

**METODIKA KVANTIFIKACE HOUBOVÉHO PATOGENU
Rhizoctonia solani V PŮDĚ METODOU REAL-TIME PCR**

Ludmila Holková, Barbora Jílková, Jana Víchová, Martin Kmoch

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

2023

Mendelova univerzita v Brně

Ludmila Holková, Barbora Jílková, Jana Víchová, Martin Kmoch

**METODIKA KVANTIFIKACE HOUBOVÉHO PATOGENU
Rhizoctonia solani V PŮDĚ METODOU REAL-TIME PCR**

**QUANTIFICATION OF FUNGAL PATHOGEN *Rhizoctonia
solani* IN SOIL BY REAL-TIME PCR METHOD**

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

2023



Recenzenti:

Mgr. Pavel Matušinsky, Ph.D., Agrotest fyto s.r.o.

RNDr. Kateřina Tománková, Ph.D., Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

KOLEKTIV AUTORŮ

RNDr. Ludmila Holková, Ph.D.¹ *(Podíl na autorství 65 %)*

Ing. Barbora Jílková, Ph.D.¹ *(Podíl na autorství 20 %)*

Ing. Jana Víchová, Ph.D.¹ *(Podíl na autorství 5 %)*

Ing. Martin Kmoch, Ph.D.² *(Podíl na autorství 10 %)*

¹ Mendelova univerzita v Brně

² Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s. r. o

Kontakt: holkova@mendelu.cz

Tato metodika byla vypracována se státní podporou Ministerstva zemědělství ČR v rámci projektu NAZV QK21010083 – „Ekologická ochrana konzumních brambor jako zdravé zeleniny proti vybraným půdou a sadbou přenášeným patogenům“.

Metodika byla certifikována Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským vydáním osvědčení č. UKZUZ 017154/2024, ze dne 31. 1. 2024.

© Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

ISBN 978-80-7509-947-1

<https://doi.org/10.11118/978-80-7509-947-1>



Open Access. Publikace „METODIKA KVANTIFIKACE HOUBOVÉHO
PATOGENU *Rhizoctonia solani* V PŮDĚ METODOU REAL-TIME PCR“
podléhá licenci CC BY-NC-ND 4.0

OBSAH

1. CÍL METODIKY	4
2. VLASTNÍ POPIS METODIKY	4
2.1 ÚVOD	4
2.2 PRINCIP POUŽITÉ DIAGNOSTICKÉ METODY	5
2.3 STANOVENÍ MNOŽSTVÍ <i>R. SOLANI</i> V PŮDĚ METODOU RELATIVNÍ KVANTIFIKACE – VLASTNÍ POSTUP	9
2.3.1 Kultivace patogenů	9
2.3.2 Izolace DNA z mycelia izolátů	9
2.3.3 Izolace DNA z půdy	11
2.3.4 Příprava vzorků DNA pro qPCR	12
2.3.5 Kvantifikace <i>R. solani</i> pomocí qPCR	13
2.4 PŘÍKLAD PRAKTICKÉHO VYUŽITÍ	16
3. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	19
4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY	20
5. EKONOMICKÉ ASPEKTY	20
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	20
7. SEZNAM VYBRANÝCH PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	22

1. CÍL METODIKY

Cílem certifikované metodiky je optimalizovat molekulární metody detekce a kvantifikace polyfágního houbového patogenu *Rhizoctonia solani* z půdního prostředí. Metodika je zaměřena na hostitele lilek brambor, u kterého tento patogen způsobuje významné onemocnění – vločkovitost hlíz bramboru.

Použitá metoda SybrGreen real-time PCR umožňuje vysokou citlivost detekce uvedeného patogenu v půdě a zajišťuje spolehlivost diagnostiky. Protokoly jsou optimalizovány pro běžné použití v laboratořích zabývajících se molekulární biologii.

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

2.1 ÚVOD

Lilek brambor (*Solanum tuberosum* L.) patří v České republice k nejpěstovanějším okopaninám. Významnou roli zaujímá především v potravinářství, ale také v průmyslových odvětvích. V roce 2021 pěstební plocha dosáhla 28,9 tisíc ha a průměrná spotřeba se pohybovala mezi 60–65 kg/ osobu (Žižka, 2022).

Lilek brambor napadá celá řada patogenů z řad virů, bakterií, *Oomycetes* a hub. Významným houbovým patogenem je kořenomorka bramborová – *Rhizoctonia solani* Kühn, teleomorfa *Thanatephorus cucumeris* (Fr.) Donk, třída *Basidiomycetes*, která způsobuje onemocnění s názvem vločkovitost hlíz bramboru. Vločkovitost hlíz bramboru (obr.1) je hospodářsky významné onemocnění, které významně snižuje výnos, kvalitu hlíz i samotnou prodejnost vlivem výskytu deformací a sklerocií na hlízách (Ackerman *et al.*, 2013).



Obrázek 1 Symptomy vločkovitosti hlíz bramboru způsobené *R. solani*

R. solani je celosvětově rozšířený půdní nekrotrofní organismus, který má široký hostitelský okruh rostlin zahrnující i hospodářsky důležité plodiny. Napadány jsou rostliny z čeledi

Poaceae (pšenice, ječmen, oves, rýže, kukuřice), *Fabaceae* (sója, vaječnice), *Solanaceae* (brambor, tabák), *Amarantaceae* (řepa), *Brassicaceae* (řepka olejka), *Asteraceae* (salát) a další. Uvnitř druhu *R. solani* existuje značná genetická diverzita projevující se v biochemických a molekulárních markerech, v morfologii kolonií a rovněž i v patogenitě a agresivitě (Dubey *et al.*, 2016). Na základě této skutečnosti byly populace *R. solani* rozděleny na 14 somaticky nekompatibilních skupin nazývaných jako anastomóзовé skupiny AG-1 až AG-13 a AG-BI (Ajayi-Oyetunde & Bradley, 2018, Wallon *et al.*, 2020). Izoláty *R. solani* způsobující onemocnění brambor přísluší především do anastomóзовé skupiny 3 (AG-3), ačkoli i izoláty ze skupin AG-4, AG-5 a AG-9 mohou infikovat rostliny a hlízy brambor (Anguiz & Martin, 1989; Balali *et al.*, 1995).

Diagnostika *R. solani* je v současné době založena především na molekulárně biologických testech s využitím konvenční PCR nebo real-time PCR (qPCR). Vzhledem k vnitrodruhové specifitě mezi vnitřními transkribovanými mezerníky (ITS) rDNA činí tuto oblast jako velmi vhodnou pro molekulární detekci a také pro zařazení izolátů *R. solani* do jednotlivých AG-skupin (Lees *et al.*, 2002; Okubara *et al.*, 2008; Dubey *et al.*, 2016). PCR analýzy jsou rychlé, citlivé, umožňující nejen kvalitativní, ale i kvantitativní hodnocení (Woodhall *et al.*, 2013) patogenů nejen v hlízách bramboru, ale i v půdě. Mikroskopické metody mají při diagnostice *R. solani* pouze doplňkový charakter, a to z toho důvodu, že se patogen vyskytuje především ve vegetativní fázi bez tvorby nepohlavních spor (Ajayi-Oyetunde & Bradley, 2018).

R. solani přezimuje na hlízách a v půdě v podobě sklerocií a mycelia. V předešlých letech platilo, že v podmínkách ČR byl zdroj infekce ze sadby významnější než zdroj z půdy, kde patogen přežívá na posklizňových zbytcích. V souvislosti s minimalizací obdělávání půdy, a tudíž s vyšším obsahem nerozložené organické hmoty na pozemcích, se navyšuje riziko infekce z půdy. Pokud jsou hlízy skladovány při vyšší teplotě na relativní vlhkosti vzduchu, může mycelium vyrůstající ze sklerocií infikovat očka a později klíčky sousedních hlíz. Po výsadbě je infekce klíčků a podzemní části stonků silnější při chladném a vlhkém počasí, kdy porosty dlouho vzcházejí. Z hlediska kontroly množství patogenů v půdě (promořenosti půdy tímto patogenem) je důležité vytvořit citlivou metodu detekce a kvantifikace *R. solani* přímo v půdních vzorcích bez předcházející kultivace.

2.2 PRINCIP POUŽITÉ DIAGNOSTICKÉ METODY

Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Simuluje proces replikace DNA v podmínkách *in vitro*. Je to enzymatická reakce, které se účastní termostabilní DNA dependentní DNA polymeráza (Taq Polymeráza). Jako výchozí substrát slouží purifikovaná DNA. Syntéza nových řetězců probíhá od krátkých úseků DNA (primerů), jejichž sekvence je komplementární k hraniční oblasti požadovaného úseku DNA. Ve směsi DNA, Taq polymerázy, páru „forward“ a „reverse“ primerů a jednotlivých stavebních složek nového řetězce, tj. směsi všech 4 deoxynukleotid trifosfátů (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) smíchaných v reakčním pufru obsahujícím Mg^{2+} jako kofaktor použitého enzymu je pak v rámci cyklické reakce opakovaně syntetizován zvolený úsek DNA. Výsledný produkt lze snadno vizualizovat a sekvencovat. Výsledkem je tedy např. identifikace patogenů podle zvolené sekvence. Reakce hodnocená v reálném čase za pomoci některého ze systémů zahrnujících nárůst fluorescenčního signálu spolu s odpovídajícím nárůstem PCR produktu umožňuje nejen identifikaci, ale také kvantifikaci specifického produktu.

Tato cyklická reakce zahrnuje 3 kroky lišící se reakční teplotou.

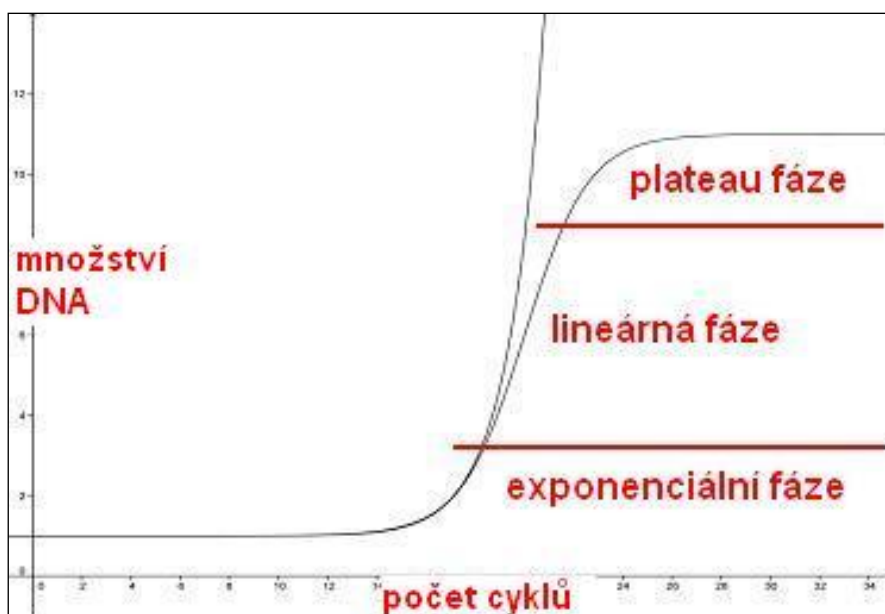
1. Denaturace – zahřívání DNA, při kterém dochází k rozrušení vodíkových můstků v molekule a následnému vzniku jednovláknové DNA.
2. Annealing – fáze nasedání primerů na specifická místa DNA. Na dvouvláknové úseky DNA-primer se váže DNA polymeráza.
3. Prodlužování – dochází k samotné syntéze DNA. Ve směru 5'→3' přirůstá vlákno DNA komplementární k původní molekule DNA.

Kroky PCR se cyklicky opakují. Pro dostatečnou amplifikaci původní molekuly DNA obvykle postačuje 30 cyklů. Finální produkt se zobrazuje pomocí různých typů gelové elektroforézy.

Real-time PCR (qPCR)

Pokud je real-time PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) využívána pro kvantifikaci, vychází z klasické PCR. Velkou předností této metody je kontinuální monitorování přírůstků DNA během každého cyklu, tedy v reálném čase. Základní podmínkou je přítomnost fluorescenčního substrátu, který se váže na syntetizovanou DNA. Úroveň detekované fluorescence, která v průběhu PCR roste, je přímo úměrná množství nasyntetizované nukleové kyseliny. Data jsou sbírána během celého procesu na real-time termocyklerech s optikou umožňující excitaci substrátů a následnou detekci fluorescence v každé jamce. Přístroj po každém cyklu zobrazuje fluorescenci, která se průběžně zaznamenává (Mičuda *et al.*, 2006).

Pro detekci produktů se často využívá nespecifické interkalační barvivo SYBR Green I., které se během cyklů váže na vznikající dsDNA. Po navázání na DNA se aktivuje fluorescenční záření, které je snímáno a vyhodnocováno. Postupné zvyšování úrovně fluorescenčního signálu odpovídá nárůstu DNA PCR produktu. Nárůst fluorescenčního signálu vidíme na obrazovce jako narůstající křivku v soustavě os x a y , kdy na ose x je počet cyklů reakce a na ose y je vynesena úroveň fluorescenčního signálu, která odpovídá množství syntetizované DNA. Typická amplifikační křivka (obr. 2) má esovitě prohnutý tvar a jednotlivé fáze křivky vypovídají o průběhu reakce: background fáze (fluorescence ještě není měřitelná), exponenciální fáze (reakce je precizní a specifická), lineární fáze (efektivita reakce pomalu klesá) a závěrečná plató (plateau) fáze, kdy je reakce pozvolna inhibována. Pro kvantitativní vyhodnocení je důležitý nástup exponenciální fáze, ve které jsou zachovány poměry mezi úrovní fluorescenčního signálu a množstvím vstupní (matricové) DNA. V této fázi probíhá odečet dat pro kvantifikaci. Z osy x se odečítají se hodnoty C_T , které vyjadřují počet cyklů, které musely v daném vzorku proběhnout, aby fluorescenční signál daného vzorku dosáhl předem zadané úrovně tzv. „threshold“, což je rovnoběžka s osou x , která specifikuje úroveň signifikantního nárůstu fluorescence signálu.



Obrázek 2 Průběh syntézy PCR produktu v jednotlivých fázích PCR

Výhodou qPCR je také vysoká specifita a citlivost (Mičuda *et al.*, 2006; Raclavský, 2003). Výsledek reakce známe dříve, než proběhnou všechny cykly. Kromě tohoto urychlení a vypuštění zdlouhavé detekce produktu na gelu je uvedená technika hlavně výhodná tam, kde potřebujeme znát přesné množství vstupní templátové DNA (Raclavský, 2003).

Způsoby kvantifikace

Kvantifikace vstupní matricové DNA může být provedena pomocí relativní nebo absolutní kvantifikace.

Relativní normalizovaná kvantifikace

Relativní normalizovaná kvantifikace je založena na porovnání úrovně fluorescenčního signálu u testovaného vzorku s úrovní fluorescenčního signálu u známého vzorku označovaného také jako vnitřní kalibrátor. Úroveň signálu u tohoto vzorku je brána jako 1 nebo 100% a úroveň signálu v testovaných vzorcích je vyjádřena buď podílem, nebo procenty vzhledem k vnitřnímu kalibrátoru. V každém vzorku jsou hodnoty C_T sledované sekvence DNA (genu) normalizovány pomocí hodnot C_T genu referenční DNA, který zaručuje korekci na stejné množství vstupní DNA v reakci. V případě, kdy se kvantifikuje DNA patogenu v pletivech hostitele, je výhodné brát jako referenční DNA hostitele. V případě kvantifikace patogenů ve vzorcích z půdy, je do vzorků přidáno stejné množství jakékoli jiné DNA (např. DNA kvasinek) (Lievens *et al.*, 2006). V této metodice byla použita DNA izolovaná z rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum*).

V případě kvantifikace patogenů je jako vnitřní kalibrátor brán nejčastěji vzorek z čisté myceliární kultury nebo vzorek z rostlin vykazující nejsilnější příznaky infekce. Tento vnitřní kalibrátor se pak přidává ke všem nezávislým hodnocením a takto je umožněno porovnat tyto výsledky mezi sebou. Pokud je u všech porovnávaných reakcí dosaženo 100% účinnosti, jsou

hodnoty normalizované relativní kvantifikace (NRK) generované softwarem, který bývá součástí real time cyklu. Při různé účinnosti reakcí (nedosahující 100 %) je nutno provést výpočet NRK podle rovnic uvedených v publikacích Pfaffel (2001) a Rasmussen (2001). Do výpočtů vstupují hodnoty C_T při dané úrovni thresholdu a účinnost je počítána z hodnoty směrnice aktuální kalibrační křivky, která je součástí každé série reakcí.

Normalizovaná relativní kvantifikace patogenů je stanovena na základě hodnot ΔC_T (rozdíl hodnot C_T referenčního genu a C_T genu identifikující druh patogenu) a vypočítána podle vztahu pro hodnocení relativní exprese (NRE) upravené dle Pfaffl (2001) s korekcí na účinnost reakcí (E).

$$RE = \frac{(E_{patogen})^{\Delta C_T patogen}}{(E_{referenční gen})^{\Delta C_T referenční gen}}$$

$$\Delta C_T patogen = C_T \text{ vnitřní kalibrátor (patogen)} - C_T \text{ vzorek}$$

$$\Delta C_T referenční gen = C_T \text{ vnitřní kalibrátor (referenční gen)} - C_T \text{ vzorek}$$

Účinnost PCR reakcí (E) byla odvozena z kalibrační křivky dle Rasmussen *et al.* (2001).

$$E = 10^{\frac{1}{\text{směrnice kalibrační přímky}}}$$

Absolutní kvantifikace

Absolutní kvantifikace vychází z normalizovaných hodnot C_T , které jsou následně dosazeny do rovnice kalibrační křivky složené z ředění vzorku DNA patogenu (DNA z mycelia) o známé koncentraci.

$$C_{T \text{ normalizované}} = \frac{C_{T patogenu}}{C_{T referenčního genu}}$$

U všech vzorků jsou za stejných podmínek sledovány hodnoty C_T patogenu (reakce s primery specifickými k sekvenci DNA patogenu) a hodnoty C_T hostitele (reakce s primery specifickými k sekvenci referenční DNA). Provedená korekce upravuje možné nepřesnosti vzniklé při spektrofotometrickém měření koncentrace DNA ve vzorcích.

Z kalibrační křivky lze odečíst odpovídající množství patogen specifické DNA v jednotkách kalibrační křivky.

Směrnice rovnice kalibrační přímky: $y = kx + q$

Koeficienty k (směrnice kalibrační přímky) i q získáme z popisu aktuální kalibrační přímky.

Dosazením normalizovaných hodnot C_T do směrnice rovnice přímky (za x) vypočítáme hodnotu log množství DNA patogenu v ng. Po odlogaritmování jsou tyto hodnoty přepočítány na množství DNA patogenu (pg) na konkrétní množství DNA hostitele (ng).

2.3 STANOVENÍ MNOŽSTVÍ *R. SOLANI* V PŮDĚ METODOU RELATIVNÍ KVANTIFIKACE – VLASTNÍ POSTUP

2.3.1 Kultivace patogenů

Technické vybavení potřebné pro kultivaci patogenů

- Petriho misky (90 mm)
- Flowbox – sterilní očkovací box (Faster Two 30)
- Autokláv (Tuttnauer 2540 M)
- Plynový kahan
- Mikrobiologické jehly

Chemikálie potřebné pro kultivaci patogenů

- Živné médium (Potato Dextrose Agar)
- Sterilní destilovaná voda

Postup kultivace:

Kultury hub kultivujeme při teplotě 21–24 °C cca 2 týdny.

2.3.2 Izolace DNA z mycelia izolátů

Technické vybavení pro izolaci DNA z mycelia hub a pro její uchovávání

- Nádoba na tekutý dusík (Cryometal KB 20)
- Třecí misky s tloučky
- Centrifuga s otáčkami min. 14 000 otáček/min s rotorem na plastové mikrozkuhavky o objemu 1,5 ml (Eppendorf, 5417R)
- Thermoblock (MD-02N-220)
- Vortex
- Pipety (2–20 µl, 20–200 µl a 100–1000 µl) a kompatibilní špičky
- Plastové mikrozkuhavky 1,5 ml (Eppendorf)
- Spektrofotometr (BioMate 4, Thermo Spectronic)
- Mrazicí box -20°C

Chemikálie potřebné pro izolaci DNA z mycelia hub

- Tekutý dusík
- DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Německo)
- Čistý etanol (96 %), analytical grade (Sigma) – do pufrů
- Technický etanol (70 %) – sterilizace

Izolace DNA z mycelia izolátů byla provedena pomocí komerčního kitu DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Německo) při dodržení standardního protokolu.

Před zahájením vlastní izolace je nutno připravit:

- Pufr AW1 a AW2 jsou dodávány bez etanolu, proto je nutné před prvním použitím přidat do roztoků doporučené množství 96% etanolu.
- Pufr AP1 a koncentrát AW1 se mohou během skladování částečně vysrážet. V takovém případě je vhodné je před použitím nahřát ve vodní lázni na 65 °C.
- Zahřát thermoblock na 65 °C.
- Předehřát pufr AE na 65 °C.

Postup izolace DNA

Homogenizovat 100 mg vzorku mycelia rozdrčením v třecí misce pomocí tekutého dusíku. Do mikrozkupek napipetovat 400 µl pufru AP1 a 4 µl RNase A (100mgml⁻¹).

- Mikrozkupek zavřít a důkladně promíchat (vortex).
- Inkubovat promíchanou směs 10 min při 65 °C, mikrozkupek během inkubace 2 až 3 x převrátit (*dochází k lyzi buněk*).
- Přidat 130 µl pufru P3 do lyzátu, promíchat a inkubovat 5 min na ledu.
- Centrifugovat lyzát 5 min/14 000 rpm.
- Napipetovat (přelít) lyzát do QIAshredder Mini spin column mikrozkupek (fialová) a centrifugovat 2 min/max. rychlost (*V těchto dvou krocích dochází k purifikaci lyzátu. Jsou odstraněny zbytky buněk a sraženina*).
- Přenést tekutou frakci do nové mikrozkupek.
- Přidat pipetou 1,5 objemu pufru AW1 a promíchat otáčením mikrozkupek (*částečné vysrážení DNA*).
- 650 µl směsi (včetně sraženiny) přenést do mikrozkupek DNeasy Mini spin column a centrifugovat 1 min/10 000 rpm, vylít proteklou frakci (*DNA se v tomto kroku váže na specifickou membránu z křemičité pryskyřice, která selektivně váže DNA/RNA v závislosti na koncentraci solí a dalších faktorech*).
- Opakovat krok h se zbývajícím částí vzorku. To znamená nanést zbytek směsi na stejnou kolonu.
- Kolonku přenést do nové mikrozkupek a přidat 500 µl pufru AW2 a centrifugovat 1 min/10 000 rpm; vylít proteklou frakci (*promývání membrány*).
- Na kolonku nanést 500 µl pufru AW2 a centrifugovat 2 min, max. rychlost (do vysušení membrány).
- Pro důkladné vysušení DNeasy membrány centrifugovat ještě jednou bez pufru 1 min/max. rychlost.
- Kolonku s membránou přenést do nové mikrozkupek a přidat 60 µl pufru AE přímo na střed membrány, nechat inkubovat 5 min při pokojové teplotě (15–25 °C).
- Centrifugovat 1 min/10 000 rpm.

- o) Po izolaci DNA je nezbytné stanovení její kvality a kvantity pomocí spektrofotometru (BioMate 4, Thermo Spectronic).
- p) Zamrazit vzorky. DNA se skladuje v mikrozkuřavkách (1,5 ml) při -20 °C.

2.3.3 Izolace DNA z půdy

Technické vybavení pro izolaci DNA z půdy

- Nádořa na tekutý dusík (Cryometal KB 20)
- SÍto– velikost otvorů 2 mm
- TřecÍ misky s tloučky
- Centrifuga s otáčkami min. 14 000 rpm s rotorem na plastové mikrozkuřavky o objemu 1,5 ml (Eppendorf, 5417R)
- Thermoblock (MD-02N-220)
- Vortex mixer (Stuart SA7)
- Multi speed Vortex MSV-3500 s adapterem na vortexování mikrozkuřavek o objemu 2 ml
- Homogenizátor Ultra-Turrax (IKA® ULTRA-TURRAX® TUBE DISPERSER)
- Pipety (2–20 µl, 20–200 µl a 100–1000 µl) a kompatibilní špičky
- Plastové mikrozkuřavky 1,5 ml (Eppendorf)
- Spektrofotometr (BioMate 4, Thermo Spectronic)
- Mrazicí box -20°C

Chemikálie potřebné pro izolaci DNA z půdy

- Tekutý dusík
- AllPrep® PowerFecal®DNA/RNA Kit (Qiagen, Hilden, Německo)
- Čistý etanol (96 %), analytical grade (Sigma Aldrich, Německo) – do puřrů
- 1M DTT (Dithiothreitol)

Před vlastní izolací DNA je nutno připravit:

- Přidat 96% etanol do puřrů AW1, AW2 a RPE podle pokynů na lahvičkách.
- Zahřát puřr PM1 na 55 °C 10 min.

Příprava vzorku na izolaci DNA z půdy

Vzorky půdy musí být odeřbírány ve větších objemech a homogenizovány tak, aby do vlastní izolace vstupovaly alikvoty zastupující testované množství.

Postup izolace DNA

- a) 500 g mírně vlhké půdy přesít na sítu 2 mm a promíchat. Alikvoty 5–10 g takto upravené zeminy homogenizovat 3 min pomocí homogenizátoru Ultra-Turrax.

- b) Z takto homogenizovaných vzorků odebrat 2 g do následné homogenizace v třecí misce pomocí tekutého dusíku.
- c) Z této frakce odebrat 250 mg, přenést do mikrozkušavek označených „Microbial Lysis Tubes“ a přidat 800 μ l pufru PM1 a 25 μ l DTT a další kroky izolace provádět dle standardního protokolu použitého kitu.
- d) Umístit zkumavky se vzorkem horizontálně do adapteru a vortexovat 10 min při maximálních otáčkách (*zkumavky obsahují skleněné kuličky, které napomáhají rozbití buněk*). V pufru dochází k lyzi buněk.
- e) Centrifugovat lyzát 1 min při maximálních otáčkách (14 000 rpm). Přenést supernatant do nové mikrozkušavky (1,5 ml) a přidat 150 μ l roztoku IRS, krátce promíchat vortexem a inkubovat 5 min při 4 °C.
- f) Centrifugovat 1 min při 10 000 rpm. Přenést 300 μ l supernatantu do nové mikrozkušavky (2 ml), přidat 400 μ l pufru C4 a dobře promíchat pipetováním.
- g) Přenést 700 μ l směsi na kolonu „AllPrep DNA MinElute® spin column“ umístěné v mikrozkušavce (2 ml).
- h) Centrifugovat 30 s při 8 000 rpm. Kolonu přenést do nové mikrozkušavky (2 ml) a přidat na ni 500 μ l pufru AW1 a centrifugovat 30 s při 8 000 rpm. Odstranit supernatant.
- i) Na kolonu přidat 500 μ l pufru AW2 a centrifugovat 2 min při maximálních otáčkách. Odstranit supernatant.
- j) Přenést kolonu do čisté mikrozkušavky (2 ml) a centrifugovat naprázdno 1 min při maximálních otáčkách.
- k) Vysušenou kolonu přenést do nové mikrozkušavky (1,5 ml), na membránu nanést 30 μ l pufru EB, inkubovat 1 min při pokojové teplotě a centrifugovat 1 min při 8 000 rpm.

Proteklá frakce obsahuje DNA, kterou můžeme hned dále použít nebo skladovat při -20 °C.

2.3.4 Příprava vzorků DNA pro qPCR

- a) Množství DNA ve vzorcích je nutno změřit na spektrofotometru a následně všechny vzorky vyrovnat na stejnou koncentraci DNA (např. 50 $\text{ng}\mu\text{l}^{-1}$). Do všech vzorků DNA izolovaných z půdy přidat stejnou koncentraci referenční DNA (např. DNA izolovaná z *N. tabacum* o koncentraci 5 $\text{ng}\mu\text{l}^{-1}$).
- b) Jako pozitivní kontrolu a DNA pro vytvoření kalibračních křivek lze použít DNA izolovanou z myceliární kultury izolátů *R. solani* (RSM). Vyizolovaná DNA je naředěna na stejnou koncentraci jako u půdních izolátů a kvůli efektu pozadí je do základního vzorku přidána stejná koncentrace DNA izolovaná z nekontaminované nebo sterilizované půdy.
- c) Další vzorky kalibrační křivky (RSM II. – V.) jsou postupně 4× ředěny v poměru 1:9. Také ke všem vzorkům kalibrační křivky je přidána referenční DNA (např. DNA izolovaná z *N. tabacum* o koncentraci 5 $\text{ng}\mu\text{l}^{-1}$). Tato kalibrační křivka slouží k výpočtu účinnosti reakce s primery specifickými k sekvencím patogenu.
- d) Pro výpočet účinnosti reakce s primery specifickými k sekvenci na referenční DNA je připravena kalibrační řada ředění referenční DNA tabáku + DNA izolované ze sterilizované půdy. Základní vzorek je postupně 4× ředěn v poměru 1:9.

2.3.5 Kvantifikace *R. solani* pomocí qPCR

Pro qPCR je možno použít kit Xceed qPCR SG 2× Mix Lo-ROX (Institute of Applied Biotechnologies, Londýn, Velká Británie), který umožňuje hodnocení reakce v reálném čase díky obsahu interkalačního barviva SYBR Green I. Složení reakční směsi a koncentrace jednotlivých složek je uvedena v tabulce 1. Kvantifikace *R. solani* je provedena pomocí specifických primerů ARSF4/ARSR4 dle Dubey *et al.* (2016). Pro hodnocení vnitřní referenční DNA je navržena reakce s univerzálními primery Plant1(c)/Plant2 (d) (Taberlet *et al.*, 1991). Sekvence primerů jsou uvedeny v tabulce 2.

Technické vybavení potřebné pro PCR reakce

- Termocykler (iCycler Biorad iQ5)
- Software na vyhodnocení (součástí cykleru)
- PCR destičky – 96 jamek (Bio-Rad)
- Plastové mikrozkušavky 1,5 ml – příprava premixu
- Pipety (0,2–2,0 µl, 2–20 µl, 20–200 µl a 100–1000 µl), kompatibilní špičky (*s filtrem – zabránění možné kontaminaci*)
- Laminární RNA/DNA box
- Minicentrifuga, centrifuga (na destičky)
- Vortex – centrifuga, Multi-Spin MSC-6000 (BioSan)

Chemikálie potřebné pro PCR reakce

- Kit Xceed qPCR SG 2x Mix Lo-ROX (Institute of Applied Biotechnologies, Londýn, Velká Británie)
- Druhově specifické primery a primery na referenční gen podle sekvencí popsanych v uvedených publikacích – tabulka 2

Tabulka 1 Složení reakční směsi o celkovém objemu 25 µl

Složky reakční směsi (25µl)	Koncentrace zásobních roztoků	Objem (µl)	Výsledná koncentrace
Xceed pPCR 2x Mix	2x	12,5	1x
Forward primer	20 µM	0,6	480 nM
Reverse primer	20 µM	0,6	480 nM
PCR ddH ₂ O		9,3	
DNA	variabilní	2	

Tabulka 2 Sekvence a původ použitých primerů

Organismus	Označení primerů	Sekvence (5'-3')	Velikost produktu	Autoři
<i>R. solani</i>	ARSF4	CAACGGATCTCTTGGCTCTC	317 pb	Dubey et al., 2016
	ARSR4	GGTGTCTTCGGCGATAGATA		
<i>N. tabacum</i>	Plant1 (c)	CGAAATCGGTAGACGCTACG	577 pb	Taberlet et al., 1991
	Plant2 (d)	GGGGATAGAGGGACTTGAAC		

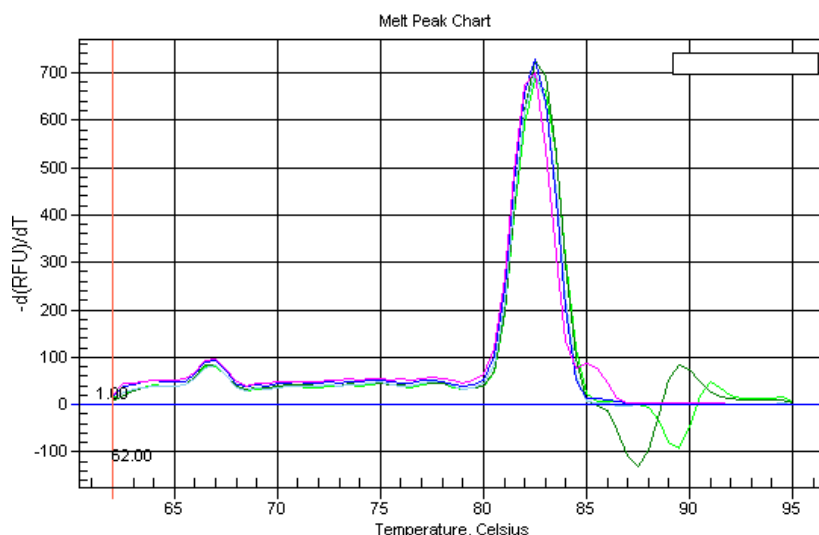
Postup přípravy qPCR

- Podle tabulky 1 je nutno namíchat 2 mixy všech složek (bez DNA) v objemech odpovídajících počtu všech testovaných vzorků včetně vzorků kalibrační křivky a negativní kontroly. Jeden mix s primery specifickými k sekvenci *R. solani* (ARSF4/ARSR4) a druhý s univerzálními primery (Plant1/Plant2).
- Premix rozpipetovat po 23 µl do jamek PCR destičky. Každý mix na samostatné platíčko, protože reakce neprobíhají za stejných podmínek.
- Do jednotlivých jamek přidat 2 µl DNA jednotlivých vzorků vyrovnaných na stejné množství DNA (viz kap. 2.3.4 příprava vzorků DNA). Do každého platíčka jsou přidány také vzorky odpovídající kalibrační křivky. Přičemž jeden ze vzorků křivky je zadán jako vnitřní kalibrátor.
- Za podmínek uvedených v tabulce 3 provést jednotlivé reakce v Real Time cyklu. Všechny reakce je vhodné opakovat ve třech technických opakováních.

Tabulka 3 Podmínky reakcí qPCR pro jednotlivé páry primerů

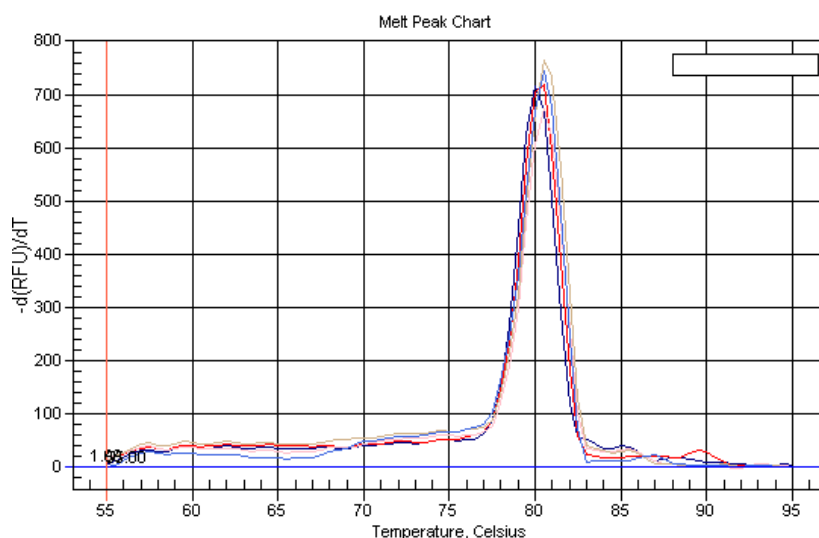
Fáze PCR	Počet cyklů	ARSF4/ARSR4	Plant1 (c)/Plant2(d)
Iniciace	1	95 °C–2 min	95 °C–2 min
Denaturace	40	95 °C–10 s	95 °C–10 s
Nasedání primerů		60 °C–10 s	55 °C–10 s
Syntéza		65 °C–30 s	65 °C–30 s
Anyláza teploty tání PCR produktu		Nárůst teplot z 60°C→95°C (každých 10 s o 0,5°C)	Nárůst teplot z 55°C→95°C (každých 10 s o 0,5°C)

Účinnost reakcí s primery ARSF4/ARSR4 v opakovaných testech se pohybuje mezi 97–100 % ($R^2 = 0,966–0,999$). Analýza teploty tání specifického PCR produktu potvrdila jeden specifický produkt o teplotě tání 82,5 °C (obr.3).



Obrázek 3 Analýza teploty tání produktu PCR s primery ARSF4/ARSR4

Účinnosti reakcí hodnotících množství referenční DNA (Plant1/Plant2) dosahovala 94 % ($R^2 = 0,997$). Teplota tání tohoto produktu byla 80 °C (obr.4).



Obrázek 4 Analýza teploty tání produktu PCR s primery Plant1(c)/Plant2(d)

Vyhodnocení qPCR metodou normalizované relativní kvantifikace

Výsledky qPCR jsou hodnoceny metodou relativní kvantifikace, při které porovnáváme úroveň specifického signálu v jednotlivých vzorcích s úrovní tohoto signálu ve vzorku, který označujeme jako vnitřní kalibrátor (např. vzorek 100× ředěné DNA izolované z mycelia *R. solani*). Hodnota specifického signálu v tomto vzorku (průměr ze 3 opakování) je brána jako 1 (nebo 100 %) a hodnoty specifického signálu v ostatních vzorcích jsou s ní porovnávány. Výpočet relativní kvantifikace je proveden dle Pffafel (2001). Do výpočtů vstupují hodnoty C_T

při úrovni $Th = 100$ generované softwarem, který je součástí cyklieru BioRad iQ5. Účinnost jednotlivých reakcí je přepočítána dle Rassmusen (2001). Do výpočtu dosazujeme absolutní hodnotu směrnice aktuální kalibrační křivky. Hodnota směrnice kalibrační křivky je také generována softwarem.

2.4 PŘÍKLAD PRAKTICKÉHO VYUŽITÍ

Postup

Stanovení *R. solani* bylo provedeno ve vzorcích půdy odebrané ze 3 stanovišť S1, S2 a S3. Vzorky S1 a S2 byly odebrány z pozemků, na kterých byly pěstovány brambory (Havlíčkův Brod). Vzorek S3 byl odebrán z pozemku, na kterém byl opakovaně pěstován ječmen (Brno). Jako negativní kontrola byla brána sterilizovaná půda. Pro ověření účinnosti izolace DNA a následné kvantifikace pomocí qPCR byla část vzorku půdy S1 kontaminována myceliem *R. solani*.

Vlastní izolaci DNA z půdy pomocí kitu AllPrep® PowerFecal®DNA/RNA Kit (Qiagen, Hilden, Německo) předcházela homogenizace většího objemu půdy. Mírně vlhká půda (0,5 kg) byla přeseta na sítu o velikosti ok 2 mm a promíchána. Alikvoty (10 g) takto upravené zeminy byly homogenizovány 3 min pomocí homogenizátoru Ultra-Turrax. Do části vzorku S1 bylo před homogenizací přidáno mycelium *R. solani* (10 g půdy + 200 mg mycelia) (S1+RS). Z takto homogenizovaných vzorků byly odebrány 2 g do následné homogenizace pomocí tekutého dusíku. Z této frakce bylo přeneseno 250 mg do 800 μ l izolačního pufru a další kroky izolace byly provedeny dle standardního protokolu použitého kitu. Množství DNA ve vzorcích bylo vyrovnáno na koncentraci 50 $\text{ng}\mu\text{l}^{-1}$.

Jako pozitivní kontrola a DNA pro vytvoření kalibračních křivek byla použita DNA izolovaná z myceliární kultury izolátů *R. solani* (RSM). 100 mg mycelia bylo rozdrceno v tekutém dusíku a DNA byla izolována pomocí kitu DNease Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Německo) podle standardního protokolu. Za pomoci stejného kitu byla izolovaná DNA z tkáňové kultury *N. tabacum*. Tato DNA byla použita jako vnitřní referenční kontrola do všech vzorků.

Vyizolovaná DNA byla naředěna na koncentraci 50 $\text{ng}\mu\text{l}^{-1}$, s výjimkou DNA izolované ze sterilizované půdy (STS), ze které byla získána nejvyšší možná koncentrace 15 $\text{ng}\mu\text{l}^{-1}$. Příprava vzorků je sumarizována v tabulce 4. První vzorek kalibrační křivky (RSM I.) byl připraven smícháním DNA izolované z myceliární kultury (RSM) a DNA izolované ze sterilní půdy (STS). Další vzorky kalibrační křivky (RSM II. – V.) byly postupně 4 \times ředěny v poměru 1:9. Také základní vzorky DNA z půdy cíleně kontaminované myceliem (S1+RS I.) a vzorky DNA izolované z neošetřené půdy (S1 I., S2 I. a S3 I.) byly postupně 3 \times ředěny v poměru 1:9. Ke všem vzorkům byla přidána DNA izolovaná z *in vitro* kultury *N. tabacum* tak, aby byla ve vzorcích její koncentrace stejná, vždy 5 $\text{ng}\mu\text{l}^{-1}$.

Tabulka 4 Množství DNA ve vzorcích připravených pro kvantifikaci *R. solani*

Označení vzorku	Množství DNA (ng μ l ⁻¹)		
	<i>R. solani</i> mycelium	Půda	<i>N. tabacum</i>
RSM I.	50	15	5
RSM II.	5	1,5	5
RSM III.	0,5	0,15	5
RSM IV.	0,05	0,015	5
RSM V.	0,005	0,0015	5
S1 + RS I.	50		5
S1 + RS II.	5		5
S1 + RS III.	0,5		5
S1 + RS IV.	0,05		5
S1 I.	0	50	5
S1 II.	0	5	5
S1 III.	0	0,5	5
S1 IV.	0	0,05	5
S2 I.	0	50	5
S2 II.	0	5	5
S2 III.	0	0,5	5
S2 IV.	0	0,05	5
S3 I.	0	50	5
S3 II.	0	5	5
S3 III.	0	0,5	5
S3 IV.	0	0,05	5
STS	0	15	5
K-	0	0	0

qPCR byla připravena pomocí kitu Xceed qPCR SG 2x Mix Lo-ROX (Institute of Applied Biotechnologies, Londýn, Velká Británie). Složení reakční směsi a koncentrace jednotlivých složek je uvedena v tabulce 1. Kvantifikace *R. solani* byla provedena pomocí specifických primerů ARSF4/ARSR4 dle Dubey *et al.* (2016). Pro hodnocení vnitřní referenční DNA byla provedena reakce s univerzálními primery Plant1(c)/Plant2 (d) (Taberlet *et al.*, 1991) viz výše uvedené body metodiky.

Výsledky qPCR byly hodnoceny metodou relativní kvantifikace. Jako vnitřní kalibrátor byl vybrán vzorek 100× ředěné DNA izolované z mycelia *R. solani* (v tabulce 5 je označen *). Hodnota specifického signálu v tomto vzorku (průměr ze 3 opakování) byla brána jako 1 (nebo 100 %) a hodnoty specifického signálu v ostatních vzorcích s ní byly porovnávány. Výpočet relativní kvantifikace byl proveden podle metody Pffafel (2001). Do výpočtů byly brány hodnoty CT při úrovni $T_h = 100$. Výsledné hodnoty uvedené v tabulce 5 představují průměrné hodnoty ze 3 opakování a jejich variabilita je vyjádřena hodnotami směrodatné odchylky (SD).

Výsledky

Výsledky normalizované relativní kvantifikace *R. solani* ve vzorcích testované půdy jsou uvedeny v tabulce 5.

Výsledné hodnoty relativní kvantifikace DNA *R. solani* jsou vztaženy k 100× ředěnému vzorku DNA mycelia (0,5 ng μ l⁻¹ specifické DNA). Z hodnot vzorků kalibrační křivky RSM I. – V. je

zřejmá lineární závislost ($R^2 = 0,9$) mezi množstvím DNA ve vzorcích a relativním množstvím specifické DNA vypočítaného na základě hodnot C_T . Tato závislost byla potvrzena hodnotami získanými u ředěných vzorků S1+RS I. – IV. V rámci kalibrační křivky jsme byli schopni hodnotit vzorky obsahující DNA z mycelií až do koncentrace $0,005 \text{ ng}\mu\text{l}^{-1}$. Ve vzorcích S1 + RS bylo ředění provedeno do hodnot $0,05 \text{ ng}\mu\text{l}^{-1}$. DNA izolované z cíleně kontaminované půdy (S1 + RS IV.), přičemž $1 \mu\text{l}$ DNA tohoto vzorku odpovídá asi $0,014 \text{ ng}$ mycelia. Čistý specifický produkt jsme byli schopni detekovat i ve vzorcích půdy S1 a S2, ve kterých bylo detekováno řádově $1000\times$ méně specifického produktu než ve vzorku RSM III (což odpovídá asi $0,5 \text{ pg}$ specifické DNA na $1 \mu\text{l}$ izolované DNA) a $10\times$ méně než v posledním ředění cíleně kontaminovaného vzorku (\sim DNA z $0,0014 \text{ ng}$ mycelia).

Množství specifické DNA v ředěných vzorcích S1 a S2, ve vzorku S3 a ve vzorku ze sterilizované půdy bylo již na hranici nebo za hranicí detekce. Lze je považovat za negativní.

Tabulka 5 Hodnoty vyjadřující relativní množství specifické DNA v $1 \mu\text{l}$ izolátu v porovnání s množstvím specifické DNA *R. solani* ve $100\times$ ředěném vzorku kalibrační křivky (*).

Označení vzorku	C_T patogena			C_T ref. genu	Relativní množství DNA <i>R.solani</i>	SD
	C_T p1	C_T p2	C_T p3	C_T ref průměr		
RSM I.	11,79	12,34	11,61	10,86	98,4844	18,8320
RSM II.	14,84	14,83	14,87	10,42	9,7452	0,1642
RSM III.*	18,33	18,19	18,15	10,46	0,9990	0,0518
RSM IV.	21,72	21,83	21,58	10,29	0,0827	0,0062
RSM V.	25,28	25,18	25,18	10,21	0,0072	0,0003
S1 + RS I.	12,32	12,68	12,16	10,71	64,8504	3,6290
S1 + RS II.	15,98	16,35	15,96	10,28	3,8097	0,0439
S1 + RS III.	19,19	19,07	18,97	10,22	0,4763	0,0297
S1 + RS IV.	22,27	26,24	29,12	10,16	0,0265	0,0176
S1 I.	26,98	27,34	26,87	10,66	0,0028	0,0004
S1 II.	29,65	29,77	29,88	10,3	0,0003	0,0000
S1 III.	30,99	30,8	31,13	10,19	0,0001	0,0001
S1 IV.	32,04	30,69	29,65	10,21	0,0002	0,0001
S2 I.	27,68	28,24	27,16	11,02	0,0024	0,0007
S2 II.	29,02	14,74	29,17	10,38	0,0005	0,0000
S2 III.	31,04	31,13	29,97	10,25	0,0002	0,0001
S2 IV.	31,12	30,99	30,75	10,21	0,0001	0,0003
S3 I.	29,77	30,18	28,88	11,33	0,0008	0,0003
S3 II.	30,62	30,11	30,86	10,32	0,0002	0,0000
S3 III.	32,33	31,44	30,87	10,2	0,0001	0,0000
S3 IV.	31,14	32,22	30,75	10,18	0,0001	0,0000
STS	30,2	31,64	28,88	10,37	0,0003	0,0002
K-	33,05	31,76	31,79	10,32	0,0000	0,0000

Závěr

Naše výsledky dokumentují vhodnost metody pro stanovení *R. solani* ve vzorcích půdy při relativně nízké koncentraci DNA. Specifický produkt odpovídající DNA *R. solani* jsme byli schopni detekovat ve vzorcích půdy, které obsahovaly $1000\times$ méně specifického produktu

oproti vzorku RSM III (což odpovídá asi 0,5 pg specifické DNA na 1 µl izolované DNA) a 10× méně než v posledním ředění cíleně kontaminovaného vzorku půdy (~DNA z 0,0014 ng mycelia).

3. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Použitá metoda real-time PCR (qPCR) umožňuje citlivou detekci patogenů v půdě a zajišťuje relativně vysokou spolehlivost diagnostiky. Certifikovaná metodika, která by se touto problematikou zabývala, dosud nebyla vypracována, proto můžeme námi předloženou metodu srovnávat pouze s výsledky publikovanými ve vědecké literatuře. První práce, které se touto problematikou zabývají, pocházejí z roku 2001. Na rozdíl od kvantifikace patogenů v pletivech hostitele, může být stanovení koncentrací patogenů ve vzorcích půdy komplikované. Je to dáno několika faktory. Koncentrace patogenů v půdě bývá hodně nízká, může být přítomno mnoho různých půdních mikroorganismů, a proto jakákoli následná kultivace vzorků může vést ke změnám v kvantitativních poměrech. Citlivost kvantifikace musí být vysoká a ve všech publikovaných pracích byla prokazována na vzorcích uměle kontaminovaných (Cullen *et al.*, 2001; Woodhall *et al.*, 2013; Dubey *et al.*, 2016). Takovéto vzorky mohou sloužit jako základ kalibrace, ale při izolaci DNA z kontaminované půdy může docházet ke ztrátám způsobeným různou účinností izolace, a proto jsou pro kalibraci vhodnější izoláty DNA přímo z čistého mycelia. Pro zohlednění pozadí DNA z půdy (zejména vzhledem k možným příměsím látek inhibičního charakteru) by mohlo být přesnější přimíchání DNA z půdy k přesně změřeným vzorkům DNA z mycelia.

Citlivost detekce musí být také doprovázena účinnou metodou izolace DNA z půdy, což v případě houbových patogenů není jednoduché. V současné době je na trhu více kitů, které jsou doporučeny pro izolaci DNA z půdy, ale my jsme nejlepší výtěžky získávali při použití kitu, který je určen pro izolaci DNA z fekálií. Primery musí být vysoce specifické a současně musí reakce probíhat při nízkých koncentracích matricové DNA. Vyšší specifitu řeší systém kvantifikace s využitím vnitřních TagMan sond (Woodhall *et al.*, 2013). Tento systém je však náročný na kvalitní přístrojové vybavení a provozní chemikálie jsou dražší než v systémech využívajících SybrGreen. Specifické primery, které jsme použili, byly autory Dubey *et al.* (2016) navrženy pro qPCR, komplementární k oblasti ITS rDNA. Protože jsme prováděli kvantifikaci *R. solani* obecně, bez ohledu na druh izolátu, nebylo nutno používat systém využívající vnitřní sondy. Specifita reakce byla ověřena analýzou teploty tání PCR produktu a pravděpodobně díky účinné izolaci DNA se citlivost našich reakcí zvýšila ještě o jeden řád oproti výsledkům publikovaným v práci Dubey *et al.* (2016). Se stejnými primery byli schopni detekovat 1,24 pg DNA patogenu.

V neposlední řadě může být problematická interpretace výsledků absolutní kvantifikace. Přepočty hodnot C_T na množství specifické DNA ve váhových jednotkách obsažených v konkrétním množství půdy by mohlo být zkresleno odlišnou účinností izolace DNA.

Námi použitá metoda relativní kvantifikace tyto problémy obchází. Hodnoty specifické DNA jsou vyjádřeny poměrem k definovanému vzorku o známém obsahu DNA patogenu. Při použití stejného vnitřního kalibrátoru mohou být takto hodnoceny vzorky DNA z půdy z nezávislých izolací.

4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Optimalizace metody real-time PCR pro detekce *R. solani* v půdě, kterou se tato metodika zabývá, je v současnosti velmi perspektivní nejen z hlediska citlivosti, specifčnosti a rychlosti detekce, ale i lepší záruky eliminace nežádoucích technických chyb. S ohledem na tyto přednosti lze předpokládat jejich širší uplatnění například v kontrolní praxi. Certifikovaná metodika je určená pro pracoviště, která se zabývají diagnostikou patogenů rostlin, především pro akreditované diagnostické laboratoře státní správy, šlechtitelské organizace, výzkumné ústavy a jako služba pro zemědělskou praxi. Podrobné laboratorní protokoly uvedené v metodice mohou sloužit studentům vysokých škol při výuce fytopatologických předmětů zaměřených na diagnostické metody patogenů.

5. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Zavedení metodiky do laboratorní praxe (laboratoře přístrojově vybavené na molekulární metody) vyžaduje tyto náklady:

- Pro detekci *R. solani* je nezbytné pořízení speciálního přístroje – termocykleru pro real-time PCR (400–900 tis. Kč)
- Cena za extrakci DNA z jednoho vzorku půdy, myceliární kultury či rostlinného pletiva (referenční DNA) potřebné pro real-time PCR je 260 Kč (při doporučeném izolačním kitu).
- Vlastní náklady na detekci *R. solani* pomocí real-time PCR je 96 Kč (při doporučeném reakčním kitu).
- Cena jednoho kompletního testu (1 vzorek ve 3 technických opakováních; testovaný gen a referenční gen) se pohybuje kolem 360 Kč.

Ceny jsou kalkulovány na základě nejlevnější nabídky spotřebního materiálu, nezahrnují režie a jsou bez DPH. Metoda Sybr Green real-time PCR je v současnosti levnější z důvodu absence sondy, kterou vyžaduje TaqMan real-time PCR.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Ackermann, P., Talich, P., Řehák, V., Kocourek, F. (ed.). (2013). Metodická příručka integrované ochrany rostlin proti chorobám, škůdcům a plevelům. Praha: Česká společnost rostlinolékařská. ISBN 978-80-02-02480-4.
- Ajayi-Oyetundea, O.O., Bradley, C.A. (2018). *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population biology and management of rhizoctonia seedling disease of soybean. *Plant Pathology*, 67: 3–17. <https://doi.org/10.1111/ppa.12733>
- Anguiz, R., Martin, C. (1989). Anastomosis groups, pathogenicity and other characteristics of *Rhizoctonia solani* isolated from potato in Peru. *Plant Disease*, 73: 199–201.

- Balali, G.R., Neate, S.M., Scott, E.S., Whisson, D.L., Wicks, T.J. (1995). Anastomosis group and pathogenicity of isolates of *Rhizoctonia solani* from potato crops in south Australia. *Plant Pathology*, 44: 1050–1057.
- Cullen, D.W., Lees, A.K., Toth, I.K., Duncan, J.M. (2001). Conventional PCR and real-time quantitative PCR detection of *Helminthosporium solani* in soil and on potato tubers. *European Journal of Plant Pathology*, 107: 387–398. <https://doi.org/10.1023/A:1011247826231>
- Dubey, S.C., Tripathi, A., Upadhyay, B.K., Kumar, A. (2016). Development of conventional and real time PCR assay for detection and quantification of *Rhizoctonia solani* infecting pulse crops. *Biologia* 71: 133–138. <https://doi.org/10.1515/biolog-2016-0027>
- Lees, A.K., Cullen, D.W., Sullivan, L., Nicolson, M.J. (2002). Development of conventional and quantitative real-time PCR assays for the detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG-3 in potato and soil. *Plant Pathology*, 51: 293–302. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2002.00712.x>
- Lievens, B., Brouwer, M., Vanachter, A.C.R.C., Cammue, B.P.A., Thomma, B.P.H.J. (2006). Real-time PCR for detection and quantification of fungal and oomycete tomato pathogens in plant and soil samples. *Plant Science*, 175 (1): 155–175. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.03.009>
- Mičuda, S., Fuksa, L., Brčáková, E., Cermanová, J., Geršl, V. (2006). Molekulárně biologické metodiky ve farmakologii [online]. Ústav farmakologie, Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové, [cit. 18. dubna 2022].
- Okubara, P.A., Schroeder, K.L., Paulitz T.C. (2008). Identification and quantification of *Rhizoctonia solani* and *R. oryzae* using Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Phytopathology*, 98: 837–847. <https://doi.org/10.1094/PHTO-98-7-0837>
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9): e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Raclavský, V. (2003). Metody molekulární genetiky. [online]. [cit. 23. dubna. 2022]. Dostupné na <http://www.biologie.upol.cz/metody/>
- Rasmussen, R. (2001). Quantification on the LightCycler, s. 1–34. In: Meuer, S., Wittwer, C., Nakagawaran, K.I.: Rapid Cycle Real-Time PCR. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-59524-0_3
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J. (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17: 1105–1109, <https://doi.org/10.1007/BF00037152>
- Wallon, T., Sauvageau, A., Van der Heyden, H. (2020). Detection and quantification of *Rhizoctonia solani* and *Rhizoctonia solani* AG1-IB causing the bottom rot of lettuce in tissues and soils by multiplex qPCR. *Plants*, 10(1): 57. <https://doi.org/10.33804/pp.005.03.3925>
- Woodhall, J.W., Adams, I.P., Peters, J.C., Harper, G., Boonham, N. (2013). A new quantitative real-time PCR assay for *Rhizoctonia solani* AG3-PT and the detection of AGs of *Rhizoctonia solani* associated with potato in soil and tuber samples in Great Britain. *European Journal of Plant Pathology*, 136: 273–280. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0161-8>
- Žižka J. (2022). Situační a výhledová zpráva brambory. Ministerstvo zemědělství. s. 52. ISBN 978-80-7434-655-2.

7. SEZNAM VYBRANÝCH PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Kmoch, M., Holková, L., Pokorný, R., Cerkal, R. (2013). Identifikace a kvantifikace hub rodu *Fusarium* v obilkách kukuřice a ječmene pomocí metody založené na qPCR. Certifikovaná metodika. První vydání. Mendelova univerzita v Brně: Ediční středisko Mendelovy univerzity v Brně. 27 s. ISBN: 978-80-7375-909-4

Holková, L., Jílková, B., Víchová, J., Bačová N., Kmoch, M. (2023) Možnosti detekce a kvantifikace *Rhizoctonia solani* v půdě. *Úroda*, 12(LXX), vědecká příloha, 93–100. ISSN 0139-6013.

Název: Metodika kvantifikace houbového patogenu *Rhizoctonia solani* v půdě metodou Real-Time PCR

Autoři: Ludmila Holková, Barbora Jílková, Jana Víchová, Martin Kmoch

Vydavatel: Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

Vydání: první, 2023

Počet stran: 24 s.

ISBN 978-80-7509-947-1

<https://doi.org/10.11118/978-80-7509-947-1>

Tato publikace neprošla jazykovou úpravou.

Za věcnou a jazykovou správnost díla odpovídají autoři.

Metodika je poskytována bezplatně.