



národní
úložiště
šedé
literatury

Metodika stanovení rozšíření virů révy vinné ve výsadbách v ČR

Komínek, Petr
2012

Dostupný z <http://www.nusl.cz/ntk/nusl-112254>

Dílo je chráněno podle autorského zákona č. 121/2000 Sb.

Tento dokument byl stažen z Národního úložiště šedé literatury (NUŠL).

Datum stažení: 25.04.2024

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní nusl.cz .



ing. Petr Komínek, Ph.D.

Metodika stanovení rozšíření virů révy vinné ve výsadbách v ČR

METODIKA PRO ÚTVARY STÁTNÍ SPRÁVY



Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

2012

Metodika pro útvary státní správy

Metodiku schválilo Ministerstvo zemědělství ČR a doporučilo její využití v zemědělské praxi.

Autor:

ing. Petr Komínek, Ph.D.
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
Drnovská 507
161 06 Praha 6 - Ruzyně

Název:

Metodika stanovení rozšíření virů révy vinné ve výsadbách v ČR

Jména oponentů:

Ing. Gabriela Schlesingerová, Ph.D.
Státní rostlinolékařská správa Olomouc

Ing. Miloslav Zouhar, Ph.D.
Česká zemědělská univerzita v Praze

Dedikace:

Metodika vznikla za podpory MZe ČR v rámci řešení výzkumného záměru MZE0002700603.

ISBN: 978-80-7427-028-4

Obsah:	strana číslo
I. Cíl metodiky	3
II. Vlastní popis metodiky	
Úvod	3
1. Vybavení a chemikálie	4
1.1. Přístrojové zabezpečení	4
1.2. Materiál	4
1.3. Chemikálie a kity	4
1.4. Příprava roztoků	5
2. Postup pro odběr vzorků ve výsadbách révy vinné	6
3. Vlastní odběr a příprava vzorků	6
3.1. Réví	6
3.2. Testování za vegetace	7
3.3. Pozitivní kontrola	7
3.4. Negativní kontrola	7
4. Test ELISA	8
4. 1. Potažení destiček protilátkami	8
4. 2. Nanesení testovaných vzorků	9
4. 3. Pozitivní a negativní kontrola, blank	9
4. 4. Protilátky značené enzymem	9
4. 5. Enzymatická reakce	9
4. 6. Určení pozitivní reakce	10
5. Vyhodnocení výskytu virů	10
Seznam obrázků v metodice	10
III) Srovnání novosti postupů	11
IV) Popis uplatnění certifikované metodiky	11
V) Ekonomické aspekty	11
a) vyčíslení nákladů na zavedení postupů uvedených v metodice	11
b) vyčíslení ekonomického přínosu pro uživatele	11
VI) Seznam použité související literatury	12
VII) Seznam publikací, které předcházely metodice	12

I. Cíl metodiky

Cílem metodiky je stanovit rozšíření virů révy vinné ve výsadbách v ČR jejich detekcí v rostlinách révy pomocí ELISA.

II. Vlastní popis metodiky

Úvod

Metodika popisuje postup stanovení napadení výsadeb révy vinné viry. Pro detekci virů použijeme metodu ELISA, která je svojí cenou a možností testování velkého množství vzorků najednou k tomuto účelu zvláště vhodná. Dle našich dosavadních výsledků (Komínek a Holleínová, 2003; Komínek 2008) se z těch virů, jež lze detekovat pomocí ELISA a k nimž jsou dostupné protilátky, v ČR vyskytují ve výsadbách révy vinné tyto viry:

Virus roncetu révy vinné - Grapevine fanleaf virus - GFLV

Virus mozaiky huseníku - Arabis mosaic virus - ArMV

Virus svinutky révy vinné 1 - Grapevine leafroll-associated virus 1 - GLRaV-1

Virus svinutky révy vinné 2 - Grapevine leafroll-associated virus 2 - GLRaV-2

Virus svinutky révy vinné 3 - Grapevine leafroll-associated virus 3 - GLRaV-3

A virus révy vinné - Grapevine virus A - GVA

B virus révy vinné - Grapevine virus B - GVB

Virus skvrnitosti révy vinné - Grapevine fleck virus - GFkV

GFLV a ArMV vyvolávají u napadených rostlin příznaky mozaiky, žloutnutí, deformací čepele listů. Způsobují také sprchání hroznů, pokud se vyvinou bobule, jsou malé nebo nerovnoměrné velikosti.

Viry svinutky (GLRaV- a číslo) vyvolávají chorobu svinutku, která se projevuje stáčením okrajů čepelí listů směrem dolů a předčasným podzimním zabarvením listů. Viruprosté rostliny na podzim takřka vůbec nebarví listy! Dochází také ke snižování cukernatosti bobulí. Tyto viry jsou v ČR značně rozšířené.

GVA a GVB způsobují poruchy růstu, které se projevují nejvíce na srůstu podnože a naštěpované odrůdy. Tím dochází ke snižování toku živin a asimilátů mezi podzemní a nadzemní částí rostliny, snižování životaschopnosti keře a tím i k snižování výnosů. Extrémním případem je inkompatibilita podnože a naštěpované části, kdy naštěpovaná část přiroste jen málo nebo vůbec ne a nadzemní část rostliny během několika let zcela odumírá. Příznaky infekce GVA a GVB se na listech napadených rostlin většinou neprojevují.

GFkV způsobuje opět poruchy srůstu podnože a naštěpované odrůdy.

Častá je i infekce více viry v jedné rostlině.

Požadavky na zdravotní stav množitelského materiálu jsou dány zákonem č. 219/2003 Sb. a navazující vyhláškou č. 332/2006Sb, které zapracovávají i příslušné předpisy Evropských společenství. Dle této platné legislativy je povinné testování množitelského materiálu révy na GFLV, ArMV, GLRaV-1, GLRaV-3 a u podnožové révy ještě GFkV.

1. Vybavení a chemikálie

1.1. Přístrojové zabezpečení

- chladnička (+4 °C)
- pH-metr
- laboratorní váhy
- sada mikropipet (0,5–10 µl, 20–200 µl, 200–1000 µl)
- osmikanálová pipeta 20–200 µl
- ruční homogenizátor Bioreba, katalog Bioreba 400010 nebo
- elektrický homogenizátor Bioreba Homex6, katalog Bioreba 400005
- promývačka, např. Hydroflex nebo Columbus firmy Tecan
- spektrofotometr, např. OpsysMR firmy Dynex nebo Sunrise firmy Tecan

1.2. Materiál

- zahradnické nůžky
- ostrý nůž
- skalpel
- role alobalu
- váženky
- homogenizační sáčky pro ELISA, katalog Bioreba 430100b
- laboratorní sklo (kádinky, odměrné válce)
- špičky pro mikropipety
- mikrotitrační destičky Nunc Maxisorp (dodává např. Loewe)
- lepicí fólie na destičky, katalog Alpha LW2697

1.3. Chemikálie a kity

- **Kity pro detekci virů** včetně pozitivní a negativní kontroly **lze koupit od řady renomovaných dodavatelů:**

- Bioreba - <http://www.bioreba.com>
- Agritest - <http://www.agritest.it>
- Sediag - <http://www.sediag.com>
- Loewe - <http://www.loewe-info.com>

Kit pro detekci **GFLV** dodává např. Bioreba, Loewe, Agritest, Sediag.

- kit pro detekci **ArMV** dodává např. Bioreba, Loewe, Agritest, Sediag.

- kit pro detekci **GLRaV-1** dodává např. Bioreba, Agritest, Sediag.

- kit pro detekci **GLRaV-2** dodává např. Bioreba, Agritest, Sediag.

- kit pro detekci **GLRaV-3** dodává např. Bioreba, Agritest, Sediag.

- kit pro detekci **GVA** dodává např. Bioreba, Agritest, Sediag.

- kit pro detekci **GVB** dodává např. Agritest a Sediag.

- kit pro detekci **GFkV** dodává např. Bioreba, Agritest, Sediag.

Vzhledem k ceně doporučujeme protilátky od firmy Agritest, jejich kvalita z hlediska spolehlivosti detekce viru je srovnatelná s protilátkami od firem Loewe a Bioreba. Protilátky od firmy Sediag jsme u réвовých virů nezkoušeli, jsou však na pracovišti VÚRV používány při detekci jiných virů a jsou spolehlivé. Uvádíme je zde proto jako alternativu.

- p- nitrofenylfosfát, Sigma 71768, Loewe <http://www.loewe-info.com> prodává jako "substrate tablets"

- Diethanolamine, Sigma D8885
- destilovaná voda

Běžné chemikálie, dodává např. P-lab, Lachema, Druchema, příp. Sigma - Aldrich a pod.

- NaCl
- KCl
- $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$
- Na_2HPO_4
- KH_2PO_4
- Na_2CO_3
- NaHCO_3
- NaN_3
- NaOH
- HCl
- Tris
- PVP K25
- Tween 20
- BSA (bovine serum albumin)

1.4. Příprava roztoků

Promývací pufr PBST (phosphate buffered saline + Tween): Tohoto pufru si připravíme vždy alespoň 10 litrů.

- 8,0 g NaCl
- 2,9 g Na_2HPO_4
- 0,2 g KH_2PO_4
- 0,2 g KCl
- 0,2 g NaN_3
- 0,5 ml Tween 20.

Doplníme do 1 litru destilovanou vodou, zkontrolujeme pH = 7,4.

Extrakční pufr pro révu

- 8,0 g NaCl
- 2,4 g Tris
- 20 g PVP K25
- 0,2 g KCl
- 0,2 g NaN_3
- 0,5 ml Tween 20

Doplníme do 1 litru destilovanou vodou, zkontrolujeme pH = 7,4.

Konjugátový pufr pro révu

- 8,0 g NaCl
- 2,4 g Tris
- 20 g PVP K25
- 0,2 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$
- 0,2 g KCl
- 2,0 g BSA (bovine serum albumin)
- 0,2 g NaN_3
- 0,5 ml Tween 20

Doplníme do 1 litru destilovanou vodou, zkontrolujeme pH = 7,4.

Karbonát - bikarbonátový potahový pufr pro navázání IgG

1,59 g Na₂CO₃ nebo 4,29 g Na₂CO₃ x 10 H₂O

2,93 g NaHCO₃

0,2 g NaN₃

Doplníme do 1 litru destilovanou vodou, zkontrolujeme pH = 9,6.

Substrátový pufr

97 ml diethanolaminu

0,2 g NaN₃

800 ml destilované vody

pH nastavíme pomocí 36% HCl na 9,8 a doplníme destilovanou vodou do 1 litru

2. Postup pro odběr vzorků ve výsadbách révy vinné

Pokud testujeme například elitní množitelské materiály u jejich udržovatele, doporučujeme odebrat vzorky z 20 rostlin z každého klonu. Odebíráme v pravidelných intervalech, například každou pátou rostlinu.

Máme-li u určitých rostlin podezření na virovou infekci, označíme si je během vegetace například barvou na oporu, abychom je mohli potom testovat v zimním období.

Pokud testujeme produkční výsadbu, můžeme se zaměřit na konkrétní keře nebo konkrétní odrůdu, u nichž potřebujeme zjistit zdravotní stav. Pokud nám jde získání obrazu o celkovém zdravotním stavu výsadby, provedeme náhodný odběr. Při našich testech, prováděných ve všech vinařských oblastech v ČR, jsme nezjistili žádnou vazbu mezi konkrétní odrůdou a konkrétním virem. I při testování rostlin v porostu přímo sousedících jsme zjistili různé spektrum přítomných virů a jejich kombinací. Spektrum virů se nemění ani na okrajích porostů.

Provedeme proto náhodný odběr, například po diagonále výsadby, nebo z každého řádku testujeme například vždy pátou rostlinu.

3. Odběr a příprava vzorků

3.1. Réví

Jako odebírané pletivo lze pro vyjmenované viry doporučit jednoznačně dormantní jednoleté réví. Odebíráme po opadu listů až do března, ideálně před řezem révy nebo při řezu. Z testované rostliny je nutno odebrat tři výhony z různých částí rostliny, z nichž pak uděláme průměrný směsný vzorek.

Výhodou tohoto materiálu je snadná manipulace s takovýmto vzorkem a možnost jeho dlouhodobého skladování (až 2 roky) v chladu, pokud zabráníme vyschnutí odebraného réví například navlhčeným filtračním papírem.

Testované réví ze tří částí keře nastříháme zahradnickými nůžkami tak, abychom dostali z každé části keře jedno internodium (úsek réví mezi listy). Z těchto tří částí sloupneme ostrým nožem kůru - je to tenká hnědá slupka, která se většinou snadno loupe. Pod ní se nachází jasně zelená vrstva, což je lýko, které je pro nás testovaným pletivem. Pokud je tato vrstva hnědá, je réví odumřelé a je nutno vzít jeho jinou část, která má tuto vrstvu opravdu zelenou.

Zelenou část = lýko pak škrábeme dlouhými tahy skalpelu nalobal položený na misce s ledem. Škrábeme ze všech tří připravených internodií, výsledný materiál promícháme ještě na

alobalu skalpelem. Naškrábaný a promíchaný materiál přeneseme k váze. Na vážence odvážíme 0,3 g pro test ELISA, nasypeme do homogenizačního sáčku a ihned zalijeme 3 ml extrakčního pufru pro ELISA a pokračujeme postupem ELISA, viz níže.

Pokud nemůžeme provádět testy ihned, lze též naškrábané lýko zamrazit - to je nutno udělat ihned po naškrábání a navážení. Mrazíme při -20°C , lépe při -80°C . Trvanlivost takto zamraženého materiálu je několik měsíců bez ztrát citlivosti testu, ale nesmí rozmrznout. Při zpracování je potom nutno zabránit rozmrznutí vzorku, dokud se nedostane do extrakčního pufru, který obsahuje antioxidanty, bránící destrukci rostlinných buněk a tím i přítomných virových částic.

3.2. Testování za vegetace

Alternativa k testování révy je použití zelených částí révy za vegetace. Použití mladých lístků, vegetačních vrcholů a úponků je vhodné zejména pro detekci GFLV, ArMV a GFkV. Tato mladá pletiva jsou vzhledem k charakteru růstu révy k dispozici po celou dobu vegetace, nejlepších výsledků z hlediska spolehlivosti detekce těchto virů dosahujeme při odběru v polovině května.

Testování starších listů ze spodní části výhonu je vhodné zejména pro detekci GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA a GVB, odběr provádíme od poloviny srpna do konce vegetace.

Vzorky je nutno odebírat ze tří různých částí rostliny. Navážka materiálu je stejně jako z lýka 0,3 g, vzorky lze též zamrazovat při -20°C nebo při -80°C .

Testování za vegetace používáme např. tehdy, pokud nemůžeme čekat na období dormance, např. při nálezů keře s podezřelými příznaky. Jinak se ale snažíme testování přesunout na zimní měsíce.

3.3. Pozitivní kontrola

Jako pozitivní kontrolu používáme rostliny révy vinné infikované testovanými viry. Postup přípravy vzorků je stejný jako je uvedeno výše u testovaných rostlin. Můžeme též použít pozitivní kontrolu dodávanou výrobcem kitu, která dává spolehlivé standardní výsledky.

3.4. Negativní kontrola

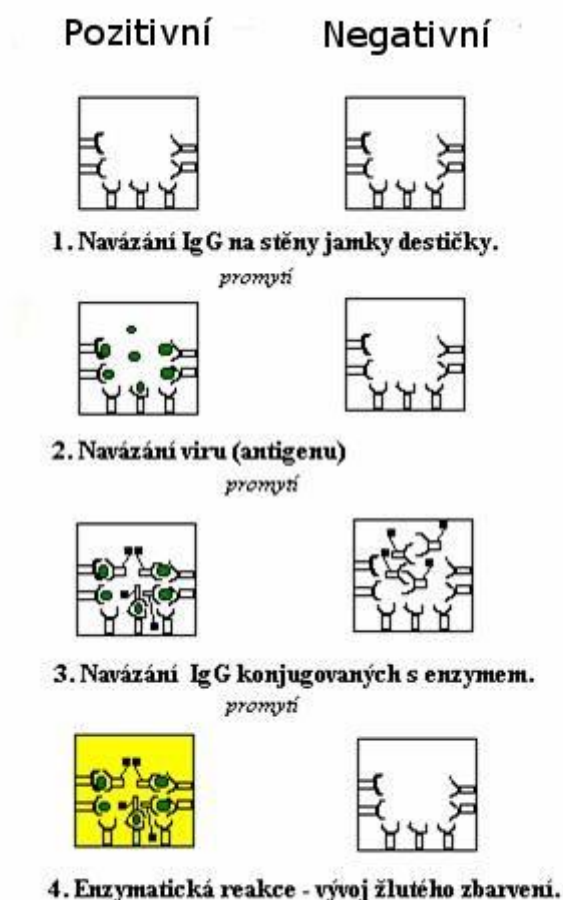
Jako negativní kontrolu používáme rostliny révy vinné prosté testovaných virů. Postup přípravy vzorků je stejný jako u testovaných rostlin. Můžeme též použít negativní kontrolu dodávanou výrobcem kitu.

4. Test ELISA

ELISA = Enzyme - Linked ImmunoSorbent Assay = enzymem značený imunovazebný test
Zde jde o metodu dvojitého sendviče protilátek (double antibody sandwich - DAS ELISA).
Protokol ELISA se může lišit od zde popsaného postupu, záleží na doporučení dodavatele kitu. Princip je však stejný.

Veškeré reakce provádíme z praktických důvodů (úspora reagensů) v objemu 100 μ l, i když výrobce doporučuje 200 μ l - výsledky získané při použití objemu reakce 100 μ l se nijak významně neliší od výsledků s 200 μ l reakcí.

Obrázek 1: Schéma DAS-ELISA



4. 1. Potažení destiček protilátkami

Pro test se používají mikrotitrační destičky s 96 jamkami a plochým dnem. První protilátka, označovaná jako IgG, navážeme na povrch stěn jamky. Roztok IgG ředíme v karbonát - bikarbonátovém potahovém pufru, pH 9,6. Použité zředění je většinou dle údajů výrobce, nejčastěji 1:1000, tedy 10 μ l IgG na 10 ml pufru, což je množství potřebné na jednu destičku. Roztok IgG pipetujeme na destičku, vždy 100 μ l do každé jamky. S výhodou zde použijeme osmikanálovou pipetu. Destičku zalepíme fólií nebo jiným způsobem zabezpečíme proti vysychání. Destičku poté inkubujeme 4 hodiny při 37°C.

Po skončení doby inkubace destičku promyjeme roztokem PBST. Destička se promývá třikrát, po každém promytí necháme promývací roztok v jamkách tři minuty. Používáme

automatickou promývačku, kde si nastavíme vhodný program. V případě ručního promývání použijeme stříčku, pomocí níž promyjeme všechny jamky na destičce promývacím pufrem tak, aby poté zůstal pufr v jamkách. Necháme tři minuty stát, pufr z destičky vyklepneme do výlevky a destičku ještě vyklepneme na filtrační papír. Tento postup třikrát opakujeme.

4. 2. Nanesení testovaných vzorků

Rostlinný materiál připravený viz výše homogenizujeme v homogenizačním sáčku s extrakčním pufrem v poměru většinou 1:10 (navážka vzorku v gramech : objem pufru v mililitrech), například 0,3 g vzorku a 3 ml pufru. Vzorek v sáčku s pufrem homogenizujeme buďto ručním nebo elektrickým homogenizátorem. Z každého takto získaného homogenátu nanášíme po 100 μ l do dvou jamek na destičce.

4. 3. Pozitivní a negativní kontrola, blank

Na každé destičce je nutno umístit tzv. blank. Jde o jamky s čistým extrakčním pufrem. Tyto jamky slouží pro odečet pozadí při spektrofotometrické analýze destičky. Jako blank se nejčastěji používají dvě jamky v levém horním rohu, poloha na destičce A1 a A2.

Negativní kontrolu používáme buďto dodanou od výrobce nebo vlastní. Umístujeme ji nejčastěji pod blank, tedy na pozice B1 a B2.

Pozitivní kontrolu používáme opět dodanou od výrobce nebo vlastní. Umístujeme ji nejčastěji do levého dolního rohu destičky, pozice H1 a H2.

Destičku opět zalepíme fólií a inkubujeme přes noc při 4°C. Druhý den destičku opět 3 krát promyjeme roztokem PBST.

4. 4. Protilátky značené enzymem

Na navázaný komplex protilátka - virus navážeme nyní další protilátku, tentokrát značenou enzymem. Konjugát ředíme v poměru doporučeném výrobcem, a to sice v konjugátovém pufru, uvedeném v této metodice. Roztok konjugátu pipetujeme na destičku, opět 100 μ l do každé jamky destičky. Destičku zalepíme novou čistou fólií a inkubujeme 4 hodiny při 37°C.

Po konjugátu musíme destičku promýt opravdu důkladně, protože sebemenší zanechané stopy konjugátu (tedy neodmytého enzymu) způsobují vysoké pozadí barevné reakce nebo falešné pozitivní reakce.

Promýváme pětkrát roztokem PBST.

4. 5. Enzymatická reakce

Enzym navázaný v konjugátu (alkalická fosfatáza) štěpí bezbarvý p- nitrofenylfosfát na fosfátovou skupinu a žlutý nitrofenol. Uvolněné množství nitrofenolu je úměrné aktivitě fosfatázy. Čím je žluté zbarvení sytější, intenzivnější (je vyšší absorbance při 405 nm), tím je vyšší koncentrace viru v testovaném vzorku.

Do každé jamky na destičce pipetujeme 100 μ l roztoku substrátu v diethanolaminovém pufru (10 mg substrátu na 10 ml pufru, což je množství potřebné pro jednu destičku).

Desku inkubujeme při pokojové teplotě bez přístupu světla (opět by mohlo docházet k samovolnému rozpadu p-nitrofenylfosfátu a tím k vysokému nespecifickému pozadí reakce).

V jamce, v níž byl vzorek obsahující testovaný virus, dochází k vývoji žlutého zbarvení působením zachyceného enzymu na substrát. Kde žádný virus nebyl, tam se konjugované protilátky nemohou zachytit a jsou promytím odstraněny.

Absorbanci při 405 nm (žluté zbarvení) měříme spektrofotometrem.

4. 6. Určení pozitivní reakce

Za pozitivní reakci považujeme tu hodnotu, která překročí o trojnásobek směrodatné odchylky průměrnou hodnotu absorbance negativní kontroly. V praxi můžeme za orientační hodnotu pozitivní reakce považovat hodnotu absorbance nad 0,100, přičemž negativní kontrola by měla mít hodnoty 0,010 a méně.

5. Vyhodnocení výskytu virů

Provedeme vyhodnocení výskytu virů v testovaných keřích révy vinné. U rostlin málo plodících s příznaky špatného růstu, kde zjistíme přítomnost několika virů, zejména GVA nebo GVB, můžeme předpokládat, že jsou viry původcem pozorovaných příznaků. Doporučujeme takovéto rostliny vytrhat, případně podsadit novými. U mladých rostlin doporučujeme reklamovat výskyt virů u dodavatele výsadbového materiálu.

Doporučujeme pro výsadby používat certifikovaný výsadbový materiál s dokladem o testování na přítomnost virů.

Seznam obrázků v metodice

Titulní strana: Muskat donskoj, VSV Karlštejn, foto RNDr. Olga Jandurová, CSc.

Obrázek 1: Schéma DAS-ELISA, autor ing. Petr Komínek, Ph.D.

strana 8

III) Srovnání novosti postupů

Metodika zabývající se hodnocením výskytu virů v rostlinách révy vinné nebyla dosud v ČR publikována, na toto téma byly vydány dvě původní vědecké práce Komínek a Holleínová (2003) a Komínek (2008).

IV) Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika je určena pro státní správu v oboru rostlinolékařství, je zaměřena na detekci významných patogenů révy vinné - jejím uživatelem je proto primárně Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, potenciálním uživatelem je též Státní rostlinolékařská správa. Využít ji však mohou veškeré podniky, zabývající se množением révy vinné.

V) Ekonomické aspekty

a) vyčíslení nákladů na zavedení postupů uvedených v metodice

Většina laboratoří, zabývajících se zdravotním stavem množitelského materiálu, je pro metodu ELISA vybavena. Náklady na vybavení zcela nové laboratoře by pak byly následující:

Programovatelný homogenizátor 175 000 Kč
Automatická promývačka 115 000 Kč
Reader na destičky ELISA 130 000 Kč
Velkokapacitní mrazicí box, lednice 40 000 Kč

Celkem cca 460 000 Kč.

b) vyčíslení ekonomického přínosu pro uživatele

Dle platné legislativy (zákon 219/2003 Sb., vyhláška 332/2006Sb) je testování množitelského materiálu révy povinné. Toto testování je jedním z úkolů ÚKZÚZ, který je primárním uživatelem této metodiky. Testování zdravotního stavu množitelského materiálu je vždy nákladem, jehož přínosy lze u vytrvalých kultur jako je réva, vyčíslit pouze s výhledem do vzdálenější budoucnosti, tedy zlepšení výkonnostních a jakostních parametrů hroznů a vína po zavedení ozdravených a testovaných množitelských materiálů do pěstitelské praxe.

VI) Seznam použité související literatury

Komínek P., Glasa M., Komínková M. Analysis of multiple virus-infected grapevine plant reveals persistence but uneven virus distribution. *Acta Virologica* 53, 2009: 281-285.

Sabanadzovic S, Abou-Ghanem N, Castellano MA, Digiario M, Martelli GP (2000): Grapevine fleck virus-like viruses in *Vitis*. *Archives of Virology* 145: 553–565.

VII) Seznam publikací, které předcházely metodice

Komínek P., Holleinová V.: Evaluation of sanitary status of grapevines in the Czech Republic. *Plant, Soil and Environment* 49, 2003: 63-66.

Komínek P., Bryxiová M. Comparison of three techniques for the detection of *Grapevine leafroll-associated virus 1*. *Acta Virologica* 49, 2005: 37-43.

Komínek P., Komínková-Bryxiová M., Jandurová O.M., Holleinová V. An RNA probe for the detection of *Grapevine virus A*. *Journal of Phytopathology* 156, 2008: 762-764.

Komínek P., Glasa M., Komínková M. Analysis of multiple virus-infected grapevine plant reveals persistence but uneven virus distribution. *Acta Virologica* 53 2009: 281-285.

Komínek P. Distribution of grapevine viruses in vineyards of the Czech Republic. *Journal of Plant Pathology* 90 (2), 2008: 357-358.

Metodika stanovení rozšíření virů révy vinné ve výsadbách v ČR

ing. Petr Komínek, Ph.D.

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2012

ISBN: 978-80-7427-028-4