

OBSAH

1. ÚVOD.....	7
1.1 RÉVA VINNÁ A NEPOVIRY.....	7
1.2 TAXONOMICKÉ ZAŘAZENÍ A MOLEKULÁRNÍ CHARAKTERISTIKA GFLV A ARMV.....	10
1.3 BIOLOGIE A ŠKODLIVOST NEPOVIRŮ GFLV A ARMV VE VZTAHU K RÉVĚ VINNÉ.....	12
1.4 PRINCIPY OCHRANY.....	18
1.5 ZJIŠŤOVÁNÍ VÝSKYTU.....	18
1.6 ROZŠÍŘENÍ GFLV A ArMV V ČESKÉ REPUBLICE.....	19
2. METODIKA SIMULTÁNNÍ DETEKCE A KVANTIFIKACE NEPOVIRŮ GFLV (<i>GRAPEVINE FANLEAF VIRUS</i>) A ArMV (<i>ARABIS MOSAIC VIRUS</i>) POMOCÍ TaqMan® REAL TIME PCR SYSTÉMU.....	20
2.1 CÍL, PRINCIPY A OVĚŘENÍ PŘEDKLÁDANÉ METODIKY.....	20
2.2 PŘÍSTROJOVÉ ZABEZPEČENÍ.....	23
2.3 CHEMIKÁLIE A MATERIÁL.....	24
2.4 ODBĚRY VZORKŮ.....	24
2.5. IZOLACE RNA.....	25
2.5.1 Izolace celkové RNA prostřednictvím kitu Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich®).....	26
2.6 OVĚŘENÍ KVALITY A KVANTITY IZOLOVANÉ RNA.....	28
2.6.1 Fluorimetrické měření koncentrace RNA prostřednictvím kitu Quant-iT™ RiboGreen® RNA Reagent (Invitrogen).....	28
2.6.2 Ověření kvality izolované RNA prostřednictvím provedení Internal Positive Control (vnitřní pozitivní kontrola).....	29
2.7 REVERZNÍ TRANSKRIPCE IZOLOVANÉ RNA.....	31
2.8 REAL TIME-PCR, MASTERMIXY A TEPLOTNÍ PODMÍNKY REAKCÍ.....	32

2.9 VYUŽITÍ REAL TIME PCR SYSTÉMU PRO KVANTIFIKACI GFLV A ArMV V TESTOVANÝCH PLETIVECH.....	34
2.9.1 Příprava standardu pro vytvoření kalibrační křivky.....	34
2.9.2 Příprava kalibrační křivky	35
2.9.3 Simultánní kvantifikace GFLV a ArMV v neznámých vzorcích prostřednictvím navrženého Real Time PCR systému	38
3. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ.....	39
4. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	40
5. EKONOMICKÉ ASPEKTY VYUŽITÍ PŘEDKLÁDANÉ METODIKY	41
5.1 NÁKLADY NA ZAVEDENÍ POSTUPU	41
5.2 VYČÍSLENÍ EKONOMICKÉHO PŘÍNOSU PRO UŽIVATELE	42
6. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	44
7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE.....	50