

Mezilaboratorní porovnávací zkouška

Odboru diagnostiky ÚKZÚZ

(MPZ/AP 2/2015)



Detekce fytoplazmy proliferace jabloně

(*Candidatus Phytoplasma mali*)

Obsah

Obsah	1
1. O pořadateli	2
2. Podmínky MPZ/AP 2/2015.....	2
3. Příprava vzorků	2
4. Testování vzorků.....	3
5. Odeslání vzorků laboratořím	3
6. Předávání výsledků	3
7. Seznam zúčastněných laboratoří účastnících se MPZ/AP 2/ 2015	3
8. Výsledky MPZ/AP 2/2015	4
9. Kontaktní údaje.....	4
10. Použitá literatura	5
11. Přílohy	5

1. O pořadateli

Mezilaboratorní porovnávací zkouška na detekci fytoplazmy proliferace jabloně metodou nested PCR (MPZ/AP 2/ 2015) byla připravena na Referátu virologie (od 1.6.2015 Laboratoř virologie) Odboru diagnostiky ÚKZÚZ. Laboratoře Odboru diagnostiky ÚKZÚZ podle § 5 odst. 3 zákona č. 147/2002 Sb., o Ústředním kontrolním a zkušebním ústavu zemědělském a o změně některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů vykonávají působnost Národní referenční laboratoře pro diagnostiku škodlivých organismů na úseku rostlinolékařské péče a Oddělení - diagnostická laboratoř Olomouc je držitelem osvědčení o akreditaci dle ČSN EN ISO/IEC 17025:2005.

2. Podmínky MPZ/AP 2/2015

Tato mezilaboratorní porovnávací zkouška je pořádána

- a) na základě žádosti laboratoře, procházející procesem kontroly plnění technických požadavků při udělování pověření výkonem činnosti referenční laboratoře pro diagnostiku fytoplazmy proliferace jabloně, uvedených v § 2 vyhlášky č. 204/2012 Sb. o technických požadavcích pro pověření referenční laboratoře
- b) na základě zájmu o účast v MPZ na detekci fytoplazmy proliferace jabloně metodou nested PCR

3. Příprava vzorků

Vzorky pro mezilaboratorní porovnávací zkoušku na detekci fytoplazmy proliferace jabloně metodou nested PCR jsou připraveny z výhonů jabloní, odebraných ze stromů, u nichž je přítomnost fytoplazmy proliferace jabloně pravidelně testována po dobu minulých 2 let. Bylo odebráno celkem 6 vzorků ze 6 stromů (3 pozitivní, 3 negativní). Vzorek je tvořen 4 výhony, každý o délce cca 30cm, odebranými po obvodu koruny. Po odběru byly vzorky zabalenы a uzavřeny do plastových sáčků, označeny čísly 1 – 6 a uchovávány při 8°C.

4. Testování vzorků

Z každého vzorku byla odebrána část a provedena izolace DNA metodou CTAB (Navrátil *et al.*, 2009), následně nested PCR s obecnými primery P1, P7 a fu5, ru3 (Deng, Hiruki, 1991; Kirkpatrick *et al.*, 1994; Lorenz *et al.*, 1995). U pozitivních vzorků byla fytoplazma určena RFLP enzymy *Alu*I, *Mse*I, *Rsa*I. U všech negativních vzorků byla provedena interní kontrola s použitím primerů NS7f, NS8r.

5. Odeslání vzorků laboratořím

Vzorky byly zabaleny do plastových sáčků, uzavřeny, řádně označeny číslem vzorku (1-6) a předány osobně v laboratoři. Spolu se vzorky byly laboratoři předány Pokyny pro účastníky a Výsledkový formulář.

6. Předávání výsledků

Předání výsledků proběhlo formou vyplnění Výsledkového formuláře, podepsáním odpovědného pracovníka a jeho odeslání poštou na adresu Diagnostické laboratoře v Olomouci a to do Ihůty, určené v Pokynech pro účastníky (viz Přílohy). Všechny obdržené výsledky byly shromážděny do tabulky. Výsledek MPZ/AP 2/ 2015 byl odeslán účastníkům poštou.

7. Seznam zúčastněných laboratoří účastnících se MPZ/AP 2/2015

Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.

8. Výsledky MPZ/AP 2/2015

vzorek číslo	výsledky zúčastněné laboratoře	předán vzorek
1	-	-
2	-	-
3	+	+
4	+	+
5	+	+
6	-	-

9. Kontaktní údaje

Kontaktní údaje

Mgr. Šárka Linhartová, Ph.D.

Email: sarka.linhartova@ukzuz.cz

Tel. 585570138

Mob. 725793792

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Odbor diagnostiky, Šlechtitelů 23, Olomouc, 77900.

Zpracovala

V Olomouci 3.7.2015

Linhartová

Mgr. Šárka Linhartová, Ph.D.
Vedoucí Laboratoře virologie

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
Oddělení diagnostická laboratoř Olomouc
Šlechtitelů 773/23
779 00 Olomouc

10. Použitá literatura

Navrátil, M (2009): Metodika detekce a identifikace karanténních fytoplazem ovocných dřevin.

Metodika pro Státní rostlinolékařskou správu, Univerzita Palackého v Olomouci, pp. 30.

Deng, S., Hiruki, C (1991): Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods* 14:53-61

Lorenz, K.H., Schneider, B., Ahrens, E., Seemüller U.E. (1995): Detection od apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopatology* 85: 771-776

Jarausch W, Saillard C, Dosba F & Bové J.M. (1994) Differentiation of mycoplasma-like organisms (MLOs) in European fruit trees by PCR using specific primers derived from the sequence of a chromosomal fragment of apple proliferation MLO. *Applied and Environmental Microbiology* 60(8):2916-2923.

Kirkpatrick, B.C., Smart, C.D., Gardener, S., Gao, J.L., Ahrens, U., Maurer, R., Schneider, B., Lorenz K.H., Seemüller E., Harrison N.A., Namba S., Daire, X (1994): Phylogenetic relationships of plant pathogenic MLOs established by 16/23S rDNA spacer sequences. *I.O.M. Lett.* 3:228-229.

11. Přílohy

**Mezilaboratorní porovnávací zkouška ÚKZÚZ - detekce a identifikace fytoplazmy
proliferace jabloně (*Candidatus Phytoplasma mali*)**

VÝSLEDKOVÝ FORMULÁŘ

Rok konání

Kontaktní osoba

E-mail

Adresa

.....

.....

Tabulka výsledků:

Stanovený patogen: fytoplazma proliferace jabloně (*Candidatus Phytoplasma mali*)

VZOREK ČÍSLO	VÝSLEDEK
1	
2	
3	
4	
5	
6	

(+ pozitivní nález; - negativní nález)

.....

Datum

.....

Razítko a podpis

**Mezilaboratorní porovnávací zkouška ÚKZÚZ - Detekce a identifikace fytoplazmy
proliferace jabloně (*Candidatus Phytoplasma mali*, AP)**

POKYNY PRO ÚČASTNÍKY MPZ:

Při práci se vzorky je třeba dbát pravidel pro přechovávání karanténního materiálu a manipulace s ním dle §8 zákona 326/2004 Sb. o rostlinolékařské péči a o změně některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších přepisů.

1. Rozesílané vzorky

Posíláme Vám 6 ks vzorků jabloní ke stanovení fytoplazmy proliferace jabloně označené 1-6.

Každý vzorek tvoří čtyři výhony odebrané z 1 stromu po obvodu koruny. Vzorky uchovávat v chladu.

2. Pokyny ke stanovení

Se vzorky zacházet jako s běžnými vzorky určenými ke stanovení přítomnosti fytoplazmy proliferace jabloně. Při izolaci DNA je třeba odebrat lýko ze všech čtyř výhonů tvořících každý jeden vzorek.

3. Odeslání výsledků

Výsledky testů se zapíší do **VÝSLEDKOVÉHO FORMULÁŘE** a odešlou na adresu DL Olomouc a to nejpozději do uvedeného termínu.

+ v případě pozitivního nálezu fytoplazmy proliferace jabloně nebo

- v případě negativního nálezu fytoplazmy proliferace jabloně

Termín dodání výsledků: 11.7.2015

Vyplněný a podepsaný **VÝSLEDKOVÝ FORMULÁŘ** zašlete prosím poštou na adresu:

Mgr. Šárka Linhartová, Ph.D.
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
Odbor diagnostiky
Šlechtitelů 23, Olomouc, 779 00

V Olomouci

.....

Mgr. Šárka Linhartová, Ph.D.
Vedoucí referátu virologie