří stromů třešní

Tyto výstupy sloužily jako podklad pro odbornou zprávu o rozsahu a výsledcích cíleného průzkumu výskytu virů způsobujících maloplodost třešně a višně v roce 2021.

5.2 Diagnostický systém pro detekci virů jahodníku a jeho využití v praxi

5.2.1 Výkonnostní charakteristiky multiplexní real-time PCR reakce

Výkonnostní charakteristiky byly hodnoceny pro dva diagnostické systémy StrawVir I a StrawVir II. Oba systémy byly navrženy v multiplexním uspořádání. StrawVir I v jedné reakci detekuje viry SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 a StrawVir II detekuje viry StrV-1 a OLV-1. Jak uvádí Diaz-Lara et al. (2021) výběr real-time PCR metod pro detekci jahodníkových virů prezentovaných v odborné literatuře je velmi omezený nebo metody nejsou vůbec navrženy. V případě nově objevených virů nejsou v literatuře k dispozici ani jiné molekulární metody, např. end-point PCR. Pro srovnání našeho systému pro multiplexní real-time PCR byla nakonec vybrána právě publikace zpracovaná Diaz-Lara et al. (2021). Autoři ve své studii provedli revizi dostupných primerů pro viry jahodníku a navrhli detekční systémy pro real-time PCR v simplexním uspořádání. U všech testů stanovili účinnost PCR reakce a korelační koeficient. Konkrétně lze z jejich publikace pro naše účely vybrat data pro porovnání

virů SMYEV, SCV, SMoV, SVBV a SPV-1. Jedná se o viry, které jsou předmětem detekčního systému StrawVir I.

5.2.1.1 Specificita

Pro jednotlivé viry byly nejdříve porovnány sekvence pocházející z databází nebo odborné literatury. Pro návrh sond a primerů byly vybrány části virových genomů s co nejvíce konzervovanými úseky. Pro detekci SMYEV byl systém sond a primerů navržen v 3'UTR oblasti stejně jako pro SMoV, pro detekci SCV a OLV-1 v oblasti genu, který kóduje RNA-dependentní RNA polymerázu (RdRp), pro detekci SVBV v oblasti genu pro obalový protein, pro SPV-1 do genu pro serine-like proteasu a pro StrV-1 do oblasti L. Pro SCV jsou známy dva odlišné kmeny (SCV-A a SCV-B), které byly zohledněny v detekčním systému zařazením dvou sond, které amplifikovaly dva různé úseky. Výkonnostní parametry byly syntetickými standardy testovány pro oba izoláty viru zvlášť. Pro srovnání, Diaz-Lara et al. (2021) ve své práci navrhli primery a sondy do následujících úseků genomů virů (v závorce je uvedena velikost amplifikovaného úseku): SMYEV (83 bp), SVBV (99 bp) a SPV-1 (61 bp) do oblasti genu pro obalový protein, SMoV (112 bp) do oblasti 3'UTR a SCV (175 bp) v oblasti genu, který kóduje RNA-dependentní RNA polymerázu (RdRp). Pro viry v multiplexní PCR reakci StrawVir I byly použity sondy s následujícími fluorofory: pro SMYEV fluorofor FAM, pro SCV-A a SCV-B fluorofor HEX, pro SVBV fluorofor ROX, pro SMoV fluorofor Cy5 a pro SPV-1 fluorofor IRDye700. Pro detekční systém StrawVir II byl pro StrV-1 použit fluorofor FAM a pro OLV-1 fluorofor HEX. Konečné sekvence sond a primerů včetně velikosti amplifikovaného úseku pro provedení real-time PCR v multiplexním uspořádání jsou uvedeny v Tabulkách 12 a 13.

Specificita detekčního systému pro jednotlivé viry byla ověřena na pozitivních a negativních vzorcích, které byly již dříve testovány end-point PCR. Jednalo se o vzorky, které pocházely z různých lokalit a byly odlišného původu. Na základě výsledků testování, kdy pozitivní vzorky byly pozitivní a negativní vzorky byly negativní, lze oba diagnostické systémy StrawVir I a StrawVir II vyhodnotit jako 100% specifické.

Tabulka 12. Přehled finálních primerů a sond pro provedení real-time PCR v multiplexním uspořádání s využitím diagnostického systému StrawVir I, uvedeno včetně velikosti amplifikovaného úseku

SMYEV:	88 bp
Forward primer:	CCCTCCTGACGTACACAACAACCTG
Reverse primer 1:	CCGTGAGGGAGGAGAATACGC
Reverse primer 2:	CCGTGAGGGAGGAGAATACAC
Sonda:	FAM-TACTCTAGTYGCCATCGAGGTACAGTGC-BHQ1
SCV:	77 bp
Forward primer 1:	ACAGTRTGCGCTTTAGAGGTTGTT
Forward primer 2:	ACAGTGTGCGCTTTAGAGGTTATTC
Forward primer 3:	ACAGTGTGCGCTTTAGAAGTTGTTT
Reverse primer 1:	ACCTGATTATCTCCCATYCCCATT
Reverse primer 2:	ACTTGATTATCCCCCATCCCCA
Sonda 1:	HEX-TCTCAATAYGATTGTACATACCGCAT-BHQ1
Sonda 2:	HEX-TCTCAATACGATTGCACATATCGCAT-BHQ1
SVBV:	102 bp
Forward primer:	AATATCTGTCTTTACTTGATSATGAACTTG
Reverse primer 1:	CGTCTTCGCTGCTGCTGTAGTC
Reverse primer 2:	CATCTTCACTGCTGCTGCTGTAG
Sonda:	ROX-AGTTACAGGTAAGTTGTAGCAAAGARATGA-BHQ2
SMoV:	114 bp
Forward primer:	GTAGGACACCGGCTCTTGGYAGT
Reverse primer:	TTGGRTCCTCACCTGAYCTCG
Sonda:	Cy5-ACAGGWGGCACTGTTTACAGTGTTC-BHQ3
SPV-1:	69 bp
Forward primer:	CAACTGGGGTTCGTACTACTCGC
Reverse primer:	GGCCAGCCGAATCCTTTGAC
Sonda:	IRDye700-ACCTACCCTGAACTCGCCGAACA-BHQ3

Sekvence primerů a sond jsou chráněny užitným vzorem č. CZ 32879 U1.

Tabulka 13. Přehled finálních primerů a sond pro provedení real-time PCR v multiplexním uspořádání s využitím diagnostického systému StrawVir II, uvedeno včetně velikosti amplifikovaného úseku

StrV-1:	93 bp
Forward primer:	AACGGATATTGTGGCGCRAA
Reverse primer:	CCTGATGTTGTTKATATARCTGAGRTC
Sonda 1:	FAM-AAACCTCTTACCATCATCTCGTAAA-BHQ1
Sonda 2:	FAM-AARCCCCTCACCATCATYTCGTAA-BHQ1
OLV-1:	91 bp
Forward primer:	TCTTGATGAATTACTCGGGCAGG
Reverse primer:	CTCGAGTCCCGYAAGCTAAGTGG
Sonda:	HEX-AAGAAGCGGTTGATAGTTTGTTCGCA-BHQ1

5.2.1.2 Senzitivita

Pro každý virus byly porovnány Ct hodnoty jednotlivých koncentrací (100 000 kopií/reakce – 5 kopií/reakce), které byly získány z analýz provedených jak v multiplexním, tak simplexním uspořádání. Na základě srovnání bylo zjištěno, že multiplexování nemá vliv na výsledek analýzy, a že hodnoty Ct získané v simplexní reakci jsou shodné s hodnotami Ct analyzovaných vzorků v multiplexním uspořádání. Dále byla pro každý virus zvlášť stanovena analytická senzitivita detekce, která je definována jako koncentrace syntetického standardu, pro kterou byly všechny testované vzorky pozitivní a měly minimálně odlišnou amplifikační křivku, což odpovídá nízké hodnotě směrodatné odchylky. Jak vyplývá z Tabulek 14 – 21, skutečný limit detekce je pro všechny viry nižší. V nízkých koncentracích, zejména 5 kopií/reakce, nejsou všechny analýzy pozitivní a pro koncentraci 50 kopií/reakce byla u všech vzorků nalezena pozitivita, ale většinou s vysokou směrodatnou odchylkou. Pro všechny viry byla stanovena hodnota senzitivity na 500 kopií/reakce, při které byly všechny vzorky spolehlivě detekovány. Pro zvolenou koncentraci 500 kopií/reakce byly pro analyzované vzorky stanoveny průměrná hodnota Ct, směrodatná odchylka a variační koeficient. Pro všechny viry jahodníku byly hodnoty variačního koeficientu, který poukazuje na míru variability provedených PCR reakcí nižší než 1,5 %. Ostatní parametry jsou uvedeny v Tabulkách číslo 22 - 29 pro každý virus zvlášť.

Tabulka 14. Stanovení senzitivity pro SMYEV - vliv multiplexování

Ředění kopie/reakce	Simplex			Multiplex		
	Hodnota Ct	SD	Průměr	Průměr	SD	Hodnota Ct
100 000	21,92	0,0850	21,84	21,65	0,1100	21,54
100 000	21,75					21,76
50 000	22,66	0,0700	22,73	22,65	0,0250	22,67
50 000	22,80					22,62
5 000	26,37	0,0350	26,41	26,09	0,0700	26,02
5 000	26,44					26,16
500	30,17	0,2320	29,91	29,67	0,2763	29,70
500	29,70					29,39
500	29,65					29,49
500	30,10					30,11
50	33,15	0,2824	33,44	33,26	0,2795	32,97
50	33,29					33,01
50	33,90					33,43
50	33,41					33,63
5	35,85	0,2662	35,45	40,44	2,1675	neg
5	35,24					40,90
5	35,53					42,84
5	35,18					37,59

Tabulka 15. Stanovení senzitivity pro SCV-A - vliv multiplexování

Ředění kopie/reakce	Simplex			Multiplex		
	Hodnota Ct	SD	Průměr	Průměr	SD	Hodnota Ct
100 000	22,75	0,0750	22,68	22,52	0,1000	22,62
100 000	22,60					22,42
50 000	23,65	0,0700	23,72	23,33	0,0200	23,31
50 000	23,79					23,35
5 000	27,59	0,1800	27,41	27,27	0,0850	27,35
5 000	27,23					27,18
500	30,95	0,3427	30,89	31,11	0,3566	30,80
500	30,61					30,78
500	31,43					31,65
500	30,58					31,22
50	34,89	0,6189	34,78	35,34	0,9059	34,99
50	34,89					35,25
50	35,52					34,33
50	33,80					36,80
5	neg	0,3250	38,13	46,86	4,7697	neg
5	38,45					52,35
5	neg					47,50
5	37,8					40,72

Tabulka 16. Stanovení senzitivity pro SCV-B - vliv multiplexování

Ředění kopie/reakce	Simplex			Multiplex		
	Hodnota Ct	SD	Průměr	Průměr	SD	Hodnota Ct
100 000	21,94	0,0250	21,92	21,91	0,0450	21,95
100 000	21,89					21,86
50 000	23,12	0,0650	23,19	22,88	0,0200	22,86
50 000	23,25					22,90
5 000	27,22	0,1350	27,09	26,73	0,0100	26,74
5 000	26,95					26,72
500	30,34	0,1863	30,20	29,81	0,2381	29,82
500	30,05					30,18
500	29,98					29,68
500	30,42					29,54
50	32,66	0,3851	33,28	33,71	0,4156	33,09
50	33,64					34,11
50	33,56					34,07
50	33,25					33,58
5	40,48	2,4150	38,07	46,32		neg
5	neg					neg
5	neg					neg
5	35,65					46,32

Tabulka 17. Stanovení senzitivity pro SVBV - vliv multiplexování

Ředění kopie/reakce	Simplex			Multiplex		
	Hodnota Ct	SD	Průměr	Průměr	SD	Hodnota Ct
100 000	21,56	0,0100	21,57	21,88	0,0450	21,92
100 000	21,58					21,83
50 000	22,28	0,1200	22,40	22,79	0,1200	22,91
50 000	22,52					22,67
5 000	25,90	0,1150	25,79	25,85	0,1150	25,96
5 000	25,67					25,73
500	30,02	0,2823	29,88	29,47	0,1776	29,68
500	29,40					29,27
500	30,13					29,32
500	29,96					29,61
50	32,87	0,4288	32,60	33,95	1,8428	32,24
50	32,01					32,35
50	33,12					34,46
50	32,39					36,75
5	35,72	0,7345	34,87			neg
5	34,88					neg
5	33,71					neg
5	35,17					neg

Tabulka 18. Stanovení senzitivity pro SMOV - vliv multiplexování

Ředění kopie/reakce	Simplex			Multiplex		
	Hodnota Ct	SD	Průměr	Průměr	SD	Hodnota Ct
100 000	18,67	0,3050	18,98	19,02	0,0050	19,01
100 000	19,28					19,02
50 000	19,78	0,2750	20,06	19,90	0,0300	19,87
50 000	20,33					19,93
5 000	23,49	0,0750	23,42	23,19	0,1050	23,29
5 000	23,34					23,08
500	26,65	0,0526	26,72	26,42	0,2148	26,16
500	26,75					26,30
500	26,79					26,50
500	26,70					26,73
50	29,84	0,3009	30,02	29,35	0,6038	30,39
50	30,53					29,13
50	29,91					28,94
50	29,78					28,95
5	32,38	0,5530	32,77	34,27	1,1834	34,68
5	32,88					33,88
5	32,19					35,89
5	33,62					32,64

Tabulka 19. Stanovení senzitivity pro SPV-1 - vliv multiplexování

Ředění kopie/reakce	Simplex			Multiplex		
	Hodnota Ct	SD	Průměr	Průměr	SD	Hodnota Ct
100 000	19,00	0,0750	18,93	18,90	0,0350	18,93
100 000	18,85					18,86
50 000	19,77	0,0400	19,81	19,84	0,0050	19,84
50 000	19,85					19,83
5 000	23,06	0,0400	23,10	23,08	0,0450	23,12
5 000	23,14					23,03
500	26,60	0,1433	26,71	26,22	0,2172	25,91
500	26,87					26,13
500	26,82					26,44
500	26,53					26,41
50	30,02	0,3128	29,97	29,54	0,1105	29,44
50	30,41					29,68
50	29,53					29,61
50	29,93					29,42
5	33,63	0,3861	33,09	32,25	0,2641	31,97
5	32,89					32,68
5	neg					32,19
5	32,75					32,14

Tabulka 20. Stanovení senzitivity pro StrV-1 - vliv multiplexování

Ředění kopie/reakce	Simplex			Multiplex		
	Hodnota Ct	SD	Průměr	Průměr	SD	Hodnota Ct
100 000	22,29	0,0650	22,36	22,85	0,0300	22,82
100 000	22,42					22,88
50 000	23,90	0,1950	23,71	24,04	0,1650	24,20
50 000	23,51					23,87
5 000	27,36	0,2200	27,14	27,33	0,1950	27,13
5 000	26,92					27,52
500	30,59	0,3016	30,76	30,57	0,1842	30,61
500	31,17					30,38
500	30,91					30,43
500	30,38					30,85
50	36,02	0,5265	35,57	35,78	0,9383	34,46
50	35,62					35,91
50	35,93					37,10
50	34,69					35,64
5	37,82	0,6180	37,49	39,64	2,0957	37,23
5	36,77					neg
5	38,32					39,36
5	37,03					42,34

Tabulka 21. Stanovení senzitivity pro OLV-1 - vliv multiplexování

Ředění kopie/reakce	Simplex			Multiplex		
	Hodnota Ct	SD	Průměr	Průměr	SD	Hodnota Ct
100 000	23,77	0,2450	23,53	23,59	0,2700	23,32
100 000	23,28					23,86
50 000	24,54	0,1150	24,43	25,05	0,0150	25,03
50 000	24,31					25,06
5 000	27,59	0,0250	27,57	28,68	0,2600	28,94
5 000	27,54					28,42
500	31,35	0,2705	31,67	31,71	0,2459	32,02
500	31,53					31,42
500	31,72					31,87
500	32,08					31,52
50	34,32	0,9103	35,33	35,48	0,4889	35,07
50	36,75					neg
50	35,42					35,21
50	34,81					36,17
5	neg		neg	41,32	0,0000	neg
5	neg					41,32
5	neg					neg
5	neg					neg

Tabulka 22. Stanovení analytické senzitivity detekce SMYEV

Série	Ct hodnoty pro koncentraci 500 kopií/reakce							
S1	29,54	29,77	29,62	29,77	29,27	29,14	29,93	29,50
S2	29,55	29,72	29,34	29,32	29,93	29,32	29,7	29,44
S3	29,82	29,42	29,52	29,72	29,76	29,23	29,24	29,86
Průměr	29,56		Směrodatná odchylka		0,23	Variační koeficient		0,0079

Tabulka 23. Stanovení analytické senzitivity detekce SCV-A

Série	Ct hodnoty pro koncentraci 500 kopií/reakce							
S1	30,51	30,05	30,04	30,52	30,15	30,15	29,93	30,26
S2	30,40	30,24	30,07	30,15	30,29	30,20	30,32	30,38
S3	30,24	30,39	30,16	30,36	30,09	30,25	30,44	30,32
Průměr	30,25		Směrodatná odchylka		0,15	Variační koeficient		0,0050

Tabulka 24. Stanovení analytické senzitivity detekce SCV-B

Série	Ct hodnoty pro koncentraci 500 kopií/reakce							
S1	29,26	29,46	29,82	29,92	30,05	29,78	29,87	29,77
S2	29,67	29,27	29,47	29,48	29,77	29,47	29,82	29,59
S3	29,66	29,70	29,37	29,49	29,94	29,76	30,08	29,62
Průměr	29,67		Směrodatná odchylka		0,22	Variační koeficient		0,0075

Tabulka 25. Stanovení analytické senzitivity detekce SVBV

Série	Ct hodnoty pro koncentraci 500 kopií/reakce							
S1	28,63	28,76	29,16	29,15	28,94	29,02	28,91	28,89
S2	28,63	28,86	28,90	29,07	29,00	29,08	28,84	29,10
S3	29,51	29,37	28,93	29,06	29,08	29,04	29,32	28,90
Průměr	29,01		Směrodatná odchylka		0,20	Variační koeficient		0,0071

Tabulka 26. Stanovení analytické senzitivity detekce SMOV

Série	Ct hodnoty pro koncentraci 500 kopií/reakce							
S1	26,36	26,31	26,31	26,38	26,26	26,37	26,29	26,19
S2	25,96	26,31	26,03	26,31	26,32	26,26	25,98	26,21
S3	26,30	26,23	26,27	26,16	26,44	26,60	26,32	26,31
Průměr	26,27		Směrodatná odchylka		0,14	Variační koeficient		0,0052

Tabulka 27. Stanovení analytické senzitivity detekce SPV-1

Série	Ct hodnoty pro koncentraci 500 kopií/reakce							
S1	26,23	26,18	25,94	25,95	25,94	26,19	26,30	26,29
S2	26,57	26,24	26,09	26,20	26,37	26,27	25,79	26,18
S3	26,49	26,32	26,28	26,42	26,51	26,25	26,21	26,46
Průměr	26,24		Směrodatná odchylka		0,19	Variační koeficient		0,0072

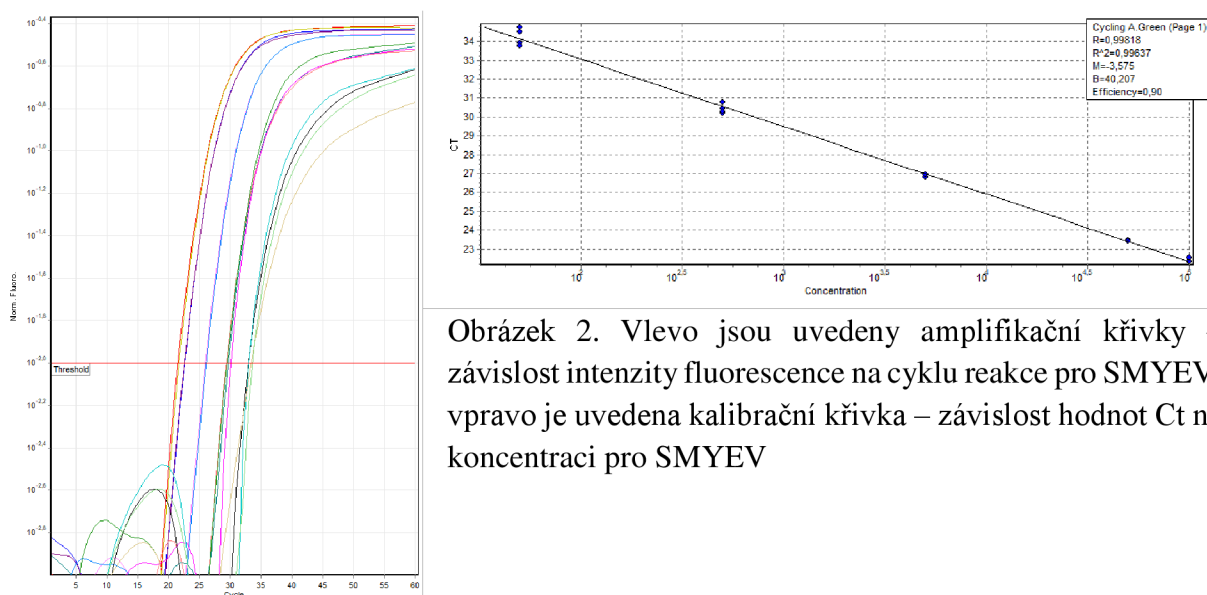
Tabulka 28. Stanovení analytické senzitivity detekce StrV-1

Série	Ct hodnoty pro koncentraci 500 kopií/reakce							
S1	30,29	30,19	29,88	31,04	30,33	30,47	30,46	31,27
S2	29,42	30,16	29,79	30,46	29,63	30,20	29,91	30,09
S3	30,02	30,44	30,33	30,72	30,57	30,64	29,77	30,21
Průměr	30,26		Směrodatná odchylka		0,42	Variační koeficient		0,0138

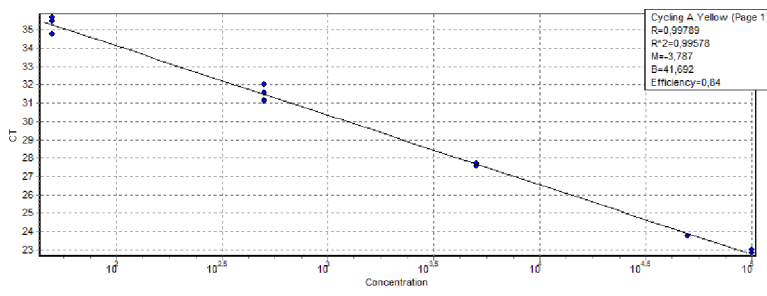
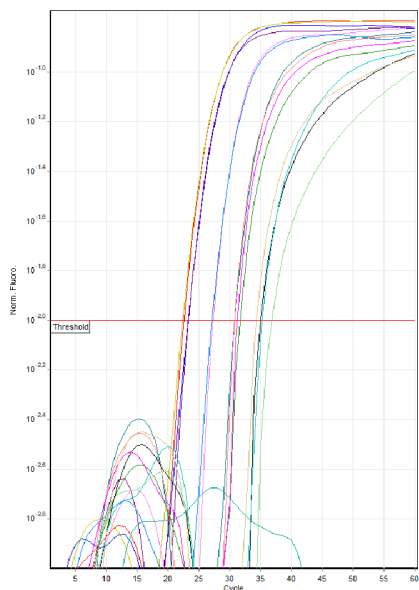
Tabulka 29. Stanovení analytické senzitivity detekce OLV-1

Série	Ct hodnoty pro koncentraci 500 kopií/reakce							
S1	32,03	32,23	31,40	32,22	31,38	31,52	31,27	31,01
S2	31,38	31,63	32,33	31,75	31,71	31,56	31,88	31,58
S3	32,35	31,50	32,02	31,41	31,90	31,79	32,20	31,81
Průměr	31,74		Směrodatná odchylka	0,36		Variační koeficient	0,0112	

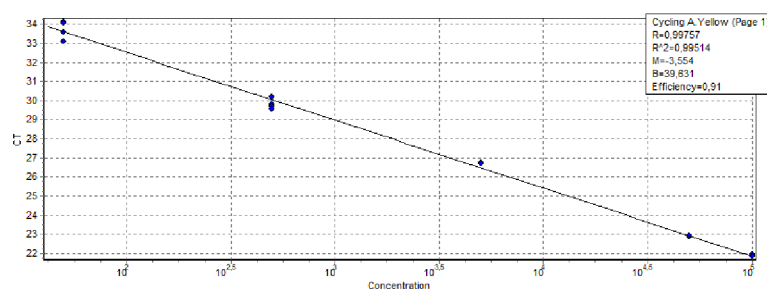
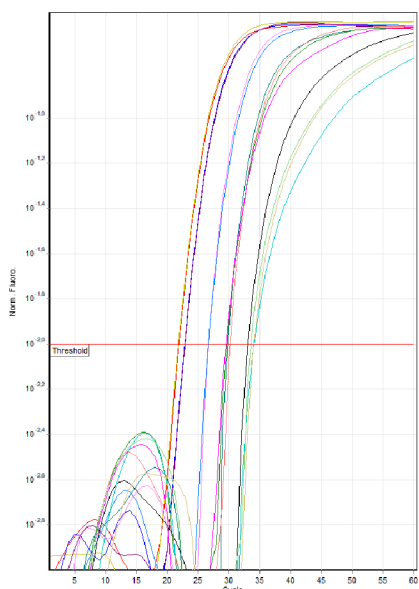
Pro každý virus byla sestrojena kalibrační křivka, stanovena hodnota účinnosti multiplexní PCR reakce a vypočítán korelační koeficient. Hodnoty účinnosti jednotlivých PCR reakcí se pohybovaly od 84 % do 107 %. Konkrétní hodnoty a kalibrační křivky jsou uvedeny na Obrázcích 2 - 9. Nejnižší účinnost byla zjištěna pro virus SCV-A, a to 84 %, což však nemělo zásadní vliv na výkonnostní parametry detekce. Účinnost PCR reakce pro SCV-B byla 91 %, což se blíží k hodnotě účinnosti 90 %, která je považována za hraniční hodnotu odpovídající spolehlivému průběhu PCR reakce. Ve dvou případech byla překročena hodnota účinnosti 100 %, bylo to pro viry SMOV (105 %) a pro SPV-1 (107 %). Dalším krokem bylo stanovení korelačního koeficientu lineární regrese (R^2). Na základě získaných hodnot korelačního koeficientu pro PCR reakci jednotlivých virů, které byly v rozmezí od 0,991 do 0,999, lze detekční systémy StrawVir I a StrawVir II vyhodnotit jako dostatečně robustní pro diagnostiku virů jahodníku. Porovnáním našich získaných hodnot s hodnotami, které ve své studii uvádí Diaz-Lara et al. (2021), jsme zjistili, že hodnoty korelačních koeficientů a účinnosti jsou srovnatelné. Porovnání jsme provedli pro viry SMYEV, SCV, SVBV, SMOV a SPV-1. Hodnoty účinnosti získané v publikaci se pohybovaly v rozmezí od 92 % do 105 % a hodnoty korelačního koeficientu v rozmezí od 0,984 do 0,998 (Diaz-Lara et al. 2021).



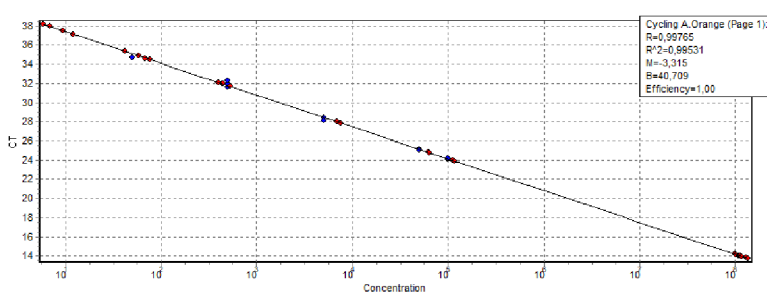
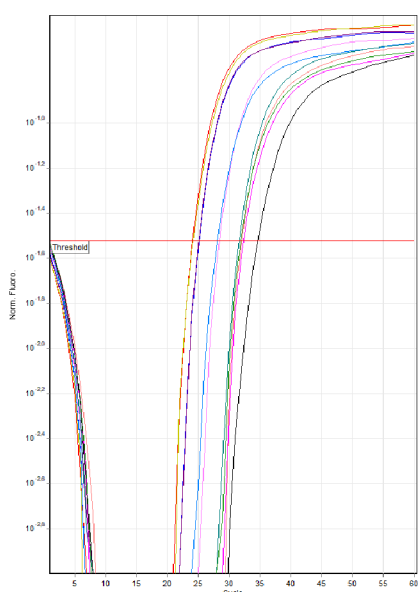
Obrázek 2. Vlevo jsou uvedeny amplifikační křivky – závislost intenzity fluorescence na cyklu reakce pro SMYEV, vpravo je uvedena kalibrační křivka – závislost hodnot Ct na koncentraci pro SMYEV



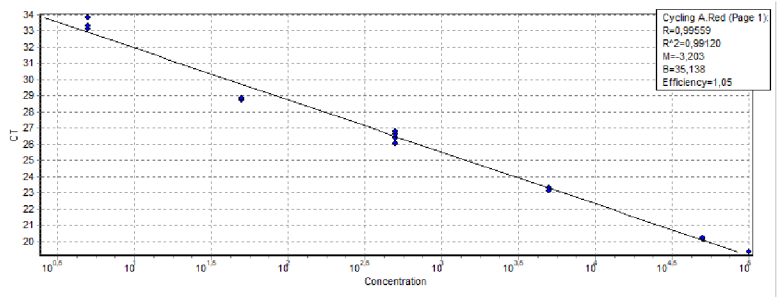
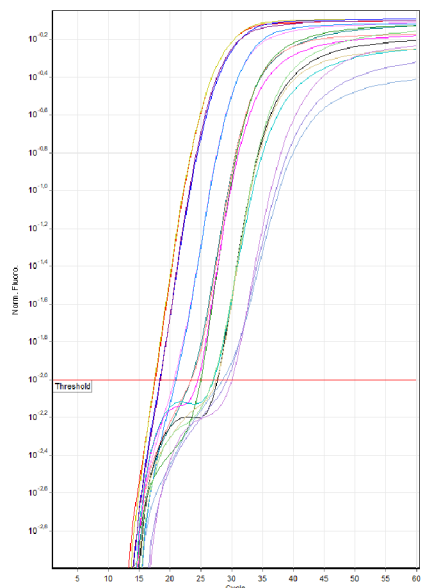
Obrázek 3. Vlevo jsou uvedeny amplifikační křivky - závislost intenzity fluorescence na cyklu reakce pro SCV-A, vpravo je uvedena kalibrační křivka – závislost hodnot Ct na koncentraci pro SCV-A



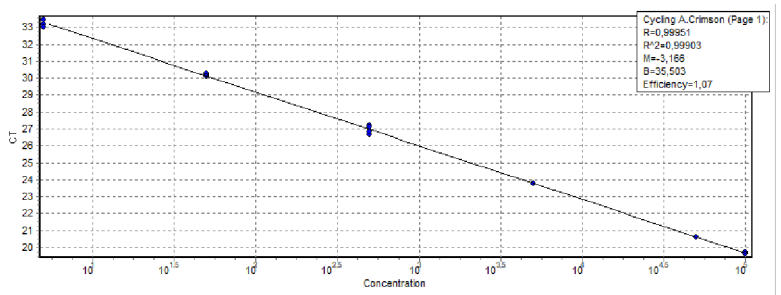
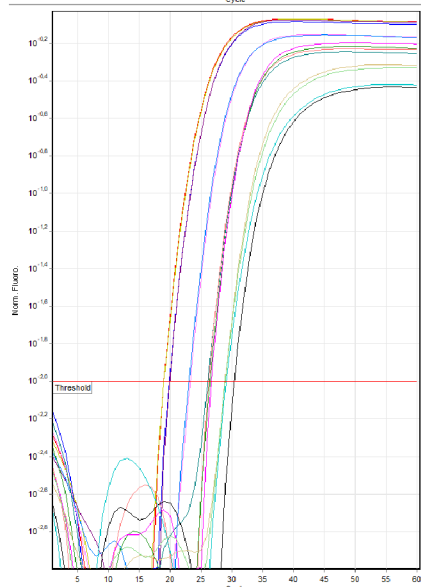
Obrázek 4. Vlevo jsou uvedeny amplifikační křivky – závislost intenzity fluorescence na cyklu reakce pro SCV-B, vpravo je uvedena kalibrační křivka – závislost hodnot Ct na koncentraci pro SCV-B



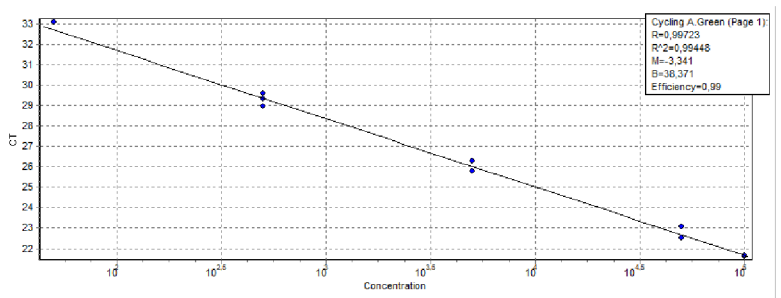
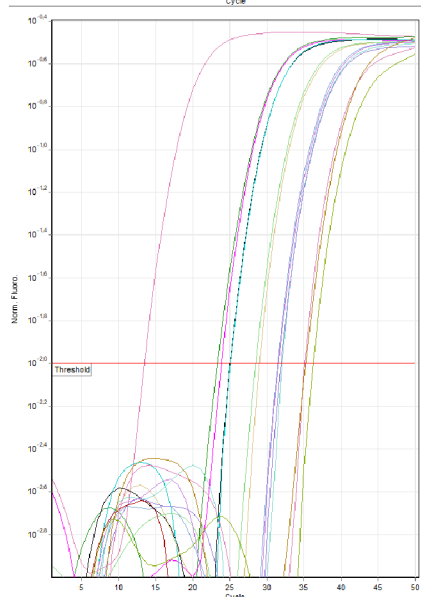
Obrázek 5. Vlevo jsou uvedeny amplifikační křivky – závislost intenzity fluorescence na cyklu reakce pro SVBV, vpravo je uvedena kalibrační křivka – závislost hodnot Ct na koncentraci pro SVBV



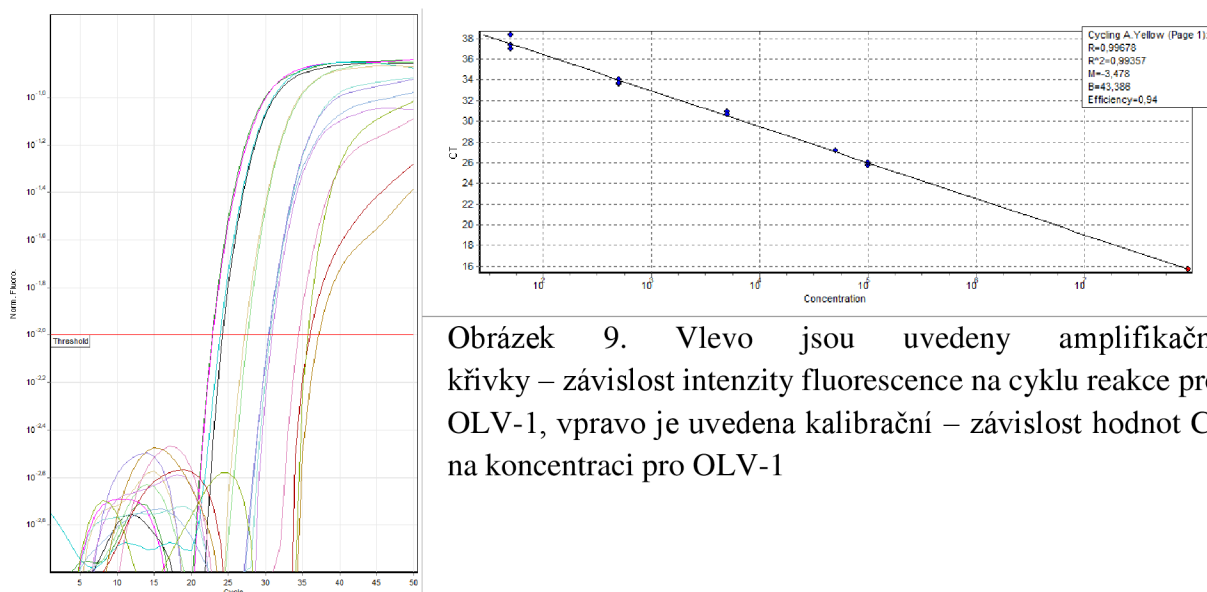
Obrázek 6. Vlevo jsou uvedeny amplifikační křivky – závislost intenzity fluorescence na cyklu reakce pro SMOV, vpravo je uvedena kalibrační – závislost hodnot Ct na koncentraci pro SMOV



Obrázek 7. Vlevo jsou uvedeny amplifikační křivky – závislost intenzity fluorescence na cyklu reakce pro SPV-1, vpravo je uvedena kalibrační – závislost hodnot Ct na koncentraci pro SPV-1



Obrázek 8. Vlevo jsou uvedeny amplifikační křivky – závislost intenzity fluorescence na cyklu reakce pro StrV-1, vpravo je uvedena kalibrační – závislost hodnot Ct na koncentraci pro StrV-1



Obrázek 9. Vlevo jsou uvedeny amplifikační křivky – závislost intenzity fluorescence na cyklu reakce pro OLV-1, vpravo je uvedena kalibrační – závislost hodnot Ct na koncentraci pro OLV-1

5.2.1.3 Opakovatelnost

Stanovení opakovatelnosti bylo provedeno pro všechny viry při stejném ředění syntetického standardu 500 kopií/reakce. Celkem byly analyzovány jedním pracovníkem, na stejném přístroji, stejnou metodou a za použití stejných reagensů tři nezávislé sady vzorků po osmi. Jednotlivé hodnoty Ct použité pro výpočet statistických parametrů pro stanovení opakovatelnosti jsou shodné s hodnotami Ct vybranými pro stanovení analytické senzitivity a jsou uvedeny v Tabulkách 22 - 29. V Tabulkách 30 – 37 jsou pro jednotlivé viry prezentovány statistické parametry, zejména pak průměrný variační koeficient, který odráží interní nejistotu měření. Pro SMYEV byla hodnota variačního koeficientu $0,0079 \pm 0,0005$, což odpovídá variabilitě testování jednotlivých běhů 0,79 %. Variabilita pro SCV-A byla stanovena na 0,46 %, pro SCV-B 0,70 %, pro SVBV 0,60 %, pro SMoV 0,42 %, pro SPV-1 0,59 %, pro StrV-1 1,15 % a pro OLV-1 1,05 %.

Tabulka 30. Statistické parametry pro stanovení opakovatelnosti detekce SMYEV

Série	Průměr	SD	VK
S1	29,57	0,25	0,0084
S2	29,54	0,21	0,0072
S3	29,57	0,24	0,0081
Průměrné hodnoty	29,56	0,23	0,0079
		SD VK	0,0005

Tabulka 31. Statistické parametry pro stanovení opakovatelnosti detekce SCV-A

Série	Průměr	SD	VK
S1	30,20	0,20	0,0067
S2	30,26	0,11	0,0035
S3	30,28	0,11	0,0037
Průměrné hodnoty	30,25	0,14	0,0046
		SD VK	0,0015

Tabulka 32. Statistické parametry pro stanovení opakovatelnosti detekce SCV-B

Série	Průměr	SD	VK
S1	29,74	0,24	0,0081
S2	29,57	0,17	0,0057
S3	29,70	0,21	0,0072
Průměrné hodnoty	29,67	0,21	0,0070
		SD VK	0,0010

Tabulka 33. Statistické parametry pro stanovení opakovatelnosti detekce SVBV

Série	Průměr	SD	VK
S1	28,93	0,17	0,0059
S2	28,94	0,15	0,0052
S3	29,15	0,21	0,0071
Průměrné hodnoty	29,01	0,18	0,0060
		SD VK	0,0008

Tabulka 34. Statistické parametry pro stanovení opakovatelnosti detekce SMOv

Série	Průměr	SD	VK
S1	26,31	0,06	0,0023
S2	26,17	0,15	0,0056
S3	26,33	0,13	0,0048
Průměrné hodnoty	26,27	0,11	0,0042
		SD VK	0,0014

Tabulka 35. Statistické parametry pro stanovení opakovatelnosti detekce SPV-1

Série	Průměr	SD	VK
S1	26,13	0,15	0,0057
S2	26,21	0,21	0,0080
S3	26,37	0,11	0,0041
Průměrné hodnoty	26,24	0,16	0,0059
		SD VK	0,0016

Tabulka 36. Statistické parametry pro stanovení opakovatelnosti detekce StrV-1

Série	Průměr	SD	VK
S1	30,49	0,42	0,0139
S2	29,96	0,32	0,0105
S3	30,34	0,30	0,0100
Průměrné hodnoty	30,26	0,35	0,0115
		SD VK	0,0017

Tabulka 37. Statistické parametry pro stanovení opakovatelnosti detekce OLV-1

Série	Průměr	SD	VK
S1	31,63	0,43	0,0137
S2	31,73	0,27	0,0084
S3	31,87	0,30	0,0094
Průměrné hodnoty	31,74	0,33	0,0105
		SD VK	0,0023

5.2.1.4 Reprodukovatelnost

Při shodném ředění 500 kopií konkrétního standardu na reakci byla pro všechny viry stanovena reprodukovatelnost detekčního systému. Pro tři pracovníky laboratoře byly připraveny tři sady po osmi vzorcích. Z hodnot Ct byl pro každý virus vypočítán variační koeficient, jehož hodnota se očekávala nižší než 5 %. Pro všechny viry byl variační koeficient nižší, což vede k závěru, že detekční systémy StrawVir I a StrawVir II v multiplexním uspořádání jsou robustní a jejich aplikace do praxe různými pracovníky neovlivňuje výsledky testování. Výsledky jsou uvedeny v Tabulkách 38 – 45.

Tabulka 38. Stanovení reprodukovatelnosti detekce SMYEV

Běh/Série	Ct hodnoty pro koncentraci 500 kopií/reakce							
I/S1	29,54	29,77	29,62	29,77	29,27	29,14	29,93	29,50
II/S1	29,47	29,61	29,94	29,63	29,97	29,82	29,81	29,88
III/S1	29,80	29,47	29,66	29,88	29,54	29,95	29,35	29,29
I/S2	29,55	29,72	29,34	29,32	29,93	29,32	29,70	29,44
II/S2	29,58	29,92	29,58	29,91	29,99	29,78	29,62	29,86
III/S2	29,56	29,52	29,67	29,88	29,84	30,04	29,69	29,54
I/S3	29,82	29,42	29,52	29,72	29,76	29,23	29,24	29,86
II/S3	29,47	29,82	29,42	29,55	29,76	29,92	29,95	29,65
III/S3	29,02	29,62	29,81	29,32	29,66	29,82	29,92	29,50
Průměr	29,65		Směrodatná odch.		0,23	Variační koeficient		0,0078

Tabulka 39. Stanovení reprodukovatelnosti detekce SCV-A

Běh/Série	Ct hodnoty pro koncentraci 500 kopií/reakce							
I/S1	30,51	30,05	30,04	30,52	30,15	30,15	29,93	30,26
II/S1	30,45	30,42	29,91	30,52	30,04	30,58	30,47	30,48
III/S1	30,74	30,70	30,56	30,38	30,75	30,57	30,65	30,52
I/S2	30,40	30,24	30,07	30,15	30,29	30,20	30,32	30,38
II/S2	30,58	30,51	30,24	30,43	30,37	30,47	30,34	31,09
III/S2	30,61	30,78	30,87	30,04	30,51	30,52	30,95	30,85
I/S3	30,24	30,39	30,16	30,36	30,09	30,25	30,44	30,32
II/S3	30,96	30,22	30,38	30,65	30,63	30,50	30,38	30,66
III/S3	30,58	30,56	30,11	30,07	30,38	30,42	30,30	30,09
Průměr	30,41		Směrodatná odch.		0,25	Variační koeficient		0,0082

Tabulka 40. Stanovení reprodukovatelnosti detekce SCV-B

Běh/Série	Ct hodnoty pro koncentraci 500 kopií/reakce							
I/S1	29,26	29,46	29,82	29,92	30,05	29,78	29,87	29,77
II/S1	30,08	29,83	29,76	29,84	29,73	29,40	29,84	29,62
III/S1	29,61	29,54	30,04	29,95	29,31	30,26	29,99	29,31
I/S2	29,67	29,27	29,47	29,48	29,77	29,47	29,82	29,59
II/S2	29,99	29,61	29,85	29,63	29,74	29,68	29,44	30,05
III/S2	29,58	29,93	30,00	29,92	29,81	30,27	29,87	30,07
I/S3	29,66	29,70	29,37	29,49	29,94	29,76	30,08	29,62
II/S3	29,73	29,51	29,95	29,40	29,53	29,83	30,07	29,62
III/S3	29,70	29,71	29,52	29,96	29,90	29,94	29,68	29,60
Průměr	29,74		Směrodatná odch.		0,23	Variační koeficient		0,0078

Tabulka 41. Stanovení reprodukovatelnosti detekce SVBV

Běh/Série	Ct hodnoty pro koncentraci 500 kopií/reakce							
I/S1	28,63	28,76	29,16	29,15	28,94	29,02	28,91	28,89
II/S1	29,80	28,96	29,50	29,24	29,17	29,38	29,10	29,33
III/S1	29,12	29,09	29,25	28,92	29,17	29,08	29,05	29,19
I/S2	28,63	28,86	28,90	29,07	29,00	29,08	28,84	29,10
II/S2	29,50	29,12	29,34	29,68	29,16	29,19	29,31	29,16
III/S2	29,10	29,26	29,30	29,12	29,27	29,69	29,46	29,39
I/S3	29,51	29,37	28,93	29,06	29,08	29,04	29,32	28,90
II/S3	29,12	29,15	29,24	29,34	29,50	29,37	29,20	29,56
III/S3	29,25	29,51	29,34	29,33	29,48	29,19	28,73	29,33
Průměr	29,18		Směrodatná odch.		0,24	Variační koeficient		0,0081

Tabulka 42. Stanovení reprodukovatelnosti detekce SMOV

Běh/Série	Ct hodnoty pro koncentraci 500 kopií/reakce							
I/S1	26,36	26,31	26,31	26,38	26,26	26,37	26,29	26,19
II/S1	26,38	26,45	26,30	26,49	25,95	25,88	26,23	26,18
III/S1	26,57	26,24	26,46	26,31	26,52	26,41	26,72	26,37
I/S2	25,96	26,31	26,03	26,31	26,32	26,26	25,98	26,21
II/S2	26,36	26,34	26,50	26,24	26,45	26,31	26,33	26,15
III/S2	26,54	26,79	26,56	26,63	26,57	26,57	26,61	26,78
I/S3	26,30	26,23	26,27	26,16	26,44	26,60	26,32	26,31
II/S3	26,20	25,96	26,14	26,06	26,36	26,48	26,32	26,19
III/S3	26,57	26,86	26,83	27,04	26,85	26,76	27,01	26,49
Průměr	26,39		Směrodatná odch.		0,24	Variační koeficient		0,0092

Tabulka 43. Stanovení reprodukovatelnosti detekce SPV-1

Běh/Série	Ct hodnoty pro koncentraci 500 kopií/reakce							
I/S1	26,23	26,18	25,94	25,95	25,94	26,19	26,30	26,29
II/S1	26,33	26,36	26,25	26,19	26,26	26,43	26,22	26,17
III/S1	26,76	26,85	26,75	26,76	26,28	26,67	26,28	26,39
I/S2	26,57	26,24	26,09	26,20	26,37	26,27	25,79	26,18
II/S2	25,99	26,09	26,22	26,38	26,22	26,02	26,19	26,13
III/S2	26,77	26,42	26,50	26,55	26,94	26,41	26,59	26,36
I/S3	26,49	26,32	26,28	26,42	26,51	26,25	26,21	26,46
II/S3	26,33	25,94	26,34	26,26	26,63	26,57	26,28	26,21
III/S3	26,64	26,91	26,83	26,72	26,82	26,88	26,32	26,58
Průměr	26,37		Směrodatná odch.		0,26	Variační koeficient		0,0098

Tabulka 44. Stanovení reprodukovatelnosti detekce StrV-1

Běh/Série	Ct hodnoty pro koncentraci 500 kopií/reakce							
I/S1	30,29	30,19	29,88	31,04	30,33	30,47	30,46	31,27
II/S1	30,87	30,83	31,55	30,46	29,83	30,85	29,39	31,23
III/S1	30,36	30,32	31,25	31,01	30,89	31,30	30,21	29,84
I/S2	29,42	30,16	29,79	30,46	29,63	30,20	29,91	30,09
II/S2	31,87	31,41	30,15	31,97	31,95	32,36	31,53	32,26
III/S2	31,48	31,22	31,14	31,11	30,51	29,71	30,97	30,53
I/S3	30,02	30,44	30,33	30,72	30,57	30,64	29,77	30,21
II/S3	30,72	30,20	30,77	30,67	30,33	30,65	31,52	30,34
III/S3	30,20	31,25	30,43	31,15	30,50	30,47	31,68	31,25
Průměr	30,68		Směrodatná odch.	0,66	Variační koeficient	0,0215		

Tabulka 45. Stanovení reprodukovatelnosti detekce OLV-1

Běh/Série	Ct hodnoty pro koncentraci 500 kopií/reakce							
I/S1	31,92	31,78	32,30	31,77	32,63	31,43	32,00	31,37
II/S1	31,71	31,83	31,81	31,82	32,07	31,09	31,41	32,29
III/S1	32,03	32,23	31,40	32,22	31,38	31,52	31,27	31,01
I/S2	31,88	31,29	31,49	32,26	31,80	31,89	32,17	31,61
II/S2	32,13	31,35	31,63	32,25	31,42	31,52	31,48	31,78
III/S2	31,38	31,63	32,33	31,75	31,71	31,56	31,88	31,58
I/S3	32,03	31,71	32,00	31,26	31,88	31,90	32,10	31,73
II/S3	31,94	31,31	31,47	32,07	31,70	31,52	31,16	32,04
III/S3	32,35	31,50	32,02	31,41	31,90	31,79	32,20	31,81
Průměr	31,76		Směrodatná odch.	0,34	Variační koeficient	0,0108		

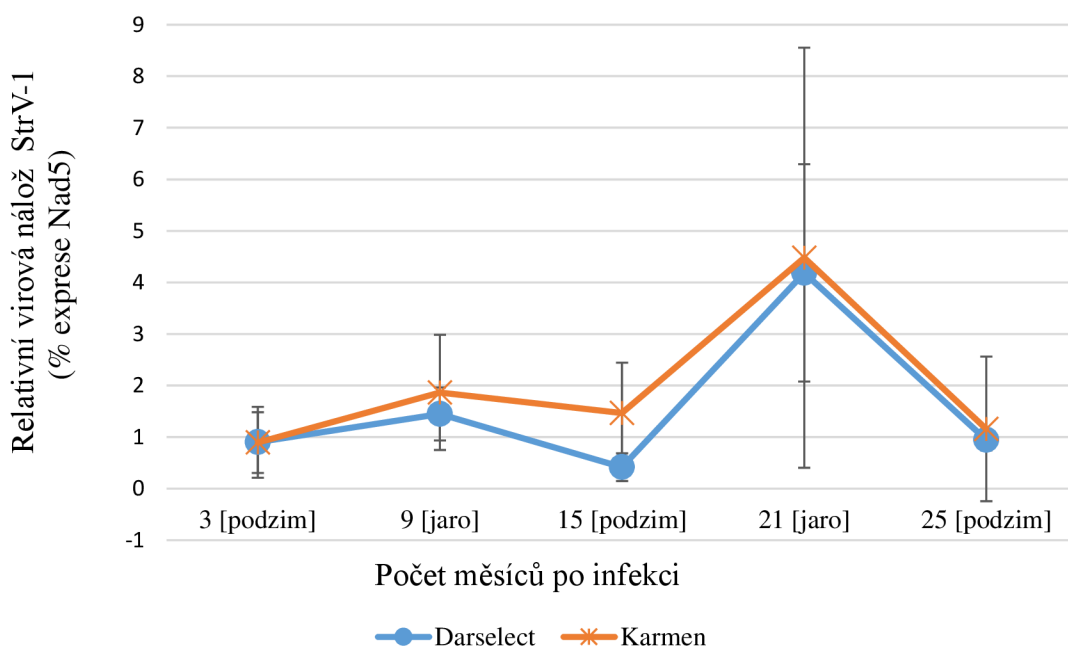
Popis vývoje systému pro real-time PCR detekci virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1, jeho validace a použití jsou uvedeny v certifikované metodice „Real-time PCR detekce virů Strawberry mild yellow edge virus (SMYEV), Strawberry crinkle virus (SCV), Strawberry vein banding virus (SVBV), Strawberry mottle virus (SMoV) a Strawberry polerovirus-1 (SPV-1) v biologickém materiálu“ (Čmejla & Valentová 2020). Detekční systém pro tyto viry byl zformulován do podoby uživatelsky příjemné diagnostické soupravy StrawVir I (funkční vzorek) a pro viry StrV-1 a OLV-1 do soupravy StrawVir II, které obsahují všechny reagenty a standardy pro jednoduché použití. Validace detekčního systému pro OLV-1 je popsána v publikaci „Vývoj a validace diagnostického real-time PCR systému pro detekci olive latent viru 1 (OLV-1) v rostlinách jahodníku“ (Valentová et al. 2021a).

5.2.2 Využití detekčního systému pro diagnostiku virů jahodníku

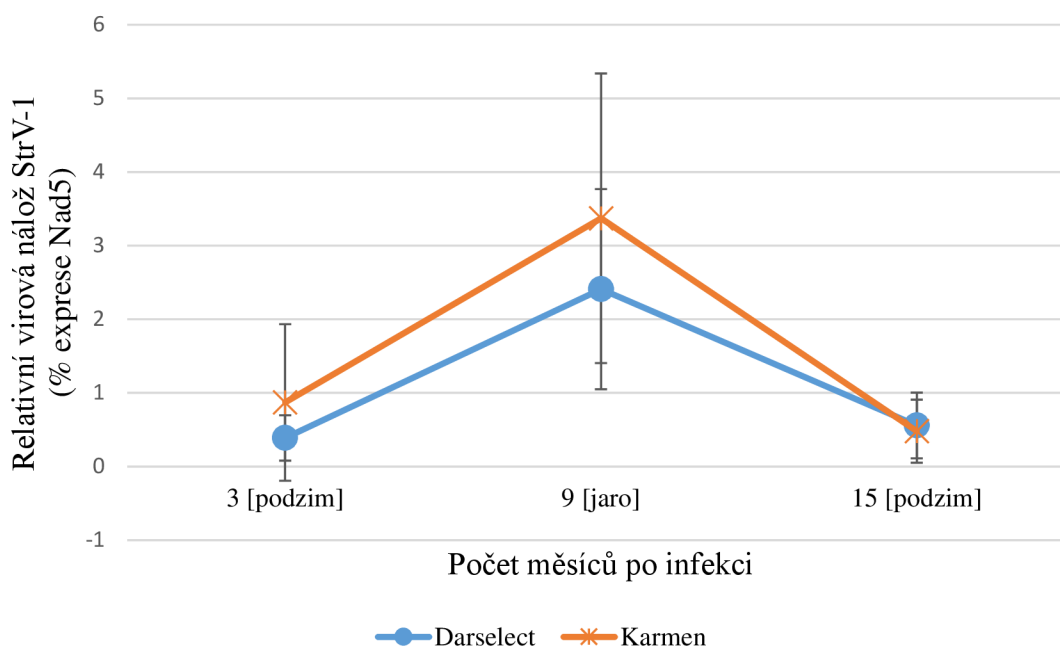
5.2.2.1 Hospodářská škodlivost

Během řešení projektu, který se zabýval problematikou virů jahodníku, byl metodou HTS nalezen nový virus StrV-1. Do budoucna se dá předpokládat, že se metoda HTS díky

snižování nákladů na její provedení stane důležitou a hojně využívanou metodou pro testování zdravotního stavu rostlin. Problém však je, do jaké míry jsou nově nalezené viry pro rostliny nebezpečné a jak významné mohou na rostlinách vyvolávat hospodářské ztráty. Proto bylo důležité zjistit, jak závažná bude hospodářská škodlivost StrV-1 v případě jeho rozšíření v porostech jahodníku. Detekční systémy StrawVir I a StrawVir II byly použity při zahájení pokusu pro testování zdravotního stavu rostlin (skupina A i B), které byly předmětem hodnocení hospodářské škodlivosti. StrawVir II byl ještě využit pro testování přítomnosti sledovaného StrV-1 v rostlinách v jarních a podzimních měsících po celou dobu řešení projektu. Skupina rostlin A byla sledována 3 roky a byla testována celkem pětkrát, skupina B byla předmětem testování 2 roky, testování proběhlo 3x. Grafické znázornění výsledků pro sledovanou skupinu A a B je uvedeno v Grafech 3 a 4, ze kterých je patrné, že relativní virová nálož StrV-1 se v jahodnicích na jaře oproti podzimu zvyšuje. Na základě testování jahodníků diagnostickým kitem StrawVir II jsme došli k závěru, že námi navržený detekční systém je funkční a výsledky testování korelují s faktem, že koncentrace virů je v jarních měsících, kdy dochází k intenzivnímu růstu rostlin, vyšší, než je tomu na podzim.



Graf 3. Relativní virová nálož vztahovaná k expresi mitochondriálního genu *Nad5* (referenčního genu) pro skupinu vzorků A, která byla zastoupena jahodníky, které byly v rámci hodnocení hospodářské škodlivosti testovány na přítomnost StrV-1 v období od září 2019 do září 2021.



Graf 4. Relativní virová nálož vztažená k expresi mitochondriálního genu *Nad5* (referenčního genu) pro skupinu vzorků B, která byla zastoupena jahodníky, které byly v rámci hodnocení hospodářské škodlivosti testovány na přítomnost StrV-1 v období od září 2020 do září 2021

Metodika provedení experimentu, jehož výsledkem je stanovení hospodářské škodlivosti StrV-1 v jahodnicích je uvedena v kapitole 4.3.2.1 Hodnocení hospodářské škodlivosti. Během pokusu byly hodnoceny parametry: vizuální symptomy na rostlině, násada květů, hmotnost a velikost plodů, obsah refraktometrické sušiny, pevnost dužniny a nárůst zelené hmoty včetně počtu šlahounů. Výsledky jednotlivých parametrů byly vyhodnoceny ze 169 měření. Rostliny ve skupině A byly sledovány dva roky, ve skupině B jeden rok. V průběhu hodnocení hospodářské škodlivosti v obou skupinách A i B bylo pro odrůdu Darselect provedeno celkem 25 měření u StrV-1 (+) rostlin a 47 u StrV-1 (-); pro odrůdu Karmen byly hodnoceny parametry u 39 StrV-1 (+) jahodníků a 58 StrV-1 (-).

Po celou dobu experimentu byly všechny rostliny pravidelně sledovány z hlediska výskytu symptomů. Na rostlinách odrůdy Darselect ani Karmen nebyly pozorovány žádné příznaky, které by souvisely s infekcí StrV-1.

Výsledky hodnocení kvetení jsou uvedeny v Tabulce 46. Celkem bylo na pokusných rostlinách zaznamenáno 1035 květenství a 5148 květů. Nástup kvetení nebyl infekcí StrV-1 ovlivněn ani u jedné odrůdy. Data u odrůdy Darselect ukázala významné snížení průměrného počtu květenství o 23,6 % ($p = 0,047$) v infikovaných rostlinách, což se odrazilo ve snížení průměrného počtu květů na rostlinu o 16,5 % (nevýznamné). V případě odrůdy Karmen došlo

významně ke snížení průměrného počtu květenství a květů na rostlinu o 29,6 %, resp. 27,4 % (p = 0,007 a p = 0,004).

Tabulka 46. Vliv infekce StrV-1 na kvetení jahod u odrůd Darselect a Karmen

Odrůda	StrV-1	n	Průměrný počet květenství na rostlinu	Průměrný počet květů na rostlinu	Průměrný počet květů v květenství
Darselect					
StrV-1 (+) n = 25	Median		4,0	16,0	4,3
	Průměr		4,5	18,0	4,3
	SD		2,7	9,1	1,0
StrV-1 (-) n = 47	Median		6,0	22,0	3,8
	Průměr		5,9	21,6	3,9
	SD		2,8	8,1	0,9
Poměr průměrů (+)/(-)			76,4 %	83,5 %	111,3 %
t-test p hodnota			0,047	0,099	0,056
Karmen					
StrV-1 (+) n = 39	Median		4,0	28,0	5,6
	Průměr		5,3	31,0	6,4
	SD		3,3	15,9	2,1
StrV-1 (-) n = 58	Median		7,0	41,0	5,8
	Průměr		7,5	42,7	6,5
	SD		4,5	22,4	2,2
Poměr průměrů (+)/(-)			70,4 %	72,6 %	99,4 %
t-test p hodnota			0,007	0,004	0,926

V Tabulce 47 jsou shrnuty výsledky z hodnocení parametrů týkajících se sklizených plodů. Celkem bylo hodnoceno 1315 plodů pro odrůdu Darselect a 2174 pro odrůdu Karmen. U odrůdy Darselect nebyly zaznamenány mezi infikovanými StrV-1 a kontrolními rostlinami významné rozdíly v hodnocených parametrech - průměrná hmotnost a průměr plodů, poměr plodů ke květům, pevnost, obsah cukru a kvalita plodů. Výrazněji se lišila data pro průměrný počet plodů na rostlinu a průměrnou sklizeň z rostliny. Z výsledků dat však vylývá, že nedošlo k významnému poklesu obou parametrů (14,5 %; 11,7 %). Přítomnost StrV-1 u odrůdy Karmen významně ovlivnila hmotnost plodů a průměrný počet plodů a výnos na rostlinu. Data potvrdila snížení parametrů hmotnost plodů o 5 % (p = 0,049), průměrného počtu plodů na rostlinu o 27,6 % (p = 0,0009) a tím i výnosu na rostlinu o 31,8 % (p = 0,0004). Ve srovnání s kontrolními rostlinami byly parametry průměrná pevnost, cukernatost a obsah cukru v plodech mírně (i když významně) vyšší u pozitivních StrV-1 rostlin odrůdy Karmen.

Výsledky hodnocení týkající se měření nárůstu zelené hmoty a počtu nově narostlých šlahounů jsou shrnuty v Tabulce 48. V případě odrůdy Darselect data ukazují, že k významnému snížení o 25,8 % (p = 0,027) došlo u hodnoty průměrné hmotnosti nadzemních

části rostliny. Zatímco průměrná hmotnost listů byla snížena pouze o 9,2 % (nevýznamné). Rozdílná dynamika těchto dvou parametrů měla za následek významné ($p = 0,005$) zvýšení poměru hmotnosti listů k hmotnosti rostliny o 15 % u StrV-1 infikovaných rostlin. U odrůdy Karmen byla pro všechna měření průměrná hmotnost nadzemních částí rostliny a průměrná hmotnost listů výrazně a jak vyplývá z dat, tak i významně nižší. Průměrná hmotnost nadzemních částí rostliny klesla o 40 % ($p = 0,0003$) a průměrná hmotnost listů o 41,4 % ($p = 0,00001$). U obou odrůd došlo k významnému snížení počtu šlahounů u Darselect o 49,2 % ($p = 0,004$) a Karmen o 42,3 % ($p = 0,0027$).

Tabulka 47. Vliv infekce StrV-1 na parametry hodnocené v rámci hospodářské škodlivosti: poměr plodů ke květům, hmotnost a velikost plodů, obsah refraktometrické sušiny, pevnost dužniny plodů a jakostní třída plodů u odrůd Darselect a Karmen

Odrůda	StrV-1	n	Plod/květ (poměr)	Průměrný počet plodů na rostlinu	Průměrná sklizeň na rostlinu (g)	Průměrná hmotnost plodu (g)	Průměrná velikost plodu (mm)	Průměrná pevnost plodu (Durofel)	Průměrná cukernatost (% Brix)	Průměrná jakostní třída (1-4)
Darselect										
StrV-1 (+) n = 25	Median		0,91	16,0	159,30	9,7	28,1	44,5	7,2	2,0
	Průměr		0,98	16,4	191,10	11,6	28,7	44,4	7,3	1,8
	SD		0,27	6,7	88,63	7,8	7,4	9,0	2,2	0,9
StrV-1 (-) n = 47	Median		0,88	20,0	185,60	9,3	27,1	44,0	7,2	2,0
	Průměr		0,93	19,2	216,37	11,2	27,9	43,5	7,3	1,9
	SD		0,27	6,8	94,46	8,1	7,4	8,5	2,1	1,0
Poměr průměrů (+)/(-) t-test p hodnota			105,4 % 0,462	85,5 % 0,105	88,3 % 0,280	103,3 % 0,430	102,7 % 0,085	102,1 % 0,081	100,5 % 0,785	95,7 % 0,131
Karmen										
StrV-1 (+) n = 39	Median		0,59	16,0	115,1	6,5	24,6	26,5	6,9	2,0
	Průměr		0,64	18,3	141,1	7,7	25,2	27,5	7,3	2,3
	SD		0,23	8,2	77,9	5,2	7,5	9,2	2,7	1,0
StrV-1 (-) n = 58	Median		0,61	22,0	196,6	6,9	24,6	25,0	6,7	2,0
	Průměr		0,63	25,2	207,0	8,2	25,3	26,0	7,0	2,2
	SD		0,19	11,5	91,5	5,7	7,6	8,2	2,5	1,0
Poměr průměrů (+)/(-) t-test p hodnota			101,3 % 0,851	72,4 % 0,0009	68,2 % 0,0004	94,1 % 0,049	99,5 % 0,737	106,1 % 0,0001	103,7 % 0,032	104,7 % 0,025

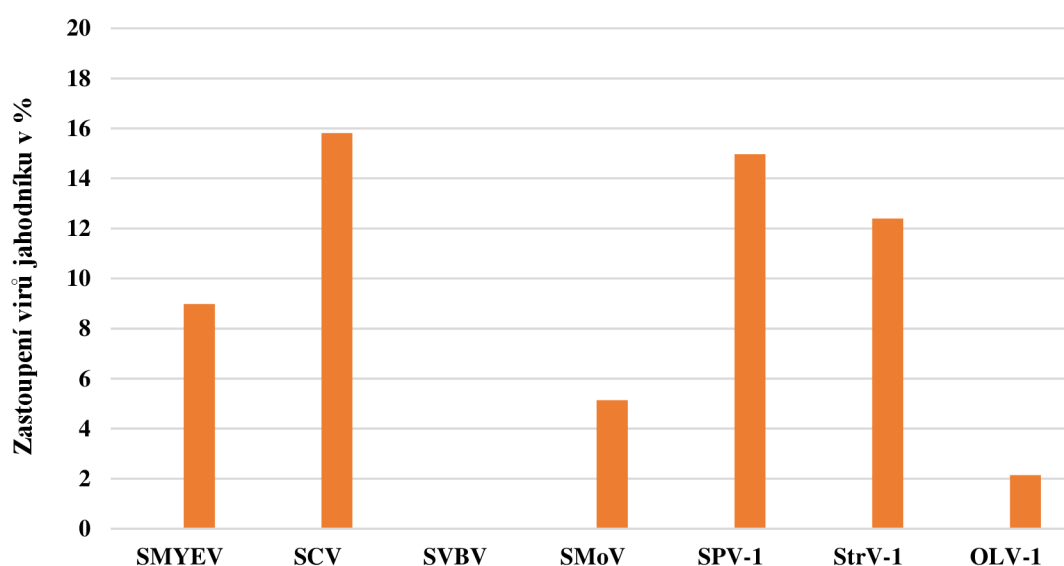
Tabulka 48. Vliv infekce StrV-1 na růstové parametry odrůd Darselect a Karmen.

Odrůda	StrV-1	n	Průměrná hmotnost rostliny (g)	Průměrná hmotnost listů (g)	Poměr hmotnosti listů/rostlina	Průměrný počet šlahounů
Darselect						
StrV-1 (+) n = 25	Median		58,8	51,6	0,776	1,0
	Průměr		75,6	56,0	0,767	1,5
	SD		37,9	24,7	0,112	1,6
StrV-1 (-) n = 47	Median		89,9	59,5	0,667	3,0
	Průměr		101,9	61,7	0,667	2,9
	SD		49,9	20,5	0,174	2,1
Poměr průměrů (+)/(-)			74,2 %	90,8 %	115,0 %	50,8 %
t-test p hodnota			0,027	0,309	0,005	0,004
Karmen						
StrV-1 (+) n = 39	Median		59,1	33,5	0,596	2,0
	Průměr		69,8	38,9	0,625	2,9
	SD		44,5	19,4	0,199	2,8
StrV-1 (-) n = 58	Median		89,0	56,3	0,584	4,0
	Průměr		116,2	66,3	0,612	5,1
	SD		75,1	36,3	0,140	3,7
Poměr průměrů (+)/(-)			60,0 %	58,6 %	102,2 %	57,7 %
t-test p hodnota			0,0003	0,00001	0,725	0,0027

Na základě výsledků hodnocení hospodářské škodlivosti vyplývá, že bezpříznaková infekce StrV-1 může vést ke ztrátám na výnosu jahod až o 32 % v závislosti na odrůdě a dalších sezónních podmínkách. Pravděpodobně hlavní příčinou snížení výnosu bylo dáno nižším počtem květenství na rostlinu. Detailnější výsledky jsou uvedeny v publikaci s názvem „Symptomless infection by strawberry virus 1 (StrV-1) leads to losses in strawberry yields“ (Valentova et al. 2022). Českému čtenáři byly poznatky o novém viru jahodníku StrV-1 a jeho hospodářské činnosti představeny v recenzované publikaci v Zahradnictví (Valentová et al. 2021b).

5.2.2.2 Monitoring virů jahodníku

Zastoupení jednotlivých virů v jahodnicích pocházejících z produkčních výsadeb je uvedeno v Grafu 5. Z výsledků je patrné, že se v jahodnickových porostech nejčastěji vyskytoval SCV. Naopak SVBV nebyl ve výsadbách zachycen vůbec. Co se týká virů SPV-1, StrV-1 a OLV-1, pro které neplatí povinnost testování pro kontrolu zdravotního stavu rostlin podle vyhlášky 96/2018 Sb., byl nejčastěji nalezeným virem SPV-1. Vzhledem k tomu, že procento výskytu viru je 15 %, bylo by vhodné se zabývat doporučením, které ve své studii navrhuji Thekke-Veetil a Tzanetakis (2016) a zařadit virus do testovacího schématu pro kontrolu zdravotního stavu. Nízké procento výskytu OLV-1 svědčí o tom, že je jeho hlavní hostitelskou rostlinou olivovník a jahodník je napadán pouze okrajově.



Graf 5. Procentuální zastoupení virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV, SPV-1, StrV-1 a OLV-1 v jahodnicích pocházejících z produkčních výsadeb

Byl proveden průzkum přítomnosti virů v nakoupené sadbě v zahradnictvích a v obchodních řetězcích. Konkrétní výsledky jsou uvedeny v publikaci „Výskyt virů v sazenicích jahodníku zakoupených v České republice“ (Valentová et al. 2019). Detekčním systémem StrawVir I a StrawVir II bylo testováno 108 jahodníků. Všechny vzorky kromě čtyř rostlin byly na testované viry negativní. Ve třech rostlinách odrůdy Senga Sengana, které byly nakoupeny ve stejném obchodním řetězci, byl detekován SCV. Navíc byl ještě v jedné rostlině v koinfekci nalezen SMoV. Čtvrtá rostlina odrůda Honeoye pocházející ze zahradnictví byla infikována SCV. Zajímavé je, že ani jedna ze čtyř pozitivních rostlin na výše uvedené viry nevykazovala symptomy.

Analýza vzorků z rostlin uchovávaných v technické izolaci v certifikačním stupni superelita potvrdila očekávaný výsledek. Viry jahodníku, které jsou uvedeny na seznamu virů, na které se testuje rozmnožovací materiál, se v rostlinách nevyskytovaly. Současně nebyly detekovány ani viry SPV-1 a OLV-1. Ve 43,8 % rostlin byl však zjištěn pozitivní nález StrV-1, což vede společně s výsledky testování hospodářské škodlivosti viru k závěru, zda by nebylo vhodné tento virus zařadit na seznam virů určených pro testování rozmnožovacího materiálu.

Diagnostické soupravy StrawVir I a II byly také použity při studiu nově objeveného viru jahodníku Strawberry Virus A (StrVA) (Koloniuk et al. 2022). V rámci výzkumu byl v

jahodnicích sledován vliv smíšených infekcí na charakterizaci biologických vlastností StrVA a na ovlivňování zdravotního stavu rostlin.

Soupravy byly také poskytnuty norským kolegům pro řešení společného mezinárodního projektu s názvem „Healthy berries in a changing climate: development of new biotechnological procedures for virus diagnostics, vector studies, elimination and safe preservation of strawberry and raspberry“.

5.3 Diagnostický systém pro detekci virů rybízu a jeho využití v praxi

5.3.1 Výkonnostní charakteristiky multiplexní real-time PCR reakce

5.3.1.1 Specificita

Po porovnání dostupných sekvencí virů BRV a GVBaV byla vybrána pro oba viry nejkonzervovanější oblast jejich genomu, do které byly navrženy primery a sondy. Pro detekci BRV byly primery a sondy navrženy do 3' UTR oblasti, která je přítomna u obou segmentů RNA1 a RNA2 genomu viru. Sekvence segmentů jsou dlouhé 1360 a 1363 nt (pro RNA1 a RNA2). Lehto et al. (2004) uvádí, že 3' UTR oblasti RNA1 a RNA2 jsou vzájemně identické z 94,1 – 98,8 % (podle typu analyzovaného izolátu). Primery pro detekci GVBaV byly navrženy do oblasti ORF3, což je nejprosekvenovanější oblast virového genomu. Přestože se GVBaV řadí mezi DNA viry, byla vstupním materiálem do PCR reakce celková RNA. Mohlo tak dojít k současné detekci obou virů v jedné reakci. Primery pro end-point PCR (tzv. vnější primery) sloužily pro kontrolu funkčnosti systému primerů a sond určeného pro real-time PCR metodu. Sondy a primery pro real-time PCR byly navrženy uvnitř úseku sekvence viru BRV nebo GVBaV, který byl amplifikován metodou end-point PCR. Sondy pro BRV byly značeny fluoroforem FAM a pro GVBaV fluoroforem HEX, což umožnilo provést multiplexování. Konečné sekvence sond a primerů včetně velikosti amplifikovaného úseku jsou uvedeny v Tabulce 49.

Tabulka 49. Přehled finálních primerů a sond pro detekci BRV a GVBaV, včetně velikosti amplifikovaného úseku

BRV:	Sekvence + velikost amplifikovaného úseku
Vnitřní primery + sonda	85 bp
Forward primer:	ACTTGGGAGACAAAGTCTCATCC
Reverse primer:	GGTARGGGTTTGCTAATAATGAGC
Sonda:	FAM-CTACTTGCCCTATCAGTAGGGATGGGA-BHQ1
Vnější primery:	632 bp
Forward primer:	GRGGTTTCAAGGGATGTCATCA
Reverse primer:	ATCAGGCTCGGAAGCAGTARACC
GVBaV:	
Vnitřní primery + sonda	111 bp
Forward primer:	CCGCAGMACAGGAAGAGATYCT
Reverse primer 1:	GGGCCTGGGCTTCCAGC
Reverse primer 2:	TTTGGACCTGGGCTTCTAGC
Sonda:	HEX-ATCCTTCGTCYTTGGGCTGGACCTC-BHQ1
Vnější primery:	222 bp
Forward primer:	AGCTGCGGTTTCGGGAGATG
Reverse primer:	CGAATCATTTATGGTGAAGTCATCC

Metodou end-point PCR s použitím sady vnějších primerů byly testovány vzorky, které byly odebrány území České republiky. Nalezené pozitivní a negativní vzorky pak sloužily k ověření specificity diagnostického systému na principu real-time PCR. Specificita navrženého systému byla 100%, protože výsledky testování obou metod byly shodné, pozitivní vzorky byly pozitivní a negativní vzorky byly negativní. Z celkového počtu 204 odebraných rostlin, ze kterých byla izolována RNA, bylo nalezeno 103 vzorků pozitivních na přítomnost BRV a 62 vzorků pozitivních na přítomnost GVBaV.

5.3.1.2 Senzitivita

Pro analýzu vlivu multiplexování byly porovnány výsledky detekce virů BRV a GVBaV v simplexním a multiplexním uspořádání při různých koncentracích syntetické pozitivní kontroly. Z výsledků uvedených v Tabulkách 50 a 51 vyplývá, že hodnoty Ct jsou pro oba viry v obou provedeních srovnatelné a že multiplexování nemá negativní vliv na výkonnost testu.

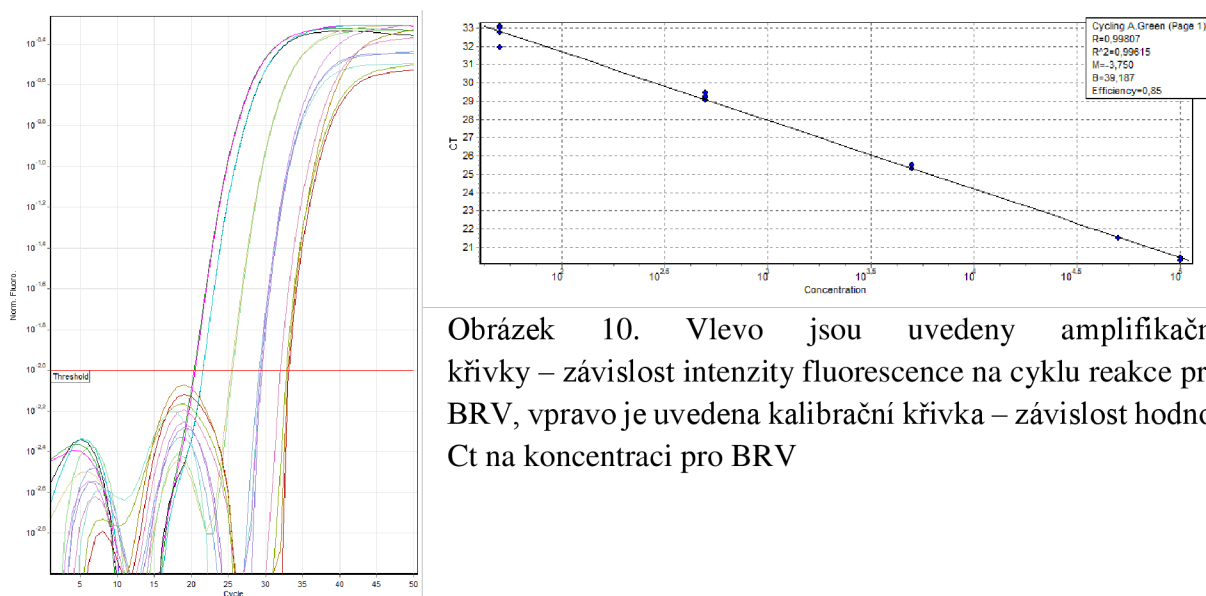
Tabulka 50. Stanovení senzitivity pro BRV - vliv multiplexování

Ředění kopie/reakce	Simplex			Multiplex		
	Hodnota Ct	SD	Průměr	Průměr	SD	Hodnota Ct
100 000	20,95	0,3300	20,62	20,42	0,0650	20,35
100 000	20,29					20,48
50 000	21,71	0,1100	21,60	21,56	0,0000	21,56
50 000	21,49					21,56
5 000	25,56	0,1600	25,40	25,45	0,0800	25,37
5 000	25,24					25,53
500	29,40	0,1901	29,34	29,29	0,1320	29,26
500	29,53					29,10
500	29,02					29,47
500	29,39					29,31
50	32,56	0,3387	32,78	32,72	0,4565	31,96
50	33,34					33,13
50	32,47					33,01
50	32,75					32,78
5	34,87	0,4447	35,17	36,93	0,0100	neg
5	34,69					36,94
5	35,85					neg
5	35,26					36,92

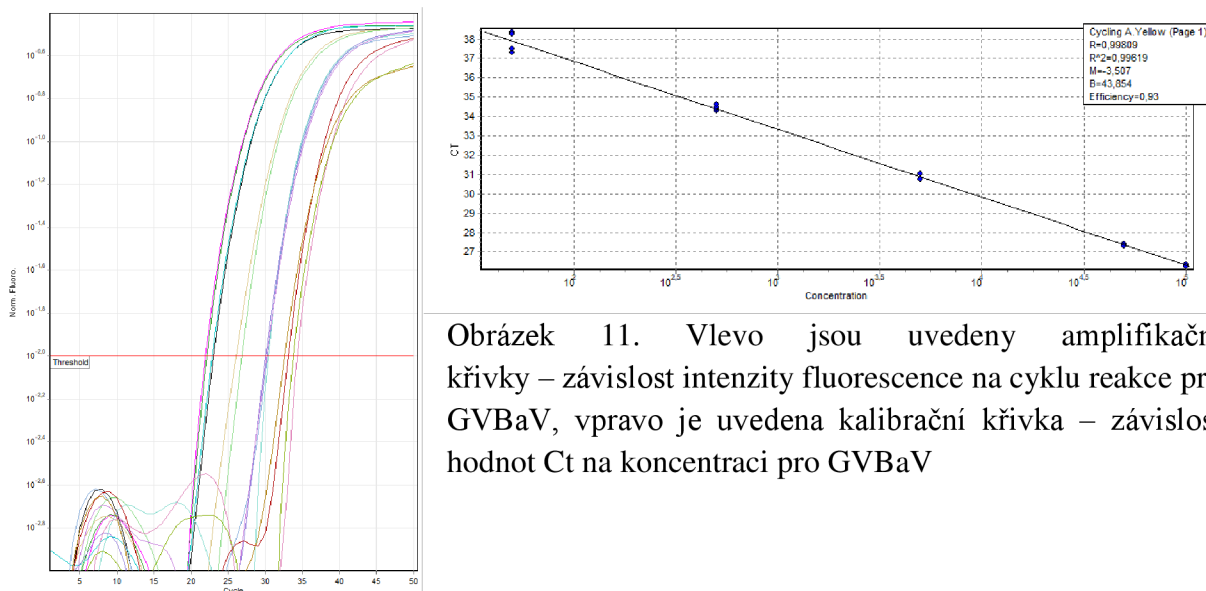
Tabulka 51. Stanovení senzitivity pro GVBaV - vliv multiplexování

Ředění kopie/reakce	Simplex			Multiplex		
	Hodnota Ct	SD	Průměr	Průměr	SD	Hodnota Ct
100 000	21,87	0,0950	21,78	22,00	0,1050	22,10
100 000	21,68					21,89
50 000	22,91	0,0800	22,99	22,91	0,1000	23,01
50 000	23,07					22,81
5 000	26,04	0,2100	26,25	26,39	0,3800	26,01
5 000	26,46					26,77
500	29,96	0,1677	30,17	30,20	0,1339	30,38
500	30,27					30,24
500	30,39					30,01
500	30,07					30,16
50	34,14	0,2977	33,82	33,44	0,6520	34,30
50	33,44					33,09
50	33,62					32,59
50	34,08					33,78
5	35,45	0,1450	35,45	36,93	2,3344	neg
5	35,57					40,23
5	35,21					35,36
5	35,56					35,20

Z hodnot Ct, které odpovídaly testovaným koncentracím syntetického standardu příslušného viru, byla sestrojena kalibrační křivka a byly vyhodnoceny parametry - korelační koeficient R^2 a účinnost amplifikace (Efficiency). Hodnota korelačního koeficientu pro BRV byla 0,998 a účinnost amplifikace 85%; pro GVBaV byla hodnota korelačního koeficientu 0,996 a účinnost amplifikace 93 %. Na Obrázcích 10 a 11 jsou ukázány amplifikační a kalibrační křivky pro jednotlivá ředění.



Obrázek 10. Vlevo jsou uvedeny amplifikační křivky – závislost intenzity fluorescence na cyklu reakce pro BRV, vpravo je uvedena kalibrační křivka – závislost hodnot Ct na koncentraci pro BRV



Obrázek 11. Vlevo jsou uvedeny amplifikační křivky – závislost intenzity fluorescence na cyklu reakce pro GVBaV, vpravo je uvedena kalibrační křivka – závislost hodnot Ct na koncentraci pro GVBaV

Pro oba viry byla stanovena analytická senzitivita při koncentraci syntetického standardu 500 kopií/reakce, pro BRV s variačním koeficientem 0,47 % a pro GVBaV 0,68 % (Tabulky 52 a 53).

Tabulka 52. Stanovení analytické senzitivity detekce BRV

Série	Ct hodnoty pro koncentraci 500 kopií/reakce							
S1	28,79	28,66	28,65	28,55	28,85	28,66	28,63	28,74
S2	28,61	28,56	28,82	28,97	28,77	28,65	28,73	28,82
S3	28,77	28,87	28,41	28,81	28,86	28,81	28,59	28,48
Průměr	28,71		Směrodatná odchylka		0,13	Variační koeficient		0,0047

Tabulka 53. Stanovení analytické senzitivity detekce GVBaV

Série	Ct hodnoty pro koncentraci 500 kopií/reakce							
S1	29,63	29,66	29,70	29,46	29,84	29,43	29,80	29,72
S2	29,86	29,86	30,17	29,78	30,16	30,16	29,67	29,68
S3	29,76	29,81	29,35	29,98	29,74	29,83	29,75	29,72
Průměr	29,77		Směrodatná odchylka		0,20	Variační koeficient		0,0068

5.3.1.3 Opakovatelnost

Opakovatelnost metody byla pro viry BRV a GVBaV stanovena při ředění odpovídajícího syntetického standardu 500 kopií na reakci. Pro výpočet průměrného variačního koeficientu, který odráží interní nejistotu měření, byly použity hodnoty Ct pocházející ze tří nezávislých měření. Hodnoty Ct jsou shodné s hodnotami pro stanovení analytické senzitivity a jsou uvedeny v Tabulkách 52 a 53. Analýza byla prováděna jedním pracovníkem, stejnou metodou, za použití stejných reagensů a na stejném přístroji. Pro BRV byla hodnota variačního koeficientu $0,0045 \pm 0,0011$, což odpovídá variabilitě testování jednotlivých běhů 0,45 %. Variační koeficient pro GVBaV byl $0,0057 \pm 0,0009$, s variabilitou testování jednotlivých běhů 0,57 % (Tabulky 54 a 55).

Tabulka 54. Statistické parametry pro stanovení opakovatelnosti detekce BRV

Série	Průměr	SD	VK
S1	28,69	0,09	0,0031
S2	28,74	0,12	0,0043
S3	28,70	0,17	0,0059
Průměrné hodnoty	28,71	0,13	0,0045
		SD VK	0,0011

Tabulka 55. Statistické parametry pro stanovení opakovatelnosti detekce GVBaV

Série	Průměr	SD	VK
S1	29,66	0,14	0,0046
S2	29,92	0,20	0,0067
S3	29,74	0,17	0,0056
Průměrné hodnoty	29,77	0,17	0,0057
		SD VK	0,0009

5.3.1.4 Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost byla stanovena pro oba viry s využitím shodného ředění 500 kopií konkrétního standardu v reakci. Reprodukovatelnost metody byla určena variačním koeficientem, který byl vypočítán ze všech měření v různých PCR bězích, které prováděli tři různí pracovníci, a to s výsledkem pro BRV 1,31 % a pro GVBaV 0,67 %. Na základě výsledků hodnot Ct (Tabulky 56 a 57), u kterých jsme zaznamenali malé odchylky, lze konstatovat, že detekční systém v multiplexním uspořádání pro detekci obou virů je robustní a jeho aplikace do praxe různými pracovníky neovlivňuje výsledky testování.

Tabulka 56. Stanovení reprodukovatelnosti detekce BRV

Běh/Série	Ct hodnoty pro koncentraci 500 kopií/reakce							
I/S1	28,94	28,95	28,98	28,78	29,04	29,24	29,08	28,86
II/S1	28,79	28,66	28,65	28,55	28,85	28,66	28,63	28,74
III/S1	28,66	28,48	28,47	28,38	28,44	28,93	28,89	28,55
I/S2	29,17	29,19	28,66	28,81	29,14	29,11	28,82	29,22
II/S2	28,61	28,56	28,82	28,97	28,77	28,65	28,73	28,82
III/S2	28,50	28,47	28,78	28,74	28,53	28,34	28,57	28,47
I/S3	29,26	29,19	28,73	28,93	28,88	28,77	29,18	29,11
II/S3	29,47	29,82	29,42	29,55	29,76	29,92	29,95	29,65
III/S3	28,44	28,73	28,84	28,57	28,57	28,68	28,55	28,23
Průměr	28,87		Směrodatná odch.		0,38		Variační koeficient 0,0131	

Tabulka 57. Stanovení reprodukovatelnosti detekce GVBaV

Běh/Série	Ct hodnoty pro koncentraci 500 kopií/reakce							
I/S1	29,54	29,74	29,68	29,41	29,64	29,51	29,72	29,68
II/S1	29,63	29,66	29,70	29,46	29,84	29,43	29,80	29,72
III/S1	29,84	29,85	29,85	29,76	29,83	29,84	29,73	29,43
I/S2	29,46	29,94	29,98	29,78	29,38	30,01	29,62	29,84
II/S2	29,86	29,86	30,17	29,78	30,16	30,16	29,67	29,68
III/S2	29,94	30,28	29,59	29,78	29,72	29,81	29,83	29,97
I/S3	29,79	29,93	29,61	29,92	29,83	29,74	30,30	29,68
II/S3	29,76	29,81	29,35	29,98	29,74	29,83	29,75	29,72
III/S3	29,94	29,69	29,94	29,65	29,59	30,20	29,97	29,79
Průměr	29,78		Směrodatná odch.		0,20		Variační koeficient 0,0067	

Popis vývoje systému pro real-time PCR detekci virů BRV a GVBaV, jeho validace a použití jsou uvedeny v certifikované metodice (Valentová et al. 2020). Detekční systém v multiplexním uspořádání byl sestaven do diagnostické soupravy RibesVir (funkční vzorek), která obsahuje všechny reagenty a standardy pro jednoduché použití.

5.3.2 Využití detekčního systému pro diagnostiku virů rybízu

Během řešení projektu zabývajícím se návrhem diagnostického systému pro detekci virů rybízu byl vytvořen soubor 204 vzorků. Souhrnné výsledky testování virů BRV a GVBaV jsou

uvedeny v Tabulkách 58 a 59. Z Tabulky 58, kde jsou výsledky rozděleny podle zdroje materiálu, vyplývá, že polovina všech testovaných rostlin byla pozitivní na BRV. Největší výskyt BRV 84 % byl zaznamenán v produkčních výsadbách, kde naopak byl zaznamenán téměř nejnižší výskyt GVBaV (21 %; nejméně GVBaV bylo nalezeno v materiálu pro výzkumné účely 19 %). Celkově bylo GVBaV infikováno 30 % všech testovaných vzorků. V 17 % všech vzorků listů rybízu byly nalezeny oba viry zároveň, nejvíce koinfekcí pocházelo z neprodukčních výsadeb – soukromých zahrádek. Ve vzorcích, které pocházely z nákupů sadby v obchodních řetězcích a zahradnictvích, byl detekován pouze GVBaV (27 %).

Z Tabulky 59 je patrné, že na černém rybízu se častěji vyskytuje BRV (58 %) oproti GVBaV (7 %). Nález obou virů v červeném rybízu je shodný, oběma viry byla nakažena polovina všech testovaných rostlin červeného rybízu, v koinfekci se viry vyskytovaly ve 27 %. Podobně je tomu u bílého rybízu, kdy bylo zaznamenáno 60% zastoupení obou virů, v koinfekci se vyskytovaly ve 40 %. V případě původní šumavské odrůdy červeného rybízu 'Gabreta' byly vzorky pozitivní pouze na GVBaV (20 %).

Tabulka 58. Souhrnné výsledky testování virů BRV a GVBaV v závislosti na zdroji materiálu

Zdroj materiálu	Počet vzorků	Počet lokalit	Pozitivní BRV		Pozitivní GVBaV		Koinfekce BRV a GVBaV	
			počet	%	počet	%	počet	%
Produkční výsadby	38	4	32	84	8	21	6	16
Soukromé zahrádky	31	9	12	39	16	52	8	26
Výzkumné účely	31	1	15	48	6	19	5	16
Nakoupená sadba	30	14	0	0	8	27	0	0
Genofondy	74	1	44	59	24	32	15	20
Celkem	204	29	103	50	62	30	34	17

Tabulka 59. Výsledky testování virů BRV a GVBaV v závislosti na druhu rybízu

Druh rybízu	Počet vzorků	Pozitivní BRV		Pozitivní GVBaV		Koinfekce BRV a GVBaV	
		počet	%	počet	%	počet	%
Černý rybíz	86	50	58	6	7	4	5
Červený rybíz	88	44	50	44	50	24	27
Bílý rybíz	15	9	60	9	60	6	40
Gabreta	15	0	0	3	20	0	0
Celkem	204	103	50	62	30	34	17

V rámci zjišťování genetické variability virů v České republice byly pozitivní vzorky (získané metodou end-point PCR) sekvenovány pomocí Sangerova sekvenování a bylo získáno

celkem 84 sekvencí BRV a 81 GVBaV. Podrobnější výsledky jsou uvedeny v publikaci „Genetická variabilita virů rybízu blackcurrant reversion virus (BRV) a gooseberry vein banding associated virus (GVBaV) v České republice“ (Podlipný et al. 2021).

6 Závěry a využití poznatků v praxi

Jednotlivé body jsou uspořádány podle diagnostických systémů, které byly navrženy pro konkrétní skupiny virů.

6.1 Návrh a validace detekčního systému na principu real-time PCR v multiplexním uspořádání pro viry maloplodosti třešně LChV-1 a LChV-2 v rostlinném materiálu.

Pro viry maloplodosti třešně LChV-1 a LChV-2 byl navržen a validován detekční systém v multiplexním uspořádání, který v současné době dle certifikované metodiky „Real-time PCR detekce virů Little cherry virus 1 (LChV-1) a Little cherry virus 2 (LChV-2) v biologickém materiálu“ (Čmejla & Valentová 2018a) využívá pro kontrolu zdravotního stavu rostlin laboratoř Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (Odbor diagnostiky škodlivých organismů rostlin).

Detekční systém byl v roce 2021 použit pro testování virů maloplodosti třešně v rámci společné studie s ÚKZÚZ, která byla podpořena prostředky z Národního akčního plánu a byla zaměřena na rozsah výskytu, na epidemiologii a na riziko šíření virů LChV-1 a LChV-2 na území našeho státu a jejich zavlékání do ČR.

Navržený systém primerů a sond je chráněn patentem č. CZ 308 827 „Sada pro detekci virů LChV-1 a LChV-2 v biologickém materiálu“ (Čmejla et al. 2021) a užitným vzorem č. CZ 32 045 (Čmejla & Valentová 2018b).

6.2 Vývoj a validace detekčního systému na principu real-time PCR v multiplexním uspořádání pro viry jahodníku SMYEV, SCV, SVBV, SMoV, SPV-1, StrV-1 a OLV-1 v rostlinném materiálu.

Detekce vybraných virů jahodníku SMYEV, SCV, SVBV, SMoV, SPV-1, StrV-1 a OLV-1 byla rozdělena do dvou diagnostických systémů v multiplexním uspořádání, detekční systém StrawVir I, který detekuje v jedné reakci viry SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 a StrawVir II detekující viry StrV-1 a OLV-1. Oba systémy byly úspěšně validovány a implementovány v laboratoři Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského

(Odbor diagnostiky škodlivých organismů rostlin). Laboratoř ÚKZÚZ má k dispozici pro každý detekční systém diagnostickou soupravu (funkční vzorek), která obsahuje v základním balení reagentie pro provedení 100 testů o reakčním objemu 20 µl.

Vlastní postup diagnostiky virů včetně výsledků validace detekčního systému StrawVir I je uveden v certifikované metodice „Real-time PCR detekce virů Strawberry mild yellow edge virus (SMYEV), Strawberry crinkle virus (SCV), Strawberry vein banding virus (SVBV), Strawberry mottle virus (SMoV) a Strawberry polerovirus-1 (SPV-1) v biologickém materiálu“ (Čmejla & Valentová 2020) a sekvence primerů a sond jsou chráněny užitným vzorem č. CZ 32 879 „Sada pro detekci virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 v biologickém materiálu“ (Čmejla & Valentová 2019).

Diagnostické soupravy StrawVir I a II byly také využity pro testování rostlin a sledování přítomnosti viru StrV-1 v jahodnicích během hodnocení hospodářské škodlivosti StrV-1, výsledky jsou uvedeny v publikacích „Symptomless infection by strawberry virus 1 (StrV-1) leads to losses in strawberry yields“ (Valentová et al. 2022) a v „Strawberry virus 1 (StrV-1) - výskyt a hospodářská škodlivost nového viru jahodníku v České republice“ (Valentová et al. 2021b).

Validace detekčního systému pro OLV-1 provedená kitem StrawVir II je popsána v publikaci „Vývoj a validace diagnostického real-time PCR systému pro detekci olive latent viru 1 (OLV-1) v rostlinách jahodníku“ (Valentová et al. 2021a). Obě soupravy našly uplatnění pro testování zdravotního stavu nakoupené sadby jahodníku v zahradnictvích a obchodních řetězcích. Výsledky jsou shrnuty v publikaci „Výskyt virů v sazenicích jahodníku zakoupených v České republice“ (Valentová et al. 2019).

Oba detekční systémy byly dále použity při identifikaci a charakterizaci nově nalezeného viru Strawberry Virus A (Koloniuk et al. 2022), při monitoringu a studiu biologických vlastností a vektorů SPV-1 (Fránová et al. 2021) a dále jsou využívány norskými kolegy při řešení společného mezinárodního projektu TAČR č. TO01000295: Healthy berries in a changing climate: development of new biotechnological procedures for virus diagnostics, vector studies, elimination and safe preservation of strawberry and raspberry.

6.3 Vývoj a validace detekčního systému na principu real-time PCR v multiplexním uspořádání pro viry rybízu BRV a GVBaV v rostlinném materiálu.

Byl navržen detekční systém v multiplexním uspořádání pro BRV a GVBaV, který používají v laboratoři Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (Odbor diagnostiky škodlivých organismů rostlin) např. ke kontrole zdravotního stavu rozmnožovacího materiálu rybízu nebo angreštu podle certifikované metodiky „Real-time PCR detekce virů Blackcurrant reversion virus (BRV) a Gooseberry vein banding associated virus (GVBaV) v biologickém materiálu“ (Valentová 2020).

Detekční systém může být dodán ve formě funkčního vzorku: RibesVir qPCR-RG detekční kit – diagnostická souprava pro současnou real-time PCR detekci virů BRV a GVBaV v biologickém materiálu. Funkční vzorek v základním balení představuje reagentie, které jsou ve zkumavkách uloženy v papírové krabičce a lze s nimi provést 100 testů o reakčním objemu 20 µl.

Pomocí detekčního kitu byla testována genetická variabilita virů BRV a GVBaV (Podlipný et al. 2021) a na území České republiky byl proveden monitoring virů rybízu.

7 Publikace a ostatní výstupy

Souhrn publikací a výstupů, které jsou podkladem pro disertační práci.

7.1 Impaktované publikace

Valentova L, Rejlova M, Franova J, Cmejla R. 2022. Symptomless infection by strawberry virus 1 (StrV-1) leads to losses in strawberry yields. *Plant Pathology* **71**:1220–1228. IF 3,132

Koloniuk I, Příbylová J, Čmejla R, **Valentová L**, Fránová J. 2022. Identification and Characterization of a Novel Umbra-like Virus, Strawberry Virus A, Infecting Strawberry Plants. *Plants* **11**:643. IF 4,827

Fránová J, Lenz O, Příbylová J, Čmejla R, **Valentová L**, Koloniuk I. 2021. High Incidence of Strawberry Polerovirus 1 in the Czech Republic and Its Vectors, Genetic Variability and Recombination. *Viruses* **13**:2487. IF 5,811

7.2 Metodiky

Čmejla R, **Valentová L.** 2018. Real-time PCR detekce virů Little cherry virus 1 (LChV-1) a Little cherry virus 2 (LChV-2) v biologickém materiálu. Certifikovaná metodika. Holovousy: VŠÚO. ISBN 978-80-87030-57-8.

Čmejla R, **Valentová L.** 2020. Real-time PCR detekce virů Strawberry mild yellow edge virus (SMYEV), Strawberry crinkle virus (SCV), Strawberry vein banding virus (SVBV), Strawberry mottle virus (SMoV) a Strawberry polerovirus-1 (SPV-1) v biologickém materiálu. Certifikovaná metodika. Holovousy: VŠÚO. ISBN 978-80-87030-75-2.

Valentová L, Čmejla R. 2020. Real-time PCR detekce virů Blackcurrant reversion virus (BRV) a Gooseberry vein banding associated virus (GVBaV) v biologickém materiálu. Certifikovaná metodika. Holovousy: VŠÚO. ISBN 978-80-87030-74-5.

7.3 Průmyslově chráněné výstupy

7.3.1 Patent

Čmejla R, **Valentová L,** Bohunická M, Suchá J. 2021. Sada pro detekci virů LChV-1 a LChV-2 v biologickém materiálu. Úřad průmyslového vlastnictví ČR, Česká republika. CZ 308827 B6.

7.3.2 Užité vzor

Čmejla R, **Valentová L.** 2019. Sada pro detekci virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 v biologickém materiálu. Úřad průmyslového vlastnictví ČR, Česká republika. CZ 32879 U1

Čmejla R, **Valentová L,** Bohunická M, Suchá J. 2018. Sada pro detekci virů LChV-1 a LChV-2 v biologickém materiálu. Úřad průmyslového vlastnictví ČR, Česká republika. CZ 32045 U1

7.4 Funkční vzorek

Valentová L, Čmejla R. 2020. StrawVir I qPCR-RG detekční kit – diagnostická souprava pro současnou real-time PCR detekci virů jahodníku SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 v biologickém materiálu. Funkční vzorek. Holovousy: VŠÚO.

Čmejla R, **Valentová L.** 2021. StrawVir II qPCR-RG detekční kit – diagnostická souprava pro současnou real-time PCR detekci virů jahodníku StrV-1 a OLV-1 v biologickém materiálu. Funkční vzorek. Holovousy: VŠÚO.

Valentová L, Rejlová M, Podlipný J, Čmejla R. 2020. RibesVir qPCR-RG detekční kit – diagnostická souprava pro současnou real-time PCR detekci virů BRV a GVBaV v biologickém materiálu. Funkční vzorek. Holovousy: VŠÚO.

7.5 Ostatní publikace

Valentová L, Rejlová M, Čmejla, R. 2021. Vývoj a validace diagnostického real-time PCR systému pro detekci olive latent viru 1 (OLV-1) v rostlinách jahodníku. Vědecké práce ovocnářské, 27: 1-13.

Valentová L, Rejlová M, Fránová J, Čmejla, R. 2021. Strawberry virus 1 (StrV-1) - výskyt a hospodářská škodlivost nového viru jahodníku v České republice. Zahradnictví, 20: 46-49.

Podlipný J, **Valentová L, Rejlová M, Čmejla, R.** 2021. Genetická variabilita virů rybízu blackcurrant reversion virus (BRV) a gooseberry vein banding associated virus (GVBaV) v České republice. Vědecké práce ovocnářské, 27: 14-24.

Valentová L, Rejlová M, Čmejla, R. 2019. Výskyt virů v sazenicích jahodníku zakoupených v České republice. Vědecké práce ovocnářské, 26: 189-199.

8 Finanční podpora

Disertační práce byla vypracována v rámci řešení projektů:

- **TJ02000159** Vývoj a validace souprav pro diagnostiku vybraných rostlinných virů
Projekt byl financován Technologickou agenturou ČR (TAČR).

Role v projektu: hlavní řešitel

Anotace: Cílem projektu bylo navrhnout a validovat diagnostickou soupravu na principu real-time PCR v multiplexním uspořádání pro detekci virů rybízu BRV a GVBaV. Souprava byla využita pro monitoring virů a zmapování genetické variability virů BRV a GVBaV na území České republiky. Na základě výsledných parametrů detekčního systému na principu real-time PCR (specifická, senzitivita, opakovatelnost a reprodukovatelnost) byly diagnostické soupravy validovány pro laboratoře ÚKZÚZ.

- **QK1920245** Výzkum rozšíření, biologických vlastností a škodlivosti virů identifikovaných v rostlinách jahodníku pomocí nejnovějších diagnostických metod (NGS, PCR) jako podklad pro přípravu legislativy

Projekt byl financován Národní agenturou pro zemědělský výzkum MZe ČR (NAZV)

Role v projektu: spoluřešitel

Anotace: Byl prováděn návrh a validace nového diagnostického systému na principu real-time PCR v multiplexním uspořádání pro detekci virů jahodníku SMYEV, SCV, SVBV, SMoV, SPV-1, StrV-1 a OLV-1. V rámci řešení projektu byl navrženým detekčním systémem proveden monitoring jednotlivých virů.

- **TO01000295** Healthy berries in a changing climate: development of new biotechnological procedures for virus diagnostics, vector studies, elimination and safe preservation of strawberry and raspberry

Mezinárodní projekt financovaný Technologickou agenturou ČR (TAČR).

Role v projektu: spoluřešitel

Diagnostický systém StrawVir I byl validován na pracovišti v Norsku. Následně byl detekční kit použit pro zmapování výskytu virů jahodníku na území Norska.

- **Studie** Výskyt, epidemiologie a riziko šíření virů LChV-1 a LChV-2 v podmínkách ČR a jeho zavlečení do ČR.

Studie byla financována MZe z Národního akčního plánu pro bezpečné používání pesticidů

Role v projektu: spoluřešitel

Anotace: Předmětem studie bylo provést analýzy vzorků třešní laboratorní metodou, která probíhala dle certifikované a plně validované metodiky. Na základě zjištěných výsledků přítomnosti virů LChV-1 a LChV-2 ve vzorcích byla navržena doporučení pro státní správu a pro pěstitelskou veřejnost.

9 Seznam použitých zkratek

Zkratka	Anglický název	Český název
ArMV	Arabis mosaic virus	Arabis mosaic virus
BBCH	Biologische Bundesanstalt, Bundessorenamt and Chemical industry	Biologische Bundesanstalt, Bundessorenamt and Chemical industry
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	Basic Local Alignment Search Tool
bp	pair of bases	pár bází
BRV	blackcurrant reversion virus	virus zvratu rybízu
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CP	coat protein	bílkovinný obal
Ct	cycle of threshold	cyklus prahu
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxyribonucleotide triphosphate	deoxyribonukleotid trifosfát
dsDNA	double-stranded deoxyribonucleic acid	dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina
dsRNA	double-stranded ribonucleic acid	dvouvláknová ribonukleová kyselina
DTT	dithiothreitol	dithiothreitol
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	imunoenzymatická testovací metoda
EMK	East Malling clone	East Malling klon
EPPO	European plant protection organization	Evropská organizace pro ochranu rostlin
FRET	Förster resonance energy transfer	Försterův rezonanční energetický přenos
GVBaV	gooseberry vein banding associated virus	virus světlezeleného lemování žilek
HTS	High-Throughput Sequencing	masivní paralelní sekvenování
IC-RT-PCR	Immuno-capture RT- PCR	Immuno-capture RT- PCR
IgG	immunoglobulin G	imunoglobulín G
IPC	internal positive controls	interní kontrola kvality
kbp	pair of 1 000 bases	tisíc párů bází
kDa	kiloDalton	kiloDalton
LChD	Little Cherry Disease	onemocnění maloplodost třešně
LChV-1	little cherry virus 1	virus maloplodosti třešně 1
LChV-2	little cherry virus 2	virus maloplodosti třešně 2
M-MLV RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase	M-MLV reverzní transkriptáza
MP	movement protein	movement bílkovina
nt	nucleotide	nukleotid
NTC	no template control	netemplátovaná kontrola
OLV-1	olive latent virus 1	olive latent virus 1
ORF	open reading frame	otevřený čtecí rámec
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
qPCR	quantitative PCR	kvantitativní PCR
RdRp	RNA dependent RNA polymerase	RNA dependentní RNA polymeráza
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
RPM	rounds per minute	otáčky za minutu
RpRSV	raspberry ringspot virus	raspberry ringspot virus

Zkratka	Anglický název	Český název
RT	reverse transcription	reverzní transkripce
RT-LAMP	RT - loop-mediated isothermal amplification	RT - loop-mediated isothermal amplification
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction	reverzní transkripce - polymerázová řetězová reakce
RT-RPA	reverse transcription-recombinase polymerase amplification	reverzní transkripce - rekombinázová polymerázová amplifikace
SaV1	strawberry-associated virus 1	strawberry-associated virus 1
SCV	strawberry crinkle virus	virus kadeřavosti jahodníku
SD	strawberry decline	chřadnutí jahodníku
SD	standard deviation	směrodatná odchylka
SLRSV	strawberry latent ringspot virus	virus latentní kroužkovitosti jahodníku
SMoV	strawberry mottle virus	virus strakatosti jahodníku
SMYEV	strawberry mild yellow edge virus	virus okrajového žloutnutí listů jahodníku
SPV-1	strawberry polerovirus-1	strawberry polerovirus-1
ssRNA	Single-strand ribonucleic acid	jednovláknová ribonukleová kyselina
StrV-1	strawberry virus 1	strawberry virus 1
StrVA	strawberry virus A	strawberry virus A
SVBV	strawberry vein banding virus	virus lemování žilek jahodníku
Taq	DNA <i>polymerase</i> from <i>Thermus aquaticus</i>	DNA polymeráza z <i>Thermus aquaticus</i>
TBRV	tomato black ring virus	tomato black ring virus
TEM	transmission electron microscopy	transmisní elektronová mikroskopie
TGB	triple gene block	triple gene block
ÚKZÚZ	Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
UTR	untranslated region	nepřekládaná oblast
VK	coefficient of variation	variační koeficient

10 Seznam použité literatury

- Al Rwahnih M, Daubert S, Golino D, Islas C, Rowhani A. 2015. Comparison of Next-Generation Sequencing Versus Biological Indexing for the Optimal Detection of Viral Pathogens in Grapevine. *Phytopathology* **105**:758–763.
- Arous S, Harmon CL, Capobianco HM, Polston JE. 2018. Comparison of genus-specific primers in RT-PCR for the broad-spectrum detection of viruses in the genus Potyvirus by plant diagnostic laboratories. *Journal of Virological Methods* **258**:29–34.
- Babini AR, Cieslińska M, Karešová, R, Thompson JR, Cardoni M. 2004. Occurrence and identification of strawberry viruses in five european countries. *Acta Horticulturae* **656**:39-43.
- Barba M, Ilardi V, Pasquini G. 2015. Control of pome and stone fruit virus diseases. *Advances in Virus Research*. Elsevier **91**: 47–83.
- Bariana HS, Shannon AL, Chu PWG, Waterhouse PM. 1994. Detection of five seedborne legume viruses in one sensitive multiplex polymerase chain reaction test. *Phytopathology* **84**:1201–1205.
- Bertozzi T, Alberts E, Sedgley M. 2002. Detection of Prunus necrotic ringspot virus in almond: effect of sampling time on the efficiency of serological and biological indexing methodologies. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **42**:207–210.
- Besse S, Gugerli P, Ramel ME, Balmelli C. 2010. Characterisation of mixed virus infections in Ribes species in Switzerland. 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops **427**:214–219.
- Bhagwat B, Dickison V, Ding X, Walker M, Bernardy M, Bouthillier M, Wang A. 2016. Genome sequence analysis of five Canadian isolates of strawberry mottle virus reveals extensive intra-species diversity and a longer RNA2 with increased coding capacity compared to a previously characterized European isolate. *Archives of Virology* **161**:1657–1663.
- Boonham N, Kreuze J, Winter S, van der Vlugt R, Bergervoet J, Tomlinson J, Mumford R. 2014. Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing. *Virus Research* **186**:20–31.
- Borodynko N, Hasiów-Jaroszewska B, Pospieszny H. 2010. Identification and Characterization of an Olive Latent Virus 1 Isolate from a New Host: Solanum Lycopersicum. *Journal of Plant Pathology* **92**:789–792.

- Candresse T, Marais A, Faure C, Gentil P. 2013. Association of Little cherry virus 1 (LChV1) with the Shirofugen Stunt Disease and Characterization of the Genome of a Divergent LChV1 Isolate. *Phytopathology* **103**:293–298.
- Cieślińska M, Morgaś H. 2010. Occurrence and detection of lesser known viruses and phytoplasmas in stone fruit orchards in Poland. *Folia Horticulturae* **22**:51–57.
- Cieślińska M. 2019. Genetic Diversity of Seven Strawberry mottle virus Isolates in Poland. *The Plant Pathology Journal* **35**:389–392.
- Clegg RM. 1995. Fluorescence resonance energy transfer. *Current Opinion in Biotechnology* **6**:103–110.
- Constable FE, Bottcher C, Kelly G, Nancarrow N, Milinkovic M, Persely DM, Rodoni BC. 2010. The seasonal detection of strawberry viruses in Victoria, Australia. *Julius-Kühn-Archiv* **427**:27–34.
- Constable FE, Connellan J, Nicholas P, Rodoni BC. 2013. The reliability of woody indexing for detection of grapevine virus-associated diseases in three different climatic conditions in Australia. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **19**:74–80.
- Converse, R. 1987. *Virus Diseases of Small Fruits* (No. 631). US Department of Agriculture, Agricultural Research Service.
- Cubero J, Ayllón MA, Gell I, Melgarejo P, De Cal A, Martín-Sánchez PM, Soria C, Segundo E, Larena I. 2009. Detection of strawberry pathogens by real-time PCR. *Acta Horticulturae* **842**: 263–266.
- Čmejla R, Valentová L, Bohunická M, Suchá J. 2018b. Sada pro detekci virů LChV-1 a LChV-2 v biologickém materiálu. Úřad průmyslového vlastnictví ČR, Česká republika. CZ 32045 U1.
- Čmejla R, Valentová L, Bohunická M, Suchá J. 2021. Sada pro detekci virů LChV-1 a LChV-2 v biologickém materiálu. Úřad průmyslového vlastnictví ČR, Česká republika. CZ 308827 B6.
- Čmejla R, Valentová L. 2018a. Real-time PCR detekce virů Little cherry virus 1 (LChV-1) a Little cherry virus 2 (LChV-2) v biologickém materiálu. Certifikovaná metodika. VŠÚO, Holovousy.
- Čmejla R, Valentová L. 2019. Sada pro detekci virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 v biologickém materiálu. Úřad průmyslového vlastnictví ČR, Česká republika. CZ 32879 U1.
- Čmejla R, Valentová L. 2020. Real-time PCR detekce virů Strawberry mild yellow edge virus (SMYEV), Strawberry crinkle virus (SCV), Strawberry vein banding virus (SVBV),

- Strawberry mottle virus (SMoV) a Strawberry polerovirus-1 (SPV-1) v biologickém materiálu. Certifikovaná metodika. VŠÚO, Holovousy.
- ČSN EN ISO/IEC 17025. 2018. Všeobecné požadavky na kompetenci zkušebních a kalibračních laboratoří. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha.
- Dara SK. 2015. Virus Decline of Strawberry in California and the Role of Insect Vectors and Associated Viruses. *Plant Health Progress* **16**:211–215.
- Diaz-Lara A, Stevens K, Klaassen V, Golino D, Al Rwahnih M. 2020. Comprehensive Real-Time RT-PCR Assays for the Detection of Fifteen Viruses Infecting *Prunus* spp. *Plants* **9**:273.
- Diaz-Lara A, Stevens KA, Klaassen V, Hwang MS, Al Rwahnih M. 2021. Sequencing a Strawberry Germplasm Collection Reveals New Viral Genetic Diversity and the Basis for New RT-qPCR Assays. *Viruses* **13**:1442.
- Dickison V, MacKenzie TDB, Singh M, Lawrence J, Nie X. 2017. Strawberry vein banding virus isolates in eastern Canada are molecularly divergent from other isolates. *Archives of Virology* **162**:1777–1781.
- Ding X, Chen D, Du Z, Zhang J, Wu Z. 2019. The complete genome sequence of a novel cytorhabdovirus identified in strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.). *Archives of Virology* **164**:3127–3131.
- Dorak, M. Tevfik. Real-time PCR. 2006. New York: Taylor & Francis Group.
- Eastwell KC, Bernardy MG. 2001. Partial Characterization of a Closterovirus Associated with Apple Mealybug-Transmitted Little Cherry Disease in North America. *Phytopathology* **91**:268–273.
- EPPO. 2021a. PM 7/84 (3) Basic requirements for quality management in plant pest diagnostic laboratories. *EPPO Bulletin* **51**:457–467.
- EPPO. 2021b. PM 7/98 (5) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. *EPPO Bulletin* **51**:468–498.
- Fegla G, Kawanna M. 2013. Improved indirect ELISA for detection of some plant viruses. *International Journal of Agriculture and Biology* **15**:939–944.
- Félix MR, Cardoso JMS, Oliveira S, Clara MIE. 2007. Biological and Molecular Characterization of Olive latent virus 1. *Plant Viruses* **1**:170-177.
- Fránová J, Lenz O, Příbylová J, Čmejla R, Valentová L, Koloniuk I. 2021. High Incidence of Strawberry Polerovirus 1 in the Czech Republic and Its Vectors, Genetic Variability and Recombination. *Viruses* **13**:2487

- Fránová J, Příbylová J, Koloniuk I. 2019. Molecular and Biological Characterization of a New Strawberry Cytorhabdovirus. *Viruses* **11**:982.
- Gallitelli D, Savino V. 1985. Olive latent virus-1, an isometric virus with a single RNA species isolated from olive in Apulia, Southern Italy. *Annals of Applied Biology* **106**:295–303.
- Glása M, Benediková D, Predajňa L. 2015. First report of little cherry virus-1 in Slovakia. *Journal of Plant Pathology* **97**:542.
- He C, Gao D, Fan L, Xu T, Xing F, Li S, Wang H. 2021. The Occurrence of Strawberry Virus 1 Infecting Strawberry in Shandong Province, China. *Plant Disease* **105**:3314.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**:7276–7280.
- Hull R. 2002. Chapter 6 - Genome Organization. Pages 171–224 in Hull R, editor. *Matthews' Plant Virology (Fourth Edition)*. Academic Press, London. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123611604500578>.
- Chang L, Zhang Z, Yang H, Li H, Dai H. 2007. Detection of Strawberry RNA and DNA Viruses by RT-PCR Using Total Nucleic Acid as a Template. *Journal of Phytopathology* **155**:431–436.
- Chen J, Zhang H, Feng M, Zuo D, Hu Y, Jiang T. 2016. Transcriptome analysis of woodland strawberry (*Fragaria vesca*) response to the infection by Strawberry vein banding virus (SVBV). *Virology Journal* **13**:128.
- Isogai M, Aoyagi J, Nakagawa M, Kubodera Y, Satoh K, Katoh T, Inamori M, Yamashita K, Yoshikawa N. 2004. Molecular detection of five cherry viruses from sweet cherry [*Prunus avium*] trees in Japan. *Journal of General Plant Pathology* **70**:288-291.
- Jelkmann W, Fechtner B, Agranovsky AA. 1997. Complete genome structure and phylogenetic analysis of little cherry virus, a mealybug-transmissible closterovirus. *The Journal of General Virology* **78**:2067–2071.
- Jelkmann W, Leible S, Rott M. 2008. Little Cherry Closteroviruses-1 and -2, their genetic variability and detection by real-time-PCR. *Acta Horticulturae* **781**:321–330.
- Jelkmann W, Martin RR, Lesemann DE, Vetten HJ, Skelton F. 1990. A new potexvirus associated with strawberry mild yellow edge disease. *The Journal of General Virology* **71**:1251–1258.
- Jeong JJ, Ju HJ, Noh J. 2014. A Review of Detection Methods for the Plant Viruses. *Research in Plant Disease* **20**:173–181.

- Jones AT, McGavin WJ, Geering ADW, Lockhart BEL. 2001. A new Badnavirus in ribes species, its detection by PCR, and its close association with Gooseberry Vein Banding Disease. *Plant Disease* **85**:417–422.
- Jones AT, McGavin WJ. 2002. Improved PCR Detection of Blackcurrant reversion virus in Ribes and Further Evidence that It Is the Causal Agent of Reversion Disease. *Plant Disease* **86**:1333–1338.
- Jones AT. 2000. Black currant reversion disease--the probable causal agent, eriophyid mite vectors, epidemiology and prospects for control. *Virus Research* **71**:71–84.
- Kanematsu S, Taga Y, Morikawa T. 2001. Isolation of Olive latent virus 1 from Tulip in Toyama Prefecture. *Journal of General Plant Pathology* **67**:333–334.
- Katsiani AT, Maliogka VI, Amoutzias GD, Efthimiou KE, Katis NI. 2015. Insights into the genetic diversity and evolution of Little cherry virus 1. *Plant Pathology* **64**:817–824.
- Katsiani AT, Pappi P, Olmos A, Efthimiou KE, Maliogka VI, Katis NI. 2018. Development of a Real-Time RT-PCR for the Universal Detection of LChV1 and Study of the Seasonal Fluctuation of the Viral Titer in Sweet Cherry Cultivars. *Plant Disease* **102**:899–904.
- Keim-Konrad R, Jelkmann W. 1996. Genome analysis of the 3'-terminal part of the little cherry disease associated dsRNA reveals a monopartite clostero-like virus. *Archives of Virology* **141**:1437–1451.
- Kfir R, Genthe B. 1993. Advantages and Disadvantages of the Use of Immunodetection Techniques for the Enumeration of Microorganisms and Toxins in Water. *Water Science and Technology* **27**:243–252.
- King AM, Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens EB. 2011. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Vol. 9). Elsevier.
- Koloniuk I, Fránová J, Sarkisova T, Příbylová J. 2018. Complete genome sequences of two divergent isolates of strawberry crinkle virus coinfecting a single strawberry plant. *Archives of Virology* **163**:2539–2542.
- Koloniuk I, Příbylová J, Čmejla R, Valentová L, Fránová J. 2022. Identification and Characterization of a Novel Umbra-like Virus, Strawberry Virus A, Infecting Strawberry Plants. *Plants* **11**:643.
- Lamprecht S, Jelkmann W. 1997. Infectious cDNA clone used to identify strawberry mild yellow edge-associated potexvirus as causal agent of the disease. *The Journal of General Virology* **78**:2347–2353.
- Latvala S, Susi P, Kalkkinen N, Lehto K. 1998. Characterization of the coat protein gene of mite-transmitted blackcurrant reversion associated nepovirus. *Virus Research* **53**:1–11.

- Latvala S, Susi P, Lemmetty A, Cox S, Jones AT, Lehto K. 1997. Ribes host range and erratic distribution within plants of blackcurrant reversion associated virus provide further evidence for its role as the causal agent of reversion disease. *Annals of Applied Biology* **131**:283–295.
- Lehto K, Lemmetty A, Keränen M. 2004. The long 3' non-translated regions of Blackcurrant reversion virus RNAs are highly conserved between virus isolates representing different phenotypes and geographic origins. *Archives of Virology* **149**:1867–1875.
- Lemmetty A, Latvala S, Jones AT, Susi P, McGavin WJ, Lehto K. 1997. Purification and properties of a new virus from black currant, its affinities with nepoviruses, and its close association with black currant reversion disease. *Phytopathology* **87**:404–413.
- Lim S, Igori D, Yoo RH, Zhao F, Cho I-S, Choi G-S, Lim H-S, Lee S-H, Moon JS. 2015. Genomic detection and characterization of a Korean isolate of Little cherry virus 1 sampled from a peach tree. *Virus Genes* **51**:260–266.
- Lima JAA, Nascimento AKQ, Radaelli P, Purcifull DE, Lima JAA, Nascimento AKQ, Radaelli P, Purcifull DE. 2012. Serology Applied to Plant Virology. Serological Diagnosis of Certain Human, Animal and Plant Diseases. IntechOpen 71-94.
- López MM, Llop P, Olmos A, Marco-Noales E, Cambra M, Bertolini E. 2009. Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? *Current Issues in Molecular Biology* **11**:13–46.
- Luciani C, Celli MG, Merino MC, Perotto MC, Pozzi E, Conci VC. 2016. First Report of Strawberry polerovirus 1 in Argentina. *Plant Disease* **100**:1510–1510.
- Luciani C, Celli MG., Torrico A K., Asinari F, Pozzi E, Peña Malavera A, Kirschbaum DS, Perotto MC, Conci VC. 2018. Incidence and prevalence of aphid-borne viruses infecting strawberry in Argentina. *Annals of Applied Biology* **173**:80–91.
- Maas, J. L. 1998. Compendium of strawberry diseases (Vol. 98). APS Press. St. Paul, USA.
- Makkouk K, Kumari S. 2006. Molecular Diagnosis of Plant Viruses. *Arab Journal of Plant Protection* **24**:135–138.
- Marinho VLA, Kummert J, Rufflard G, Colinet D, Lepoivre P. 1998. Detection of Apple Stem Grooving Virus in Dormant Apple Trees with Crude Extracts as Templates for One-Step RT-PCR. *Plant Disease* **82**:785–790.
- Martelli GP, Yilmaz MA, Savino V, Baloglu S, Grieco F, Güldür ME, Greco N, Laforteza R. 1996. Properties of a citrus isolate of olive latent virus 1, a new necrovirus. *European Journal of Plant Pathology* **102**:527–536.

- Martin RR, Tzanetakis I. 2013. High Risk Strawberry Viruses by Region in the United States and Canada: Implications for Certification, Nurseries, and Fruit Production. *Plant Disease* **97**:1358–1362.
- Martin RR, Tzanetakis IE. 2006. Characterization and Recent Advances in Detection of Strawberry Viruses. *Plant Disease* **90**:384–396.
- Matic S, Minafra A, Boscia D, da Cunha ATP, Martelli GP. 2009a. Production of antibodies to Little cherry virus 1 coat protein by DNA prime and protein boost immunization. *Journal of Virological Methods* **155**:72–76.
- Matic S, Minafra A, Sánchez-Navarro JA, Pallás V, Myrta A, Martelli GP. 2009b. “Kwanzan Stunting” syndrome: detection and molecular characterization of an Italian isolate of Little cherry virus 1. *Virus Research* **143**:61–67.
- Mažeikienė I, Juškytė AD, Stanys V. 2019. Application of marker-assisted selection for resistance to gall mite and Blackcurrant reversion virus in *Ribes* genus. *Zemdirbyste-Agriculture* **106**: 59-366.
- Mekuria TA, Smith TJ, Beers E, Watson GW, Eastwell KC. 2013. First Report of Transmission of Little cherry virus 2 to Sweet Cherry by *Pseudococcus maritimus* (Ehrhorn) (Hemiptera: Pseudococcidae). *Plant Disease* **97**:851.
- Mekuria TA, Zhang S, Eastwell KC. 2014. Rapid and sensitive detection of Little cherry virus 2 using isothermal reverse transcription-recombinase polymerase amplification. *Journal of Virological Methods* **205**:24–30.
- Mulhardt C. 2010. *Molecular Biology and Genomics*. Elsevier.
- Mumford R A, Walsh K, Barker I, Boonham N. 2000. Detection of Potato mop top virus and Tobacco rattle virus using a multiplex real-time fluorescent reverse-transcription polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* **90**:448-453.
- Mumford RA, Skelton AL, Boonham N, Posthuma KI, Kirby MJ, Adams AN. 2004. The improved detection of strawberry crinkle virus using real-time RT-PCR (TaqMan®). *Acta Horticulturae* **656**:81–86.
- Němcová V, Buchtová I. 2021. *Situační a výhledová zpráva Ovoce*. Ministerstvo zemědělství, Praha.
- Noorani MS, Awasthi P, Sharma MP, Ram R, Zaidi AA, Hallan V. 2013. Simultaneous detection and identification of four cherry viruses by two step multiplex RT-PCR with an internal control of plant nad5 mRNA. *Journal of Virological Methods* **193**:103–107.
- Osman F, Al Rwahnih M, Golino D, Pitman T, Cordero F, Preece J, Rowhani A. 2012. Evaluation of the phytosanitary status of the *Prunus* species in the National Clonal

- Germplasm Repository in California: Survey of viruses and viroids. *Journal Of Plant Pathology* **94**:249–253.
- Park CY, Park J, Lee G, Yi S-I, Kim BH, Eom JS, Lee SG, Kim H. 2018. Development of a Multiplex RT-PCR for the Simultaneous Detection of Three Viruses in Cherry Plants. *Research in Plant Disease* **24**:233–236.
- Petrzik K, Beneš V, Mráz I, Honetšlegrová-Fránová J, Ansorge W, Špak J. 1998. Strawberry vein banding virus--definitive member of the genus Caulimovirus. *Virus Genes* **16**:303-305.
- Petrzik K, Příbylová J, Špak J. 2012. Molecular analysis of Gooseberry vein banding associated virus. *Acta Virologica* **56**:119–24.
- Podlipný J, Valentová L, Rejlová M, Čmejla, R. 2021. Genetická variabilita virů rybízu blackcurrant reversion virus (BRV) a gooseberry vein banding associated virus (GVBAV) v České republice. *Vědecké práce ovocnářské* **27**:14-24.
- Popp J, Bauer M. 2015. *Modern Techniques for Pathogen Detection*. John Wiley & Sons.
- Posthuma KI, Adams AN, Hong Y. 2000. Strawberry crinkle virus, a Cytorhabdovirus needing more attention from virologists. *Molecular Plant Pathology* **1**:331–336.
- Příbylová J, Špak J, Kubelková D. 2002. Mixed infection of black currant (*Ribes nigrum* L.) plants with Blackcurrant reversion associated virus and rhabdovirus-like particles with symptoms of black currant reversion disease. *Acta Virologica* **46**:253–256.
- Příbylová J, Špak J, Petrzik K, Kubelková D, Špaková V. 2008. Sequence comparison and transmission of Blackcurrant reversion virus isolates in black, red and white currants with black currant reversion disease and full blossom disease symptoms. *European Journal of Plant Pathology* **121**:67–75.
- Raine J, McMullen RD, Forbes AR. 1986. Transmission of the Agent Causing Little Cherry Disease by the Apple Mealybug *Phenacoccus Aceris* and the dodder *Cuscuta Lupuliformis*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **8**:6–11.
- Rajamäki M-L, Lemmetty A, Laamanen J, Roininen E, Vishwakarma A, Streng J, Latvala S, Valkonen JPT. 2019. Small-RNA analysis of pre-basic mother plants and conserved accessions of plant genetic resources for the presence of viruses. *PLoS ONE* **14**:1-21.
- Richardson J, Frazier NW, Sylvester ES. 1972. Rhabdoviruslike particles associated with strawberry crinkle virus. *Phytopathology* **62**:491–492.
- Roenhorst JW, de Krom C, Fox A, Mehle N, Ravnikar M, Werkman AW. 2018. Ensuring validation in diagnostic testing is fit for purpose: a view from the plant virology laboratory. *EPPO Bulletin* **48**:105–115.

- Rott M, Xiang Y, Boyes I, Belton M, Saeed H, Kesanakurti P, Rast H. 2017. Application of Next Generation Sequencing for Diagnostic Testing of Tree Fruit Viruses and Viroids. *Plant Disease* **101**:1489-1499.
- Rott ME, Jelkmann W. 2001. Detection and Partial Characterization of a Second Closterovirus Associated with Little Cherry Disease, Little cherry virus-2. *Phytopathology* **91**:261-267.
- Rott ME, Jelkmann W. 2005. Little cherry virus-2: sequence and genomic organization of an unusual member of the Closteroviridae. *Archives of Virology* **150**:107-123.
- Schlesingerová G. 2012. Maloplodost třešně: Little cherry disease. Available from http://eagri.cz/public/web/file/177973/Listovka_maloplodost_tresne.pdf [online].
- Schoen CD, Limpens W, Moller I, Groeneveld L, Klerks MM, Lindner JL. 2004. The complete genomic sequence of strawberry crinkle virus, a member of the Rhabdoviridae. *Acta Horticulturae* 656: 45-50.
- Schröder M, Petruschke M. 2010. Occurrence of Little cherry virus-1 on Prunus species in the State of BadenWürttemberg, Germany. 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops **427**:268–271.
- Spiegel S, Martin RR. 1998. Compendium of Strawberry Diseases. *Virus and viruslike diseases* 62–72.
- Strange R, Scott P. 2005. Plant Disease: A Threat to Global Food Security. *Annual Review of Phytopathology* **43**:83–116.
- Špak J. 2009. Diagnostika rostlinných virů. Dostupné z <https://adoc.pub/queue/prof-ing-josef-pak-drsc-diagnostika-rostlinnych-vir.html>.
- Tahzima R, Foucart Y, Peusens G, Beliën T, Massart S, De Jonghe K. 2019. New sensitive and fast detection of Little cherry virus 1 using loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Journal of Virological Methods* **265**:91–98.
- Thekke-Veetil T, Tzanetakis IE. 2016. First Report of Strawberry polerovirus-1 in Strawberry in the United States. *Plant Disease* **100**:867–867.
- Thompson JR, Jelkmann W. 2003. The Detection and Variation of Strawberry mottle virus. *Plant Disease* **87**:385–390.
- Thompson JR, Jelkmann W. 2004. Strain diversity and conserved genome elements in Strawberry mild yellow edge virus. *Archives of Virology* **149**:1897–1909.
- Thompson JR, Leone G, Lindner JL, Jelkmann W, Schoen CD. 2002. Characterization and complete nucleotide sequence of Strawberry mottle virus: a tentative member of a new

- family of bipartite plant picorna-like viruses. *The Journal of General Virology* **83**:229-239.
- Thompson JR, Wetzel S, Klerks MM, Vasková D, Schoen CD, Spak J, Jelkmann W. 2003. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control. *Journal of Virological Methods* **111**:85–93.
- Valentová L, Čmejla R. 2020. Real-time PCR detekce virů Blackcurrant reversion virus (BRV) a Gooseberry vein banding associated virus (GVBaV) v biologickém materiálu. Certifikovaná metodika. VŠÚO, Holovousy.
- Valentová L, Rejlová M, Čmejla, R. 2019. Výskyt virů v sazenicích jahodníku zakoupených v České republice. *Vědecké práce ovocnářské* **26**:189-199.
- Valentová L, Rejlová M, Čmejla, R. 2021a. Vývoj a validace diagnostického real-time PCR systému pro detekci olive latent viru 1 (OLV-1) v rostlinách jahodníku. *Vědecké práce ovocnářské* **27**:1-13.
- Valentova L, Rejlova M, Franova J, Cmejla R. 2022. Symptomless infection by strawberry virus 1 (StrV-1) leads to losses in strawberry yields. *Plant Pathology* **71**:1220–1228.
- Valentová L, Rejlová M, Fránová J, Čmejla, R. 2021b. Strawberry virus 1 (StrV-1) – výskyt a hospodářská škodlivost nového viru jahodníku v České republice. *Zahradnictví* **20**:46-49.
- van der Want JPH, Dijkstra J. 2006. A history of plant virology. *Archives of Virology* **151**:1467–1498.
- Varanda CMR, Nolasco G, Clara MI, Félix MR. 2014. Genetic diversity of the coat protein of olive latent virus 1 isolates. *Archives of Virology* **159**:1351–1357.
- Vemulapati B, Druffel KL, Husebye D, Eigenbrode SD, Pappu HR. 2014. Development and application of ELISA assays for the detection of two members of the family Luteoviridae infecting legumes: Pea enation mosaic virus (genus Enamovirus) and Bean leafroll virus (genus Luteovirus). *Annals of Applied Biology* **165**:130–136.
- Wacker MJ, Godard MP. 2005. Analysis of One-Step and Two-Step Real-Time RT-PCR Using SuperScript III. *Journal of Biomolecular Techniques* **16**:266–271.
- Walker PJ, Dietzgen RG, Joubert DA, Blasdel KR. 2011. Rhabdovirus accessory genes. *Virus Research* **162**:110–125.
- Watzinger F, Ebner K, Lion T. 2006. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Molecular Aspects of Medicine* **27**:254–298.

- Webster CG, Wylie SJ, Jones MGK. 2004. Diagnosis of plant viral pathogens. *Current Science* **86**:1604–1607.
- Wei T, Lu G, Clover GRG. 2009. A multiplex RT-PCR for the detection of Potato yellow vein virus, Tobacco rattle virus and Tomato infectious chlorosis virus in potato with a plant internal amplification control. *Plant Pathology* **58**:203–209.
- Wright AA, Shires MK, Harper SJ. 2021. Titer and distribution of little cherry virus 2 in *Prunus avium*. *Archives of Virology* **166**:1415–1419.
- Xiang Y, Bernardy M, Bhagwat B, Wiersma PA, DeYoung R, Bouthillier M. 2015. The complete genome sequence of a new polerovirus in strawberry plants from eastern Canada showing strawberry decline symptoms. *Archives of Virology* **160**:553–556.
- Xu D, Mock R, Kinard G, Li R. 2011. Molecular analysis of the complete genomic sequences of four isolates of Gooseberry vein banding associated virus. *Virus Genes* **43**:130–137.
- Yu D, Tang H, Zhang Y, Du Z, Yu H, Chen Q. 2012. Comparison and Improvement of Different Methods of RNA Isolation from Strawberry (*Fragria × ananassa*). *Journal of Agricultural Science* **4**:51–56.
- Zeller S, Yaughan E. 1932. Crinkle disease of strawberry. *Phytopathology* **22**:709–713.
- Zhihong Z, Hongyi Y, Hongyan D, He L, Min X. 2006. Detection of Strawberry mottle virus and Strawberry mild yellow edge virus by Multiplex RT-PCR. *Acta Horticulturae Sinica* **33**:507.
- Zong X, Wang W, Wei H, Wang J, Chen X, Xu L, Zhu D, Tan Y, Liu Q. 2014. A multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of four viruses from sweet cherry. *Scientia Horticulturae* **180**:118–122.
- Zong X, Wang W, Wei H, Wang J, Yan X, Hammond RW, Liu Q. 2015. Incidence of Sweet Cherry Viruses in Shandong Province, China and a Case Study on Multiple Infection with Five Viruses. *Journal of Plant Pathology* **97**:61–68.
- Zurn JD, Ho T, Li R, Bassil NV, Tzanetakis IE, Martin RR, Postman JD. 2019. First Report of Blackcurrant Reversion Virus in *Ribes nigrum* Germplasm in the United States. *Plant Disease* **103**:1051.