

Mezilaboratorní porovnávací zkouška

Odboru diagnostiky ÚKZÚZ

(MPZ/AP /2016)



Detekce a identifikace fytoplazmy proliferace jabloně

(*Candidatus Phytoplasma mali*)

Obsah

Obsah	1
1. O pořadateli	2
2. Podmínky MPZ/AP 2016	2
3. Příprava vzorků	2
4. Testování vzorků	3
5. Odeslání vzorků laboratoři	3
6. Předávání výsledků	3
7. Seznam zúčastněných laboratoří účastnících se MPZ/AP 2016	3
8. Výsledky MPZ/AP 2016	4
9. Kontaktní údaje	4
10. Použitá literatura	5
11. Přílohy	5

1. O pořadateli

Mezilaboratorní porovnávací zkouška na detekci a identifikaci fytoplazmy proliferace jabloně metodou PCR (MPZ/AP 2016) byla připravena v Laboratoři 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 2016

Tato mezilaboratorní porovnávací zkouška je pořádána na základě zájmu o účast v MPZ na detekci a identifikaci fytoplazmy proliferace jabloně metodou PCR.

3. Příprava vzorků

Pozitivní vzorky pro mezilaboratorní porovnávací zkoušku na detekci a identifikaci fytoplazmy proliferace jabloně metodou PCR byly připraveny z výhonů jabloní, odebraných v říjnu 2016 ze stromů, u nichž je přítomnost fytoplazmy proliferace jabloně pravidelně testována po dobu minulých let. Negativní vzorky byly připraveny z výhonů jabloní negativně testovaných na přítomnost fytoplazmy proliferace jabloně a udržovaných v technické izolaci. Bylo odebráno celkem 5 vzorků z 5 stromů (4 pozitivní, 1 negativní). Vzorek je tvořen 4 výhony, každý o délce 20-30 cm, odebranými po obvodu koruny. Po odběru byly vzorky zabaleny a uzavřeny do plastových sáčků, označeny čísly 1 –5 a uchovávány v chladničce.

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; Kirkpartick *et al.*, 1994; Lorenz *et al.*, 1995). U pozitivních vzorků byla fytoplasma určena RFLP enzymy *AluI*, *Bfml*, *RsaI*. U negativního vzorku byla provedena interní kontrola s použitím primerů NS7f, NS8r (Pastrik, 2000).

5. Odeslání vzorků laboratoři

Vzorky byly zabaleny do plastových sáčků, uzavřeny, řádně označeny číslem vzorku (1-5) a ihned odeslány. Spolu se vzorky byly účastníkovi MPZ/AP 2016 odeslány Pokyny pro účastníky a Výsledkový formulář. Vzorek č.4 byl laboratoři doručen v nevhodném stavu, proto byl odebrán a odeslán znovu.

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 lhůty, určené v Pokynech pro účastníky (viz Přílohy). Obdržené výsledky byly shromážděny do tabulky. Výsledek MPZ/AP 2016 byl laboratoři odeslán poštou.

7. Seznam zúčastněných laboratoří účastnících se MPZ/AP 2016

Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o., Laboratorní komplement, Holovousy 129, 508 01 Hořice.

8. Výsledky MPZ/AP 2016

vzorek číslo	Výsledek laboratoře VŠÚO Holovousy	Předán vzorek
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	-	-
5	+	+

9. Kontaktní údaje

Kontaktní údaje

Šárka Linhartová

Email: sarka.linhartova@ukzuz.cz

Tel. 725793792

Mob. 585570138

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

Zpracovala

V Olomouci 14.11.2016

Mgr. Šárka Linhartová, Ph.D.



vedoucí Laboratoře virologie

Ústřední kontrolní
a zkušební ústav zemědělský
Odbor diagnostiky Olomouc
Šlechtitelů 23/23, 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 of apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. Phytopatology 85: 771-776

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.

Pastrik K.H. (2000) Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. European Journal of Plant Pathology 106, 155-165.

11. Přílohy

Pokyny pro účastníky MPZ

Výsledkový formulář

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 předpisů.

1. Rozesílané vzorky

Posíláme Vám 5 ks vzorků jabloní ke stanovení fytoplazmy proliferace jabloně označené čísly 1-5. Každý vzorek tvoří čtyři výhony odebrané z 1 stromu po obvodu koruny. Vzorky uchovávejte v chladu.

2. Pokyny ke stanovení

Se vzorky zacházejte 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 zapište do *VÝSLEDKOVÉHO FORMULÁŘE* a odešlete 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: 20.11.2016

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.

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

VÝSLEDKOVÝ FORMULÁŘ

Rok konání
Kontaktní osoba
E-mail
Adresa
.....
.....

Tabulka výsledků:

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

VZOREK ČÍSLO	VÝSLEDEK
1	
2	
3	
4	
5	

(+ pozitivní nález; - negativní nález)

