



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



Laboratorní techniky detekce patogenů infikujících rostliny rodu *Vaccinium*

RNDr. Radek Čmejla, Ph.D. a kolektiv

7.10.2026



Detekce patogenů: Kdo a proč?

- Vývoj diagnostických metod pro detekci patogenů rodu *Vaccinium* pro omezování jejich výskytu v množitelském materiálu
- NAZV: QL24020033



Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 27, 195–204 (1997)



RNDr. Radek Čmejla, Ph.D.

Dr. Ing. Jana Fránová



PM 4/18(1)

EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION
ORGANISATION EUROPÉENNE ET MÉDITERRANÉENNE
POUR LA PROTECTION DES PLANTES

CERTIFICATION SCHEME
SCHÉMA DE CERTIFICATION

Pathogen-tested material of *Vaccinium* spp.
Certification sanitaire de matériel de *Vaccinium* spp.

ÚSTAV MOLEKULÁRNÍ
BIOLOGIE ROSTLIN, Biologické
centrum AV ČR, v. v. i.

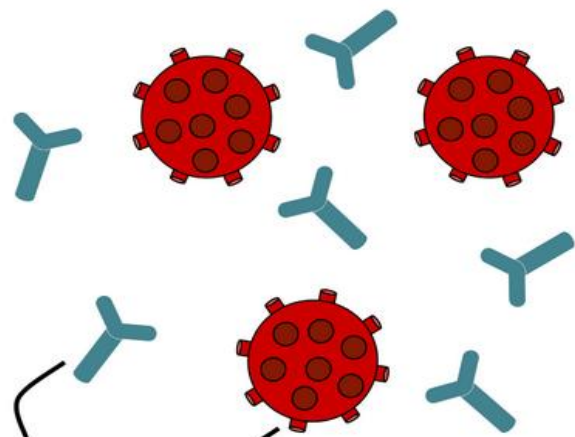


Detekce patogenů: Jak?

- Metody obecné (symptomatologie, mikroskopie, biologické testování, kultivační techniky/selekční média, HTS, aj.)
- Detekční systémy cílí na **SPECIFICKOU** část patogenu
 - Žádný jiný „organismus“ tuto část nemá
- Výběr **vhodného** „kousku“ patogenu – výběr vhodné detekční metody
- **Cíl**
 - nukleové kyseliny – DNA/RNA (genom, transkripty)
PCR testy (RT-PCR, qPCR, end-point PCR...) 
 - cokoliv, proti čemu lze připravit protilátky
Antigenní testy (ELISA, proužky, FC, FACS...) 

Detekce patogenů: Jak?

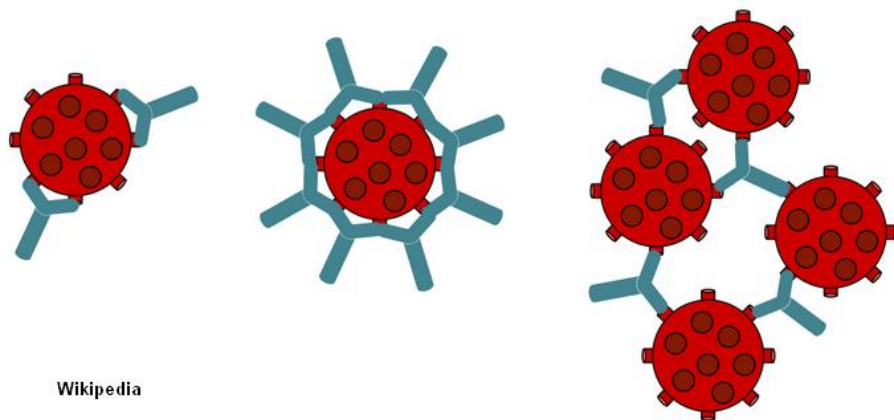
➤ Antigenní metody



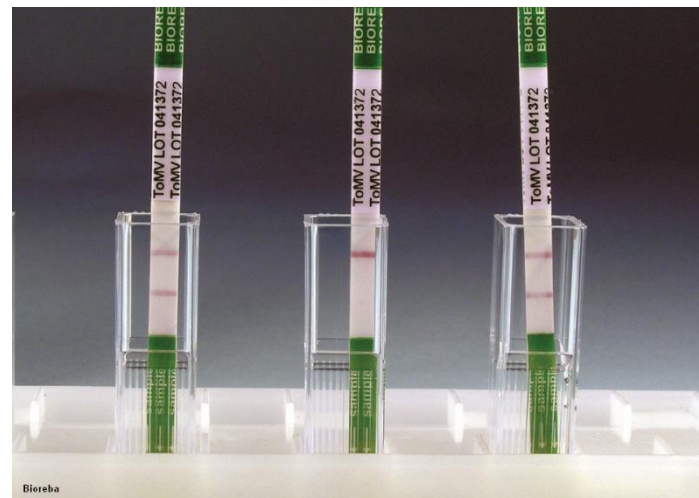
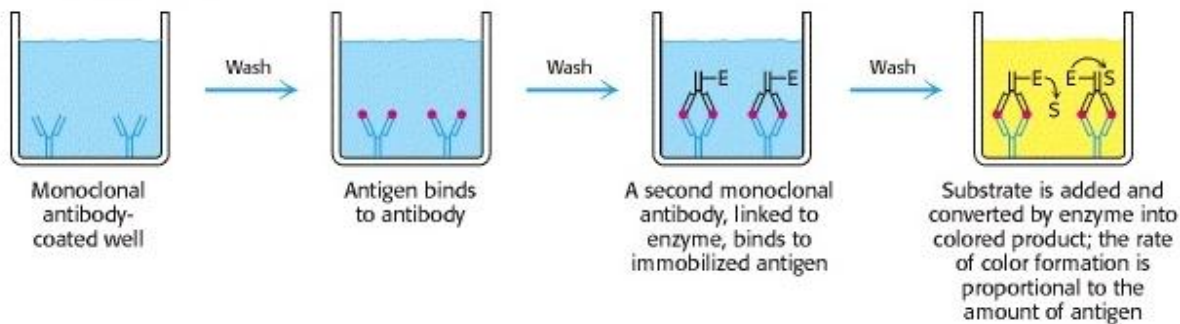
Protilátka

Antigen

Wikipedia



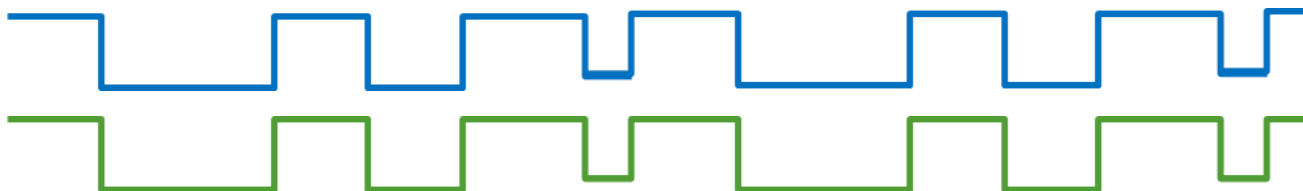
Wikipedia



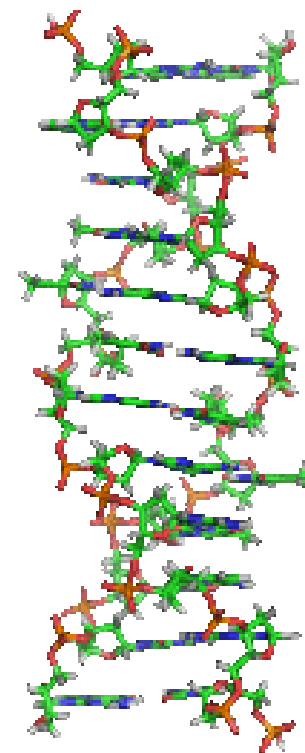
Detekce patogenů: Jak?

➤ PCR metody

- **Cíl:** nukleové kyseliny – DNA/RNA
 - genom, transkripty
 - vlákna/písmenka jsou komplementární

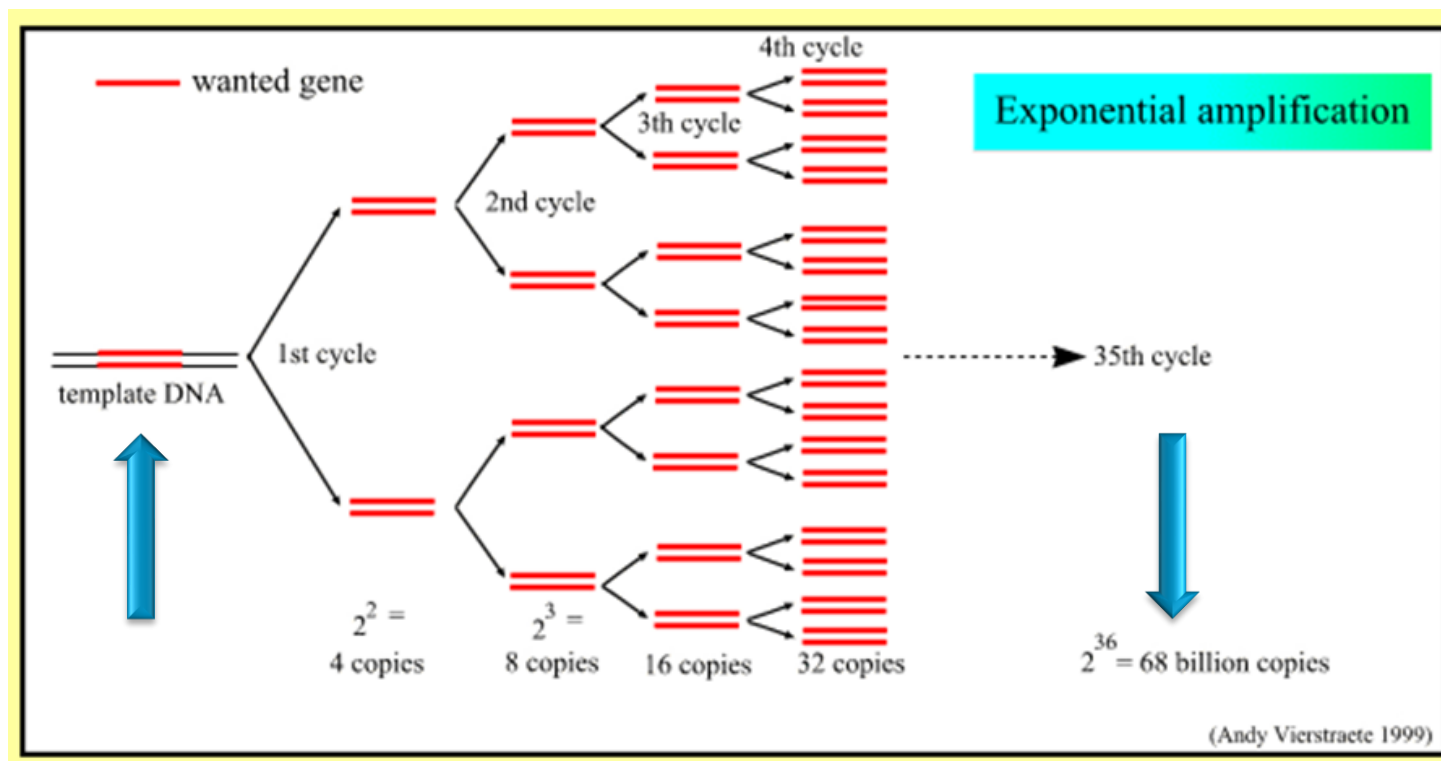


...ATGGCGA TTTTGA AATCC A CACTCGCTTTCCT...
...TACCGCT AAAA CTTT AGGTGTG AGCG AAA GGA...



Detekce patogenů: Jak?

- **PCR metody**
- Polymerázová řetězová reakce - v každém cyklu se počet DNA **zdvojnásobí!**



Detekce patogenů: Jak?

➤ PCR metody

- Extrémní citlivost: Výhoda × Nevýhoda
 - Stanovení relevantní hranice
 - Biologická interpretace
- Při znalosti genetické informace lze prakticky téměř vždy využít
- Technicky jednoduché, rychlé zavedení



➤ Antigenní metody

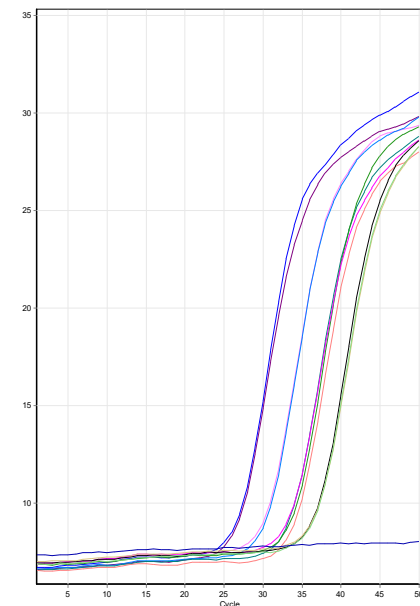
- | | |
|--------------------------|-------------------------------|
| • Obecně nižší citlivost | |
| • Vyšší procesivita | |
| • Levnější | • Obtížná příprava protilátek |
| • Pomalejší | • Možné nespecifity |



Detekce patogenů: Jak?

➤ PCR metody

- Různé typy a modifikace
 - Real-time PCR
 - Kvantitativní real-time PCR
 - **Multiplexní kvantitativní real-time PCR**



Detekce patogenů: qPCR

➤ Testované viry a fytoplazmy u druhů rodu *Vaccinium*

7 virů z různých skupin

- blueberry mosaic associated virus (**BIMaV**; druh *Ophiovirus vaccinii*)
- blueberry scorch virus (**BIScV**; druh *Carlavirus vaccinii*)
- blueberry shoestring virus (**BSSV**; druh *Sobemovirus BSSV*)
- blueberry red ringspot virus (**BRRV**; druh *Soymovirus maculavaccinii*)
- blueberry shock virus (**BIShV**; druh *Ilarvirus BSV*)
- tomato ringspot virus (**ToRSV**; druh *Nepovirus lycopersici*)
- tobacco ringspot virus (**TRSV**; druh *Nepovirus nicotianae*)



Detekce patogenů: qPCR

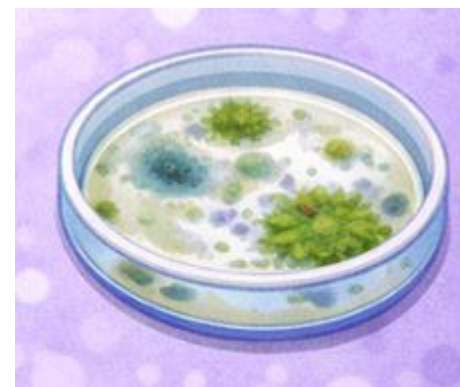
➤ Testované viry a fytoplazmy u druhů rodu *Vaccinium*

4 druhy fytoplazem z různých skupin

- *Candidatus Phytoplasma asteris* (skupina 16SrI)
- *Candidatus Phytoplasma pruni* (skupina 16SrIII)
- cranberry false blossom phytoplasma (skupina 16SrIII)
- *Candidatus Phytoplasma solani* (skupina 16SrXII)

Celkem **11** nekultivovatelných „organismů“

JAK NA TO?





Detekce patogenů: Vývoj qPCR systému

- Pro **každý** patogen zvlášť a pak dohromady je nutné
- získání a porovnání sekvencí dostupných izolátů z databáze GenBank, analýza sekvencí a identifikace vhodné oblasti pro návrh primerů a sond
 - ověření funkčnosti pomocí syntetických standardů a reálných izolátů
 - ověření potenciální křížové reaktivity s hostitelskými druhy
 - provedení multiplexování, ověření funkčnosti a výkonnosti ve srovnání se simplexovým systémem
 - stanovení výkonnostních parametrů testu – specifita, analytická senzitivita, opakovatelnost a reprodukovatelnost

VALIDACE

Vaccinium qPCR diagnostická souprava

- Dvě varianty podle typu cykleru, validace pro Rotor-Gene Q





Vaccinium qPCR diagnostická souprava

- Rozdělení všech 11 patogenů a 2 interních pozitivních kontrol do tří detekčních sad

BluebVir I	BluebVir II	PhytoBlueb
ToRSV	BRRV	Ca. P. solani
BIMaV	TRSV	Ca. P. asteris
BIScV		Ca. P. pruni cranberry false blossom phytoplasma
BSSV	BIShV	
IPC (RNA)		IPC (DNA)*

- Senzitivita: ≤ 500 kopií/rci (pro některé patogeny i 5 kopií)
- Specifita: 100 % za daných podmínek
- Opakovatelnost: $\pm 2,3$ %
- Reprodukovatelnost: $\pm 3,4$ %





**Děkuji
za
pozornost**