

*Realizační výstup výzkumného projektu č. TQ03000327 pod názvem:
„Detekce významných houbových patogenů kořene jetele lučního a jejich
korelace s obsahem mykotoxinů“*

*Financováno Technologickou agenturou ČR – Program Sigma na období 2024-
2025*

Řešitelské organizace:

Zemědělský výzkum, spol. s r. o. Troubsko
Mendelova univerzita v Brně

Schválená metodika

Metodika 66/2025

**Molekulární detekce a kvantifikace kořenových patogenů
Fusarium spp. (druhové komplexy FSAMSC, FSSC a FTSC)
jetele lučního (*Trifolium pratense* L.) pomocí qPCR**

Autorský kolektiv:

Mgr. Magdaléna Dybová; Ing. Mária Neoralová, Ph.D.;
Mgr. Markéta Michutová, Ph.D.; Ing. Oldřich Trněný, Ph.D.;
Ing. Nicole Frantová, Ph.D.; Bc. Antonín Drda; Ing. Jakub Prudil;
Mgr. Jana Staveníková; RNDr. Jan Nedělník, Ph.D.;
RNDr. Ludmila Holková, Ph.D.

Metodika byla schválena ÚKZÚZ

Zemědělský výzkum, spol. s r. o., 2025
Mendelova univerzita v Brně, 2025

ISBN 978-80-88000-49-5

1. vydání

Obsah

1. Cíl metodiky	4
2. Vlastní popis metodiky	5
2. 1. Úvod	5
2. 2. Princip použité diagnostické metody	8
2. 3. Stanovení množství vybraných druhových komplexů fuzárií ve vzorku kořene jetele lučního	9
2. 3. 1. Postup přípravy vzorku	9
2. 3. 2. Izolace DNA vzorku	10
2. 3. 3. Příprava kontrolních vzorků patogenů	11
2. 3. 4. Popis systému primerů a sond	14
2. 3. 5. Kvantifikace vybraných druhových komplexů fuzárií pomocí qPCR	16
2. 4. Vyhodnocení výsledků	18
2. 5. Příklad praktického využití	20
2. 5. 1. Příprava kalibračních křivek	21
2. 5. 2. Kvantifikace <i>in situ</i> vzorků a interpretace výsledků	24
3. Srovnání novosti postupů	31
4. Popis uplatnění schválené metodiky	31
5. Ekonomické aspekty	32
5. 1. Odhad nákladů v případě zavedení metodiky	32
5. 2. Odhad nákladů na provedení dle počtu vzorků	33
5. 3. Ekonomický přínos	34
6. Seznam použité literatury	35
7. Seznam publikací, které předcházely metodice	40
8. Oponenti	41
9. Dedikace	41

1. Cíl metodiky

Cílem této metodiky je vytvořit a zavést standardizovaný postup pro molekulární detekci vybraných houbových patogenů jetele lučního (*Trifolium pratense* L.), které způsobují krčkové a kořenové choroby spojené se sníženou perzistencí rostlin. Metodika je zaměřena na zavedení univerzálního protokolu umožňujícího paralelní detekci a kvantifikaci tří druhových komplexů fuzárií (*Fusarium tricinctum* species complex FTSC, *F. solani* species complex FSFC, *F. sambucinum* species complex FSAMSC) pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR).

Obsahem metodiky je podrobný popis celého procesu od odběru vzorků až po vyhodnocení výsledků. V první části jsou uvedena doporučení pro vzorkování kořenového materiálu z polních porostů jetele lučního, která zajišťují reprezentativnost vzorku. Následuje standardizovaný protokol izolace DNA z kořenů rostlin, který je optimalizován tak, aby byla dosažena dostatečná kvalita a kvantita nukleových kyselin potřebná pro následnou analýzu. Samotná qPCR reakce je provedena s využitím vnitřních sond systému TaqMan, jež zajišťují vysokou specifitu a citlivost detekce. Součástí metodiky jsou unikátní sekvence specifických primerů a sond navržených pro specifickou detekci ITS regionu vybraných druhových komplexů hub rodu *Fusarium*, které byly vybrány na základě analýz mykobiomu kořenů jetele lučního. V textu je popsán i způsob vyhodnocení a interpretace výsledků, včetně kritérií pro hodnocení pozitivních a negativních detekcí, doporučení pro interpretaci hraničních hodnot a kontrolních opatření. Metodika umožňuje cílenou detekci kořenových patogenů jetele lučního a představuje nástroj pro monitorování zdravotního stavu porostů i konkrétních genotypů jetele lučního. Je využitelná jak ve výzkumu, například při studiu interakcí mezi hostitelem a patogenem na úrovni genů, tak i v praxi, zejména ve šlechtitelských programech, kde umožňuje selekci genotypů s vyšší odolností vůči krčkovým a kořenovým mykózám.

2. Vlastní popis metodiky

2. 1. Úvod

Jetel luční (*Trifolium pratense* L.) je jednou z nejdůležitějších pícnin mírného klimatu, která se vyznačuje velmi dobrými krmivářskými parametry, zejména vysokým obsahem bílkovin. Má poměrně krátkou vytrvalost, 2 až 4 roky (Pelikán, Hýbl a kol., 2012), která je ovlivněna především zdravotním stavem. Na růst a vývoj rostlin jetele lučního negativně působí mnoho abiotických a biotických vlivů. Jedním z hlavních ivních biotických vlivů jsou krčkové a kořenové choroby, které narušují příjem vody a živin, což vede k odumírání a řidnutí porostu, a tudíž i ke ztrátě na výnosu zelené píce (Frey et al., 2022). Kořenová hniloba také snižuje nasazení květů a tím i produkci semen, a to u některých tetraploidních odrůd až o 50 % ve srovnání s diploidními (Jing a Boelt, 2021). Napadené rostliny mají navíc nižší odolnost vůči abiotickým vlivům, hůře přezimují a na jaře neobrustají (ÚKZÚZ, 2023). Hospodářsky nejvýznamnější půdní patogeny způsobující tato onemocnění jsou houby rodu *Fusarium*, *Pythium* a *Sclerotinia* (Strejčková a Nedělník, 2020). Jsou známy i další druhy hub, které napadají kořenový systém jetele např. houby z rodu *Didymella* (Barilli et al., 2016; Jambagi et al., 2023; Ghiat et al., 2025) nebo *Gibellulopsis* (dříve *Verticillium*; Milton a Isaac, 1976; Skipp a Christensen, 1990).

Nejčastějším patogenem způsobujícím krčkové a kořenové choroby jsou houby rodu *Fusarium*. Tyto vláknité houby mohou produkovat toxické sekundární metabolity, látky zvané mykotoxiny, které jsou nebezpečné jak pro dobytek, tak pro člověka. Mezi nejdůležitější mykotoxiny produkované druhy rodu *Fusarium* patří trichotecény a fumoniziny. Fumoniziny způsobují smrtelné nemoci hospodářských zvířat a jsou považovány za potenciálně karcinogenní mykotoxiny pro člověka. Trichotecény jsou silnými inhibitory syntézy bílkovin (Munkvold, 2016). Houby rodu *Fusarium* byly poprvé popsány J. H. F. Linkem v roce 1809 a dostaly svůj název podle tvaru nepohlavních spor (konidií), fusus. Dříve se určovaly jednotlivé druhy na základě morfologie kolonií a mikroskopických charakteristik, především podle barvy a tvarů kolonií, růstových vzorců, tvaru konidií a makrokonidií, které se však nemusí vždy vytvořit. Toto určení není úplně jednoznačné, často záleží nejen na subjektivním okometrickém hodnocení mykologa, ale i na prostředí, ve kterém houby rostou. S rozvojem metod molekulární biologie na konci 20. století, konkrétně metody PCR, se zrodily i nové možnosti rozlišování

jednotlivých druhů na základě genetických podkladů. Jedny z prvních prací, které určovaly fuzária pomocí PCR, byly Ouellet a Seifert, 1993; Hering a Nirenberg, 1995; a práce detekující fuzária v rostlinných pletivech byly Parry a Nicholson, 1996; Schilling et al., 1996.

Znalosti dědičné informace vedly ke změně zavedené taxonomie, jelikož bylo potvrzeno, že mnoho druhů bylo polyfyletických (nemajících společného předka). V současné době rozlišujeme 431 druhů a 3.558 neklasifikovaných izolátů a hybridů (dle taxonomických seznamů NCBI). Na základě fylogenomických a fylogenetických analýz řadíme tyto druhy celkem do 23 druhových komplexů (Armer et al., 2024; Geiser et al., 2021).

Nejvýznamnější patogenní druhy jetele lučního patří do těchto druhových komplexů:

FTSC	<i>Fusarium tricinatum</i> species complex
FSSC	<i>Fusarium solani</i> species complex
FSAMSC	<i>Fusarium sambucinum</i> species complex
FOSC	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex
FIESC	<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> species complex

Tato metodika je zaměřena na druhové komplexy FTSC, FSSC a FSAMSC.

***Fusarium tricinatum* species complex FTSC**

Jedná se o jeden z druhových komplexů způsobujících fuzáriové vadnutí klasů (FHB). V rámci komplexu druhů FTSC je *F. avenaceum* celosvětově nejdůležitějším druhem způsobujícím FHB, zatímco *F. acuminatum* se vyskytuje ojediněle (Aoki et al., 2014; Bottalico a Perrone, 2002). *F. avenaceum* je běžný rostlinný patogen napadající různé druhy rostlin po celém světě. U obilnin způsobuje hnilobu báze stébel a bělání klasů, což ovlivňuje výnos a kvalitu zrna (Vogelgsang et al., 2008). U leguminóz znehodnocuje semena (Żelechowski et al., 2019). Zástupci tohoto druhového komplexu produkují tak zvané „nové mykotoxiny“ – enniatiny, moniliformin a beauvericin (Beccari et al., 2019; Jestoi, 2008; Logrieco et al., 1998; Logrieco et al., 2002; Yli-Mattila et al., 2002).

FTSC je historicky významný původce FHB obilnin v severních oblastech (Yli-Mattila et al., 2010). Druhy FTSC byly běžné ve vzorcích ovsa a ječmene ze středního a severozápadního Ruska (Stakheev et al., 2016), v různých obilninách v Norsku (Kosiak et al., 2003), Finsku (Yli-Mattila et al., 2004) a Švédsku (Lindblad et al., 2013), ale také v ječmeni, v pšenici tvrdé a seté ve

Francii (Ioos et al., 2004), v jarní pšenici z Mexika (Cerón-Bustamante et al., 2018), v ovsu a ječmeni z jižní Afriky (Rabie et al., 1986) a v pšenici a ječmeni na Novém Zélandě (Cromey et al., 2001).

***Fusarium solani* species complex FSSC**

Zástupci této skupiny jsou patogenní nejen pro rostliny, ale také pro zvířata a lidi. Komplex zahrnuje početné *F. solani formae speciales* způsobující kořenovou hnilobu, hnilobu krčků nebo různé hniloby plodů např. fazolu, dýně, papriky, brambor, batát, moruší, hrachu. Běžným patogenem způsobující kořenové hniloby a napadající obilniny a luskoviny je *F. solani sensu lato* (Munkvold, 2016). *F. solani* napadá kořenová pletiva a způsobuje nekrózu a vaskulární dysfunkci. Jeho polygalakturonázové enzymy degradují pektin, což usnadňuje maceraci tkání. Polní průzkumy ukazují na synergické interakce s hádátky, které zhoršují ztráty výnosů ve špatně odvodněných půdách (Klimenko et al., 2010).

Rozmanité spektrum hostitelů existuje nejen v rámci celého komplexu těchto druhů, ale také v rámci druhu samotného. Na příklad izoláty FSSC 11 (*Nectria haematococca* MP VI; *F. solani* f. sp. *pisii*) jsou nejznámější tím, že způsobují kořenovou spálu hrachu setého (*Pisum sativum* L.). Mají ale různé oblasti výskytu, kde byla potvrzena jejich patogenita na nejméně 10 dalších hostitelských rostlinách (VanEtten, 1978). Tradičně se předpokládá, že *F. virguliforme* je patogenem sóji, avšak jeho hostitelské spektrum je rozmanitější, protože je schopné způsobit hnilobu kořenů na vojtěšce, fazolu, jeteli lučním i plazivém a hrachu (Kolander et al., 2012).

***Fusarium sambucinum* species complex FSAMSC**

FSAMSC patří k druhově nejbohatším komplexům v rámci rodu *Fusarium* (O'Donnell et al., 2015; Gräfenhan et al., 2016; Pereira et al., 2018; Sandoval-Denis et al., 2018). Do tohoto druhového komplexu patří i hlavní původci FHB, komplex *F. graminearum* a blízké příbuzné druhy (Graminearum Clade; FSAMSC-1 sensu; Kelly et al., 2016) vyvolávající rozsáhlé epidemie na obilninách po celém světě (O'Donnell et al., 2000; Goswami a Kistler, 2005; Kelly et al., 2015; Kelly et al., 2016). Následkem jsou ztráty v řádu miliard dolarů pro globální obilnářský průmysl kvůli snížení výnosů a kontaminaci mykotoxiny (Nganje et al., 2004).

Mnohé druhy v FSAMC produkují v rostlinných pletivech směs toxických sekundárních metabolitů, včetně trichotecénů, které patří mezi mykotoxiny s největším vlivem na bezpečnost potravin a lidské zdraví (Munkvold, 2016). Trichotecény jsou silnými inhibitory syntézy eukaryotických proteinů a mohou

způsobit neurologické, gastrointestinální, imunologické a jiné zdravotní problémy (Munkvold, 2016; Pestka, 2010). Produkce určitých trichotecénů v rostlinách zřejmě přispívá k patogenitě *Fusarium* na více plodinách, kde působí jako faktory virulence, které překonávají obranyschopnost rostlin a ulehčují kolonizaci hostitelských pletiv (Proctor a McCormick, 1995; Bai et al., 2002; Jansen et al., 2005).

2. 2. Princip použité diagnostické metody

V současné době představuje kvantitativní PCR (qPCR) standardní metodu pro detekci rostlinných patogenů, včetně hub. Tato technika je založena na amplifikaci specifických úseků DNA, které jsou charakteristické pro cílový organismus, a umožňuje tak jeho spolehlivou identifikaci. Hlavní předností qPCR je vysoká citlivost a specificita, které dovolují detekovat i velmi nízké množství patogenu v rostlinných pletivech či v půdních vzorcích. Další výhodou je rychlost analýzy a možnost kvantifikace cílové DNA, což poskytuje nejen kvalitativní údaj o přítomnosti patogenu, ale i kvantitativní informaci o úrovni infekce. Většina aplikací je zaměřena na druhové rozlišení v rámci jednoho rodu, přičemž klíčovou roli hraje návrh vysoce specifických primerů a sond minimalizujících riziko zkřížené amplifikace.

Mezi jedny z nejčastěji využívaných systémů qPCR patří systém detekce a kvantifikace s využitím TaqMan sond, které představují hydrolyzační sondy značené fluorescenčním barvivem na 5' konci a zhášečem na 3' konci. Tyto sondy se během qPCR specificky vážou na cílovou sekvenci mezi primery. Při elongaci DNA vlákna jsou degradovány Taq DNA polymerázou prostřednictvím její 5' exonukleázové aktivity, čímž dojde k oddělení reportérového barviva od zhášeče a k nárůstu fluorescence. Intenzita fluorescence je přímo úměrná množství amplifikovaného produktu a umožňuje sledování reakce v reálném čase. Výsledkem je vysoká citlivost a specificita, neboť detekce vyžaduje komplementaritu jak primerů, tak sondy s cílovou DNA.

TaqMan qPCR metody se úspěšně využívají pro detekci širokého spektra patogenů. Například pro identifikaci *Fusarium* spp. v rajčatech byla vyvinuta vysoce specifická metoda založená na cílení ITS regionu ribosomální RNA s limitem detekce 3,05 pg DNA (Campos et al., 2023). Právě ITS region patří k nejčastěji využívaným markerům pro detekci a identifikaci hub, neboť je dostatečně konzervovaný v rámci vyšších taxonomických úrovní, ale zároveň vykazuje mezi druhy variabilitu umožňující návrh specifických primerů a sond.

Kvantitativní přístup qPCR umožňuje kromě relativní také absolutní kvantifikaci (Kralik a Ricchi, 2017). Zatímco relativní kvantifikace porovnává množství cílové DNA mezi vzorky, absolutní kvantifikace stanovuje skutečné množství cílové sekvence na základě kalibrační křivky vytvořené ze sériového ředění standardů o známé koncentraci. Tyto standardy jsou zpravidla připraveny z DNA ověřených izolátů cílových patogenů. Absolutní kvantifikace tak poskytuje robustní nástroj pro přesné stanovení množství patogenu nejen v rostlinných a půdních vzorcích a umožňuje porovnání mezi experimenty i laboratořemi.

Stanovení množství cílové DNA pomocí qPCR je možné buď relativní, nebo absolutní formou (Kralik and Ricchi, 2017). Relativní kvantifikace vyjadřuje změny množství cílové DNA ve srovnání s referenční sekvencí a vnitřním kalibrátorem a je vhodná zejména pro porovnání vzorků v rámci jednoho experimentu. Absolutní kvantifikace stanovuje skutečné množství cílové sekvence na základě kalibrační křivky. Výsledky jsou vyjádřeny jako množství DNA na jednotku objemu či hmotnosti vzorku. Relativní kvantifikace umožňuje srovnání vzorků v rámci jedné laboratoře prostřednictvím vnitřního kalibrátoru, zatímco absolutní kvantifikace, založená na standardech o známé koncentraci, umožňuje přímé porovnání výsledků mezi různými sériemi měření i mezi laboratořemi.

2. 3. Stanovení množství vybraných druhových komplexů fuzárií ve vzorku kořene jetele lučního

2. 3. 1. Postup přípravy vzorku

Potřebné chemikálie a materiál

- vychlazená (4 °C) sterilní destilovaná voda
- 15ml zkumavky

Potřebné přístroje

- vortex (VELP Scientifica)
- centrifuga na 15ml zkumavky (Janetzki)

Vlastní příprava vzorku

- Vyrýt rostliny, otřepat přebytečnou zeminu, aby na kořenech zůstala pouze rhizosféra, odstranit prýt a kořenový systém s krčkem vložit do odběrového

sáčku.

- Převážet v chladicím boxu, po příjezdu do laboratoře vzorky ihned zpracovat, nebo uskladnit při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- V laboratoři kořen podélně rozříznout, z jedné poloviny radiálními řezy nařezat segmenty o velikosti 0,5-1 cm.
- Segmenty vložit do sterilní 15ml kónické zkumavky, zalít vychlazenou sterilní destilovanou vodou, uzavřené vortexovat 10 s na nejvyšší rychlost a poté centrifugovat 10 minut při 6000 otáčkách/min.
- Zkumavky doplnit vychlazenou sterilní destilovanou vodou do plna a uzavřené centrifugovat za stejných podmínek.
- Vyjmout segmenty kořenů ze zkumavky a centrifugovat roztok 15 min při 6000 ot./min.
- Ze zkumavek vylít supernatant a pelet uchovávat při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do izolace DNA.

2. 3. 2. Izolace DNA vzorku

Potřebné chemikálie a materiál

- QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit (Qiagen) – obsahuje dostatek všech chemikálií, zkumavek a kolon
- 96% etanol na zředění chemikálií z kitu

Potřebné přístroje

- vortex (VELP Scientifica).
- homogenizátor (dle zvyklostí laboratoře), např. Minilys (Bertin Technologies) centrifuga s rotorem pro 2ml zkumavky
- nástroj pro měření koncentrace DNA, např. spektrofotometr NanoReady Touch F-2100 (Life Real)

Vlastní izolace DNA kitem QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit

1. Krátké stočení zkumavky PowerBead Pro, aby se kuličky usadily na dně. Přidat 250 mg peletu a 800 μl roztoku CD1. Krátce promíchat.
2. Homogenizace – vortexovat ve vodorovné poloze při maximální rychlosti 10 min nebo pomocí homogenizátoru (nejvyšší rychlost, 45 s, v případě potřeby déle).
3. Centrifugovat zkumavky PowerBead Pro při 15.000 x g 1 min.
4. Supernatant (500-600 μl) přenést do čisté 2ml mikrocentrifugační

zkumavky.

5. Přidat 200 μ l roztoku CD2 a 5 s vortexovat.
6. Centrifugovat při 15.000 x g 1 min. Přenést přibližně 700 μ l supernatantu (vyhnout se peletu) do čisté 2ml mikrocentrifugační zkumavky.
7. Přidat 600 μ l roztoku CD3 a 5 s vortexovat.
8. Přenést 650 μ l lyzátu na MB Spin Column a centrifugovat při 15.000 x g 1 min.
9. Vylít tekutinu a zopakovat krok 8, aby přes MB Spin Column byl přefiltrován celý objem lyzátu. V případě výskytu lyzátu v koloně opakovat centrifugaci.
10. Opatrně umístit MB Spin Column do čisté 2ml sběrné zkumavky (Collection Column).
11. Přidat 500 μ l roztoku EA na kolonku MB Spin Column. Centrifugovat při 15.000 x g 1 min.
12. Vylít protečený roztok a vložit MB Spin Column zpátky do stejné 2ml sběrné zkumavky.
13. Přidat 500 μ l roztoku C5 do MB Spin Column. Centrifugovat při 15.000 x g 1 min.
14. Vylít přefiltrovaný roztok a umístit MB Spin Column do nové 2ml sběrné zkumavky (DNA je zachycena na koloně MB Spin Column).
15. Centrifugovat při 16.000 x g 2 min.
16. Opatrně umístit MB Spin Column do nové 1,5ml zkumavky.
17. Přidat 50-100 μ l roztoku C6 do středu bílé filtrační kolonky (na objemu přidaného roztoku C6 závisí koncentrace DNA ve výsledném roztoku).
18. Centrifugovat při 15.000 x g 1 min. Odstranit MB Spin Column. DNA je v přefiltrovaném roztoku a je připravena na následné aplikace.
19. Změřit koncentraci vyizolované DNA např. pomocí spektrofotometru.

Poznámka: Je doporučeno uchovávat DNA zmraženou, protože roztok C6 neobsahuje EDTA.

2. 3. 3. Příprava kontrolních vzorků patogenů

K získání standardů pro pozitivní kontroly, křížové reakce, vnitřní kalibrátory a pro vytvoření kalibračních křivek k absolutní kvantifikaci jednotlivých patogenních hub byla izolována DNA z mycelia izolátů hub ze sbírek Národního centra zemědělského a potravinářského výzkumu, v.v.i., z České sbírky mikroorganismů (CCM; Masarykova univerzita, Brno), ze Sbírek kultur hub (CCF; Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha) a ze Sbírek mlékárenských a pekárenských kontaminantů (CCDBC, Praha). Jako pozitivní kontroly byli vybráni dostupní reprezentanti druhových komplexů rodu *Fusarium*, kteří nejlépe odpovídali druhovému určení na základě podobnosti ITS sekvence s databází FUSARIOID-ID (Crous et al., 2021), a další významní zástupci patogenních rodů.

Potřebné chemikálie a materiál

- Petriho misky (90 mm)
- živné médium (Potato Dextrose Agar)
- sterilní destilovaná voda

Potřebné přístroje

- flowbox – sterilní očkovací box (Faster Two 30)
- autokláv (Tuttnauer 2540 M)
- plynový kahan

Izoláty byly kultivovány na Petriho miskách na bramborovo-dextrózovém agaru 10 až 14 dní v kultivační místnosti při 24 °C za tmy. Seznam použitých izolátů je uveden v Tabulce 1.

Postup izolace DNA z mycelia hub pomocí QIAamp® PowerFecal® Kit (Qiagen) je stejný jako izolace DNA ze vzorků kořenů – viz kapitola 2.3.2. Izolace DNA vzorku s využitím vstupního materiálu v podobě homogenizovaného mycelia jednotlivých izolátů. Vyizolovaná DNA patogenů se pro další použití ředí na koncentraci 5 ng/μl.

Tabulka 1: Seznam izolátů patogenních hub použitých při optimalizaci detekčních systémů. FTSC – *Fusarium tricinctum* species complex; FCSC – *F. chlamyosporum* species complex; FSAMSC – *F. sambucinum* species complex; FIESC – *F. incarnatum-equiseti* species complex; FOOSC – *F. oxysporum* species complex; FSSC – *F. solani* species complex.

název	sbírka	číslo	druhový komplex
<i>Didymella glomerata</i> (Corda) Qian Chen & L. Cai	CCF	6140	-
<i>Didymella protuberans</i> (Lev.) Qian Chen & L. Cai	CCDBC	324	-
<i>Fusarium avenaceum</i> (Corda : Fries) Saccardo	CCM	8015	FTSC
<i>Fusarium chlamyosporum</i> Wollenweber et Reinking	CCM	F-166	FCSC
<i>Fusarium culmorum</i> (W. G. Smith) Saccardo	CCM	F-163	FSAMSC
<i>Fusarium equiseti</i> (Corda) Saccardo	CCM	F-800	FIESC
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlechtendahl : Fries	CCM	F-485	FOOSC
<i>Fusarium solani</i> (Martius) Saccardo	CCM	8014	FSSC
<i>Rhizoctonia solani</i> J. G. Kühn	CCM	F-1	-
<i>Verticillium nigrescens</i> Pethybridge	CCM	F-702	-

2. 3. 4. Popis systému primerů a sond

Při vývoji detekčního systému byly sekvence ITS regionů získány amplikonovým sekvenováním mikrobiomu rhizosféry a kořenů rostlin jetele lučního odebraných v polních podmínkách. Kontigy získaných ITS sekvencí pro jednotlivé druhové komplexy rodu *Fusarium* i pro jetele luční byly manuálně zpracovány v programu Geneious Prime 2023.2.1, kde byly navrženy specifické primerové páry a TaqMan hydrolyzační sondy pro každý vybraný druhový komplex fuzárií a jetele luční (Tabulka 2).

Součástí validace primerů a sond je ověření jejich specifity pomocí křížové reakce. Tento postup umožňuje zjistit, zda daná sonda reaguje pouze s cílovým patogenem, nebo zda může docházet k nespecifické amplifikaci u necílových organismů. Křížová reakce je tedy nezbytným krokem pro zajištění spolehlivosti detekční metody, zejména při práci se vzorky z komplexních biologických matric.

V rámci vývoje systému primerů a sond byla každá sada testována na panelu 10 různých patogenů (pozitivní kontrola; Tabulka 1) a na hostitelské

rostlině jeteli lučním (Tp) sloužící jako negativní kontrola. Součástí testování byly rovněž dvě negativní technické kontroly (NTC).

Výsledky byly vyhodnoceny na základě Ct hodnot (cycle threshold). Hodnoty Ct do 30 byly považovány za pozitivní detekci a svědčí o přítomnosti cílové DNA. Hodnoty nad 30, hodnoty odpovídající úrovni hodnot NTC, nebo reakce s nezaznamenanou Ct hodnotou, byly hodnoceny jako negativní výsledek detekce, tedy bez průkazu cílové DNA.

Testování detekce primerů a sondy pro FTSC prokázalo jejich specificitu, neboť testovaný cílový patogen – *F. avenaceum* (8015) – vykázal pozitivní výsledek reakce (Ct = 25,42). Všechny ostatní testované organismy, hostitelská rostlina i obě NTC byly negativní.

Testování detekce primerů a sondy pro FSSC prokázalo jejich specificitu, neboť pro testovaný cílový patogen – *F. solani* (8014) – byla zjištěna Ct hodnota v intervalu stanoveném pro pozitivní detekci (Ct = 24,44). U všech ostatních testovaných vzorků (negativní kontrola, pozitivní kontroly a obě NTC) nebyly zaznamenány žádné Ct hodnoty, tedy detekce byly negativní. Absence amplifikace u negativních kontrol vylučuje kontaminaci reakcí.

Testování detekce primerů a sondy pro FSAMSC prokázalo jejich specificitu, neboť testovaný cílový patogen – *F. culmorum* (F-163) – vykázal pozitivní výsledek reakce (Ct = 26,03) a všechny ostatní testované organismy, hostitelská rostlina i obě NTC byly negativní.

Testování detekce primerů a sondy pro Tp prokázalo jejich specificitu, neboť testovaná cílová hostitelská rostlina – jetel luční – vykázala pozitivní výsledek reakce (Ct = 23,59). Všechny ostatní testované organismy i obě NTC byly negativní.

Tabulka 2: Sekvence oligonukleotidů a velikosti PCR produktů pro detekci vybraných druhových komplexů fuzárií a jetele lučního.

patogen / cíl	typ	velikost produktu [bp]	T _m [°C]	sekvence (5'–3')	reportérové barvivo / zhášec
Tp ITS oblast jetele lučního	sonda		59,9	CCT GGG CGT CAC ATA TCG AA	FAM / ZEN + Iowa Black FQ
	forward primer	111	60,0	GTT GCG CCT GAT GCC ATT AG	
	reverse primer		60,1	CGG GAG GCC AAC ATC ATC TT	
FTSC <i>Fusarium tricinatum</i> species complex	sonda		59,3	CCC GAA ATA CAT TGG CGG TC	Cy5.5 / Black Hole Quencher-3
	forward primer	112	60,3	ATT TCA ACC CTC AAG CCC CC	
	reverse primer		59,9	AGC TAC TAC GCA ATG GAG GC	
FSSC <i>Fusarium solani</i> species complex	sonda		60,0	CCG TCC CCC AAA TGC AGT	Cy5 / TAO + Iowa Black RQ
	forward primer	116	60,4	CAT TAC AAC CCT CAG GCC CC	
	reverse primer		60,0	GCT ACT ACG CGA TGG AAG CT	
FSAMSC <i>Fusarium sambucinum</i> species complex	sonda		60,0	CCT GCT GCA CTC CCC AAA TA	ROX / Iowa Black RQ
	forward primer	103	59,5	GCC TGT TCG AGC GTC ATT TC	
	reverse primer		59,9	TAT GGA AGC TCG ACG TGA CC	

2. 3. 5. Kvantifikace vybraných druhových komplexů fuzárií pomocí qPCR

Pro sjednocení počáteční koncentrace všech vzorků je koncentrace DNA ředěna na 20 ng/μl. Tato ředění jsou používána jako templát v qPCR reakci. Do reakční směsi jsou zahrnuty specifické primery a sondy pro cílový fragment patogenu a paralelně také pro fragment hostitele. Amplifikace probíhá v programu s předepsaným počtem cyklů a fluorescenční signály odpovídající jednotlivým fragmentům se zaznamenávají v reálném čase. Pro vysokou robustnost je vhodné každý vzorek amplifikovat ve třech technických opakováních.

Kvantitativní PCR reakce byly optimalizovány pro přístroj Rotor Gene Q (Qiagen) za použití LightCycler® Multiplex DNA Master (Roche). V jednotlivých reakcích byly použity prime-probe mixy (příprava níže): jeden pro detekci DNA hostitelské rostliny jetele lučního a tři prime-probe mixy specifické pro detekci tří vybraných druhových komplexů rodu *Fusarium*: FTSC, FSSC a FSAMSC. Tyto tři primer-probe mixy byly použity vždy separátně v duplex reakci qPCR k rostlinné DNA hostitele.

Součástí každé qPCR analýzy byly rovněž kontrolní vzorky – NTC bez templátu pro vyloučení kontaminace, pozitivní kontrola s DNA známého patogenu a negativní kontrola s DNA hostitele.

Příprava 10× primer–probe mixu

Pro každý primer-probe mix byl připraven samostatný 10× mix o celkovém objemu 100 μl.

Do mikrokumavky bylo napipetováno:

- 2,5 μl forward primeru,
- 2,5 μl reverse primeru,
- 1,0 μl sondy (ze zásobních roztoků o koncentraci 100 μM),
- 94,0 μl PCR-grade vody.

Připravený mix byl jemně promíchán, alikvotní objemy byly uskladněny při –20 °C.

Příprava qPCR reakce

Reakční směs pro jednu qPCR reakci o celkovém objemu 20 µl byla připravena následovně:

- 4,0 µl LightCycler® Multiplex DNA Master (5×),
- 2,0 µl 10× primer–probe mix pro hostitele,
- 2,0 µl 10× primer–probe mixu pro patogen,
- 1,0 µl templátové DNA,
- 11,0 µl PCR-grade vody.

Nastavení qPCR programu

qPCR byla provedena na přístroji RotorGene Q podle následujícího cyklování. Snímání fluorescenčního signálu ve všech kanálech sond proběhlo na konci každého cyklu.

počáteční denaturace:

- 95 °C po dobu 10 minut

40 cyklů:

- denaturace: 95 °C, 10 s
- annealing a amplifikace:
- touchdown 10 cyklů: 63 → 58 °C, 30 s; teplota se snižovala o 0,5 °C v každém cyklu;
- 30 cyklů: 58 °C, 30 s

2. 4. Vyhodnocení výsledků

Stanovení Ct

Prahové cykly (Ct) byly určeny softwarem Rotor-Gene Q (Qiagen) prostřednictvím funkce Auto-Find Threshold. Tento algoritmus automaticky stanovuje prahovou linii ve fázi exponenciální amplifikace na základě optimalizace korelace se standardní křivkou. Před samotným výpočtem byla provedena normalizace signálu a odečtení základní linie (baseline) s využitím dynamické korekce fluorescence pro jednotlivé reakce. Výsledná Ct hodnota každého vzorku odpovídá cyklu, v němž amplifikační křivka poprvé dosáhla stanoveného prahu.

Vyhodnocení detekce:

- Ct hodnoty do 30: pozitivní detekce, svědčí o přítomnosti cílové DNA;
- Ct hodnoty nad 30: negativní detekce, bez průkazu cílové DNA;
- Ct hodnoty odpovídající úrovni hodnot NTC: negativní detekce, bez průkazu cílové DNA;
- reakce s nezaznamenanou Ct hodnotou: negativní detekce, bez průkazu cílové DNA.

Příprava a hodnocení výsledků kalibračních křivek

Pro účely absolutní kvantifikace cílové DNA pomocí qPCR je nutné připravit kalibrační křivky pro jednotlivé amplifikované fragmenty (FTSC, FSSC, FSAMSC, Tp). Z DNA z čistých kultur vybraných patogenů a zdravé hostitelské rostliny je třeba provést qPCR pro desítkové ředění v krocích pokrývajících minimálně čtyři řády koncentrace.

- Naměřené hodnoty Ct vynést proti logaritmu výchozí koncentrace DNA.
- Metodou lineární regrese vytvořit rovnici kalibrační křivky. Z rovnice kalibrační křivky pro každý patogen odvodit jak směrnici kalibrační křivky (m), tak konstantu (b).

$$y = mx + b$$

(y): Ct; kvantifikační cyklus qPCR reakce (cycle threshold)

(x): log₁₀ koncentrace DNA patogenu

(m): směrnice kalibrační křivky

(b): konstanta; hodnota Ct při teoretické koncentraci $c = 0$

- Pro zajištění spolehlivosti a reprodukovatelnosti hodnotit kalibrační křivky na základě koeficientu determinace (R^2) a akceptovat hodnotu vyšší než 0,97. Do kvantifikace množství DNA patogenu ve zkoumaných vzorcích byly zahrnuty pouze reakce s účinností amplifikace vyšší než 80 %.

Kvantifikace patogenu

Pro kvantifikaci sledovaného patogenu lze využít jak přístup relativní normalizované kvantifikace, tak i absolutní kvantifikace prostřednictvím kalibrační křivky.

Relativní normalizovaná kvantifikace vychází z porovnání intenzity fluorescenčního signálu naměřeného u testovaného vzorku s intenzitou signálu známého vnitřního kalibrátoru. Hodnota signálu tohoto vnitřního kalibrátoru je stanovena jako 1 nebo 100 %, zatímco signál v testovaných vzorcích je vyjádřen buď jako podíl, nebo v procentech vůči tomuto kalibrátoru. Při stanovení množství patogenů je vnitřním kalibrátorem pro Ct hodnoty patogenu obvykle vzorek pocházející z čisté myceliární kultury a pro Ct hodnoty hostitele DNA izolovaná z nenakažené rostliny. Vnitřní kalibrátor zajišťuje srovnatelnost výsledků získaných v různých reakcích. Při relativní normalizované kvantifikaci se hodnoty Ct sledované DNA sekvence patogenu, upravené podle vnitřního kalibrátoru patogenu, porovnávají s hodnotami Ct hostitelských DNA sekvencí, rovněž upravenými podle vnitřního kalibrátoru hostitele. Výsledné hodnoty jsou následně korigovány na efektivitu amplifikace podle Pfaffl (2001), což umožňuje přesnější odhad relativního množství cílové DNA při zohlednění rozdílů v účinnosti qPCR reakcí. Účinnost reakce je určena ze směrnice aktuální kalibrační křivky, která je součástí každé série měření a hodnoty vnitřních kalibrátorů jsou převzaty z výsledků vybraných vzorků kalibrační křivky.

Účinnost qPCR reakcí (E) byla odvozena z kalibrační křivky dle Rasmussen (2001).

$$E = 10^{\frac{1}{|m|}}$$

Stanovit normalizovanou relativní kvantifikaci (RE) patogenu na základě hodnot ΔCt (tj. rozdílu mezi Ct vnitřních kalibrátorů a Ct cílené sekvence ITS patogenu nebo hostitele) a následně vypočítat dle příslušného vztahu s korekcí na účinnost reakcí (Pfaffl, 2001).

$$\Delta Ct_{\text{patogen}} = Ct_{\text{vnitřní kalibrátor patogen}} - Ct_{\text{vzorek patogen}}$$

$$\Delta Ct_{\text{hostitel}} = Ct_{\text{vnitřní kalibrátor hostitel}} - Ct_{\text{vzorek hostitel}}$$

$$RE = \frac{(E_{\text{patogen}})^{\Delta C_{t_{\text{patogen}}}}}{(E_{\text{hostitel}})^{\Delta C_{t_{\text{hostitel}}}}}$$

Na základě dosazení hodnot Ct jednotlivých vzorků do rovnice kalibrační křivky připravené ze série ředění DNA čisté kultury patogenu jsme získali absolutní množství DNA patogenu ve vzorcích. Reakce na DNA hostitele v tomto případě slouží jako interní kontrola přítomnosti rostlinného materiálu, správnosti izolace DNA a účinnosti amplifikace. Takto provedená absolutní kvantifikace potvrzuje přítomnost sledovaného patogenu a zároveň vyjadřuje jeho zastoupení v hodnocených vzorcích.

- Naměřené hodnoty Ct pozitivní detekce patogenu dosadit do připravené rovnice kalibrační křivky založené na logaritmu výchozí koncentrace DNA standardů z čistých kultur patogenu. Na jejich základě vypočítat absolutní množství cílové DNA v celkovém množství DNA vzorku použitým v reakci. Výsledné hodnoty převést na jednotky ng DNA patogenu / μ g celkové DNA.
- Klasifikace infekce:
 - * hodnoty >1 ng/ μ g celkové DNA: silná infekce,
 - * hodnoty v rozmezí 0,1–0,5 ng/ μ g celkové DNA: střední infekce,
 - * hodnoty $<0,1$ ng/ μ g celkové DNA: slabá infekce.

2. 5. Příklad praktického využití

Stanovení vybraných druhových komplexů bylo provedeno na 10 vzorcích ze 7 polních lokalit.

Odběr vzorků a izolace DNA

Vzorky byly odebrány a zpracovány dle postupu popsaného v podkapitolách 2.3.1. Postup vzorkování a 2.3.2. Izolace DNA vzorku. Dle stejného postupu byla vyizolovaná DNA patogenů a hostitele.

Kontrola kvality a ředění

Kvalita vstupního genetického materiálu byla nejprve ověřena měřením koncentrace a čistoty pomocí spektrofotometru NanoReady Touch F-2100. Pro další analýzu byly akceptovány pouze vzorky splňující standardní kritéria integrity a poměru A260/A280 v rozmezí 1,8–2,0. Před vlastní amplifikací byly všechny vzorky normalizovány na jednotnou koncentraci, aby bylo zajištěno

srovnatelné množství templátu napříč reakcemi. Jako cílová koncentrace pro vzorky z polních podmínek byla zvolena hodnota 20 ng/μl a pro standardy hodnota 5 ng/μl.

Příprava reakcí

Byly připraveny čtyři prime-probe mixy a standardní řady desítkových ředění (100 až 10⁻⁴; k přípravě kalibračních křivek, viz níže) pro každý sledovaný druhový komplex a pro hostitele. qPCR reakce byly připraveny podle podkapitoly 2.3.5. Kvantifikace vybraných druhových komplexů fuzárií pomocí qPCR. Standardní řady, sloužící jako pozitivní a negativní kontroly, a NTC byly provedeny v jednom technickém opakování, zatímco polní vzorky byly připraveny v triplikátech. Vzhledem k většímu počtu potřebných jamek, než je kapacita qPCR cykleru, byly reakce spuštěny ve 3 běžích přístroje jednotlivě pro každý druhový komplex (3 × 42 jamek).

2. 5. 1. Příprava kalibračních křivek

Pro kvantitativní vyhodnocení byly připraveny kalibrační křivky. Výchozí standard (připravený dle kapitoly 2.3.3. Příprava kontrolních vzorků patogenů) o koncentraci 5 ng/μl byl postupně ředěn metodou sériového desítkového ředění až do hodnoty 5×10⁻⁴ ng/μl.

Pro qPCR byly pro každého vybraného zástupce z cílových druhových komplexů fuzárií připraveny standardní řady desítkových ředění DNA v rozsahu od 5 ng/μl do 5×10⁻⁴ ng/μl. Každé ředění bylo amplifikováno pomocí RotorGene Q a výsledky byly vyhodnoceny na základě Ct hodnot (FTSC Tabulka 3; FSSC Tabulka 4; FSAMSC Tabulka 5).

Pro každou standardní řadu byla vytvořena kalibrační křivka vztahující Ct hodnoty k logaritmu počáteční koncentrace DNA. Do grafů nebyla zahrnuta ředění s Ct hodnotami odpovídajícími negativní kontrole, aby nedocházelo ke zkreslení průběhu křivek.

Kalibrační křivky (FTSC Obrázek 1; FSSC Obrázek 2; FSAMSC Obrázek 3) byly vyhodnoceny lineární regresí a z každé křivky byly stanoveny následující parametry, kde c je koncentrace DNA:

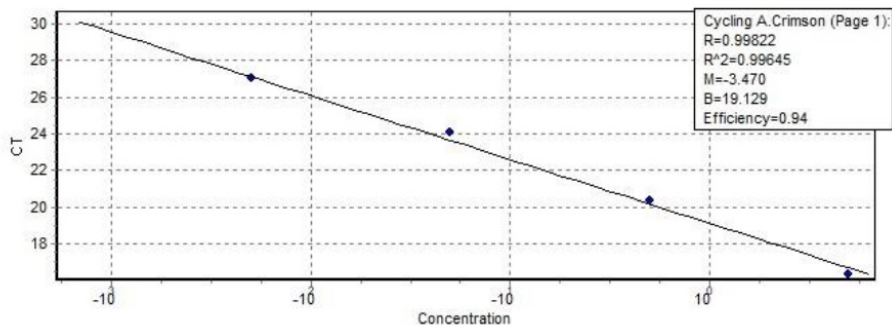
***Fusarium avenaceum* (8015):**

- * rovnice kalibrační křivky: $Ct = -3,470 \times \log(c) + 19,129$
- * efektivita qPCR reakce: $E = 94 \%$
- * koeficient determinace kalibrační křivky: $R^2 = 0,996$

Tabulka 3: Výsledky repetitivních hodnot Ct a koncentrace testovaných vzorků standardu sondy pro ITS oblast druhového komplexu FTSC. F. ave 8015 – *Fusarium avenaceum*, sbírkové číslo 8015.

vzorek	koncentrace DNA [ng/μl]	Ct
F. ave 8015	5	16,35
F. ave 8015 1:10	0,5	20,37
F. ave 8015 1:100	0,05	24,11
F. ave 8015 1:1000	0,005	27,02
F. ave 8015 1:10000	0,0005	30,38

Obrázek 1: Kalibrační křivka vytvořena na základě měření standardu *F. avenaceum* (8015) a jeho 4 ředění za použití primerů a sondy pro ITS oblast druhového komplexu FTSC.



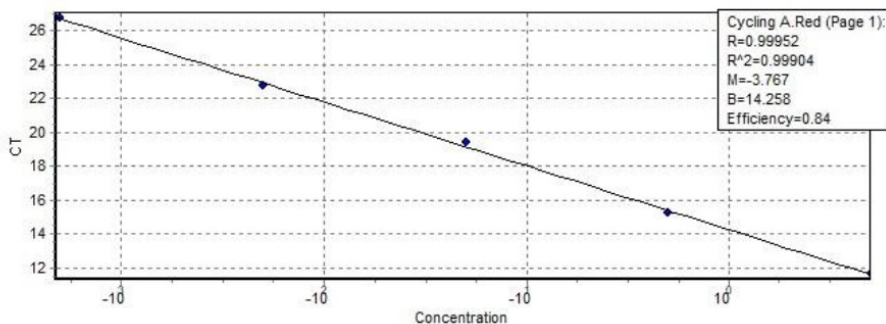
***Fusarium solani* (8014):**

- * rovnice kalibrační křivky: $Ct = -3,767 \times \log(c) + 14,258$
- * efektivita qPCR reakce: $E = 84 \%$
- * koeficient determinace kalibrační křivky: $R^2 = 0,999$

Tabulka 4: Výsledky repetitivních hodnot Ct a koncentrace testovaných vzorků standardu sondy pro ITS oblast druhového komplexu FSSC. F. sol 8014 – *Fusarium solani*, sbírkové číslo 8014.

vzorek	koncentrace DNA [ng/μl]	Ct
F. sol 8014	5	11,67
F. sol 8014 1:10	0,5	15,22
F. sol 8014 1:100	0,05	19,42
F. sol 8014 1:1000	0,005	22,74
F. sol 8014 1:10000	0,0005	26,75

Obrázek 2: Kalibrační křivka vytvořena na základě měření standardu *F. solani* (8014) a jeho 4 ředění za použití sondy pro ITS oblast druhového komplexu FSSC.



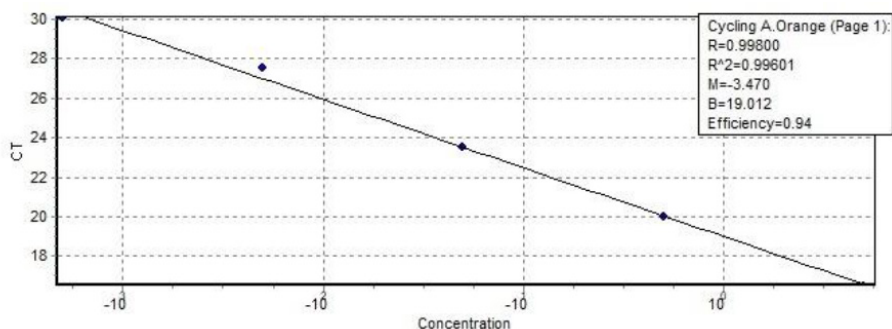
Fusarium culmorum (F-163):

- * rovnice kalibrační křivky: $Ct = -3,470 \times \log(c) + 19,012$
- * efektivita qPCR reakce: $E = 94 \%$
- * koeficient determinace kalibrační křivky: $R^2 = 0,996$

Tabulka 5: Výsledky repetitivních hodnot Ct a koncentrace testovaných vzorků standardu sondy pro ITS oblast druhového komplexu FSAMSC. *F. cul* F-163 – *Fusarium culmorum*, sbírkové číslo F-163.

vzorek	koncentrace DNA [ng/μl]	Ct
F. cul F-163	5	16,48
F. cul F-163 1:10	0,5	20,01
F. cul F-163 1:100	0,05	23,53
F. cul F-163 1:1000	0,005	27,55
F. cul F-163 1:10000	0,0005	30,06

Obrázek 3: Kalibrační křivka vytvořena na základě měření standardu *F. culmorum* (F-163) a jeho 4 ředění za použití sondy pro ITS oblast druhového komplexu FSAMSC.



Referenční cíl ITS oblasti jetele lučního byl vyhodnocen analogicky, s vysokou spolehlivostí křivky ($R^2 > 0,98$) a efektivitou v doporučeném rozmezí.

2. 5. 2. Kvantifikace *in situ* vzorků a interpretace výsledků

Do analýzy bylo zařazeno 10 vzorků jetele lučního nasbíraných na 7 lokalitách (pole v katastrálním území obcí: Hladké Životice, Kochánov, Letohrad, Mistrovice, Pustina, Rohy a Rozsochy).

Sběr vzorků, izolace, kontrola a příprava DNA a samotná qPCR reakce byla provedena dle návodu v kapitole 2.3. Stanovení množství vybraných druhových komplexů fuzárií ve vzorku kořene jetele lučního.

Úroveň infekce rostlin jetele lučního způsobena vybranými druhovými komplexy rodu *Fusarium* (FTSC, FSSC a FSAMSC) byla stanovena metodou relativní normalizované kvantifikace a k absolutní kvantifikaci patogenů byla využita lineární regrese dle příslušných rovnic uvedených v kapitole 2.4. Vyhodnocení výsledků (Tabulka 6, 7 a 8).

Výsledky analyzovaných vzorků byly vyhodnoceny na základě Ct hodnot. Průměrné hodnoty Ct do 30 u detekce patogenů byly považovány za pozitivní detekci. Hodnoty nad 30 nebo reakce s nezaznamenanou Ct hodnotou byly hodnoceny jako negativní detekce, bez průkazné přítomnosti patogenů ve vzorcích.

Pro detekci FTSC byla hodnota směrnice kalibrační křivky (m) stanovena na -3,843 a hodnota Ct při teoretické koncentraci $c = 0$ na 17,374 (Tabulka 6).

Pro detekci FSSC byla hodnota směrnice kalibrační křivky (m) stanovena na -5,474 a hodnota Ct při teoretické koncentraci $c = 0$ na 15,256 (Tabulka 7).

Pro detekci FSAMSC byla hodnota směrnice kalibrační křivky (m) stanovena na -3,470 a hodnota Ct při teoretické koncentraci $c = 0$ na 19,012 (Tabulka 8).

Tabulka 6: Tabulka výsledků absolutní kvantifikace DNA patogenů dle kalibrační křivky a relativní kvantifikace ITS oblasti druhového komplexu FTSC k ITS oblasti hostitele. Jako vnitřní kalibrátor patogenu byla použita Ct hodnota (27,02) z kalibrační křivky *F. avenaceum* (8015) ředění 1:1000. Jako vnitřní kalibrátor hostitele byla použita Ct hodnota (21,41) z kalibrační křivky Tp ředění 1:10. M – průměr; p – patogen; h – hostitel; SD – směrodatná odchylka; RE – relativní kvantifikace ITS patogenu k ITS hostitele vztažená ke kalibračním vzorkům dle Pfaffl (2001); +/- – pozitivní/negativní detekce cílové DNA patogenu.

vzorek	změřené Ct patogena			změřené Ct hostitele			ng / µg celkové DNA					RE	pozitivita	
	Ct p 1	Ct p 2	Ct p 3	Ct h 1	Ct h 2	Ct h 3	p 1	p 2	p 3	p M	SD			
M25	28,24	28,22	28,39	28,28	14,01	14,15	14,42	0,07	0,08	0,07	0,07	0,07	0,0029	+
M32	29,45	29,50	29,67	29,54	12,19	12,01	11,84	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	0,0013	+
M80	29,89	30,32	30,61	30,27	13,58	14,31	14,38	-	-	-	-	-	-	-
M85	27,74	27,61	27,72	27,69	14,61	14,51	14,54	0,10	0,11	0,10	0,10	0,10	0,0053	+
M90	25,19	25,26	24,99	25,15	16,66	16,64	16,74	0,46	0,44	0,52	0,48	0,03	0,1089	+
M93	24,95	25,31	27,44	25,90	16,94	16,89	18,69	0,53	0,43	0,12	0,36	0,18	0,1243	+
M96	23,39	22,95	23,21	23,18	18,65	18,15	18,65	1,36	1,77	1,52	1,55	0,17	1,2615	+
M100	26,68	27,02	26,61	26,77	11,98	12,34	12,09	0,19	0,15	0,20	0,18	0,02	0,0017	+
M112	31,81	31,62	31,21	31,55	12,15	12,17	12,22	-	-	-	-	-	-	-
M115	22,90	22,79	22,84	22,84	15,54	15,68	15,92	1,82	1,95	1,89	1,89	0,05	0,2188	+

Tabulka 7: Tabulka výsledků absolutní kvantifikace DNA patogenů dle kalibrační křivky a relativní kvantifikace ITS oblasti druhového komplexu FSC k ITS oblasti hostitele. Jako vnitřní kalibrátor patogenu byla použita Ct hodnota (22,74) z kalibrační křivky *F. solani* (8014) ředění 1:1000. Jako vnitřní kalibrátor hostitele byla použita Ct hodnota (21,91) z kalibrační křivky *Tr* ředění 1:10. M – průměr; p – patogen; h – hostitel; SD – směrodatná odchylka; RE – relativní kvantifikace ITS patogenu k ITS hostitele vztážená ke kalibračním vzorkům dle Pfaffl (2001); +/- – pozitivní/negativní detekce cílové DNA patogenu.

vzorek	změřené Ct patogena			ng / µg celkové DNA			ng / µg celkové DNA			RE	pozitivita		
	Ct p 1	Ct p 2	Ct p 3	Ct p M	Ct h 1	Ct h 2	Ct h 3	p 1	p 2			p 3	p M
M25	29,96	31,37	31,85	31,06	15,59	15,73	15,95	-	-	-	-	-	-
M32	30,19	33,19	33,41	32,26	13,42	13,70	13,59	-	-	-	-	-	-
M80	-	-	-	-	15,86	15,39	15,72	-	-	-	-	-	-
M85	24,85	25,03	25,11	25,00	16,51	16,44	16,67	0,95	0,88	0,85	0,90	0,04	0,0101
M90	22,08	21,96	21,41	21,82	18,36	18,49	18,20	2,98	3,14	3,94	3,35	0,42	0,1288
M93	26,24	27,7	28,1	27,35	18,51	18,71	18,87	0,54	0,29	0,25	0,36	0,13	0,0166
M96	-	-	-	-	20,27	20,31	20,38	-	-	-	-	-	-
M100	30,83	31,21	32,25	31,43	13,14	13,56	13,51	-	-	-	-	-	-
M112	-	39,79	-	39,79	13,77	14,07	13,73	-	-	-	-	-	-
M115	36,22	37,99	39,75	37,99	17,27	17,41	17,26	-	-	-	-	-	-

Tabulka 8: Tabulka výsledků absolutní kvantifikace DNA patogenů dle kalibrační křivky a relativní kvantifikace ITS oblasti druhového komplexu FSAMSC k ITS oblasti hostitele. Jako vnitřní kalibrátor patogenu byla použita Ct hodnota (27,55) z kalibrační křivky *F. culmorum* (F-163) ředění 1:1000. Jako vnitřní kalibrátor hostitele byla použita Ct hodnota (21,38) z kalibrační křivky Tp ředění 1:10. M – průměr; p – patogen; h – hostitel; SD – směrodatná odchylka; RE – relativní kvantifikace ITS patogenu k ITS hostitele vztažená ke kalibračním vzorkům dle Pfaffl (2001); +/- – pozitivní/negativní detekce cílové DNA patogenu.

vzorek	změřené Ct patogena				změřené Ct hostitele				ng / µg celkové DNA					RE	pozitivita
	Ct p 1	Ct p 2	Ct p 3	Ct p M	Ct h 1	Ct h 2	Ct h 3	p 1	p 2	p 3	p M	SD			
M25	25,90	26,06	26,46	26,14	12,23	12,59	12,86	0,52	0,47	0,36	0,45	0,07	0,0046	+	
M32	-	-	-	-	10,93	10,55	10,64	-	-	-	-	-	-	-	
M80	30,92	30,74	30,53	30,73	12,46	13,32	12,49	-	-	-	-	-	-	-	
M85	29,65	29,56	29,33	29,51	13,07	13,20	13,16	0,04	0,05	0,05	0,05	0,004	0,0007	+	
M90	31,46	31,00	30,61	31,02	14,64	14,95	14,75	-	-	-	-	-	-	-	
M93	31,21	30,90	30,87	30,99	14,95	15,10	14,82	-	-	-	-	-	-	-	
M96	31,24	31,14	31,19	31,19	16,86	16,32	16,03	-	-	-	-	-	-	-	
M100	24,87	24,80	24,79	24,82	10,50	10,78	10,71	1,03	1,07	1,08	1,06	0,02	0,0028	+	
M112	30,30	30,14	30,16	30,20	10,82	10,71	11,22	-	-	-	-	-	-	-	
M115	26,60	26,81	26,68	26,70	13,87	13,86	14,02	0,33	0,28	0,31	0,31	0,02	0,0084	+	

Analýza 10 in situ vzorků jetele lučního pomocí qPCR odhalila rozdílnou míru infekce jednotlivými druhovými komplexy hub rodu *Fusarium* (FTSC, FSSC a FSAMSC). Získané výsledky vykazují vysokou variabilitu jak mezi jednotlivými vzorky, tak mezi sledovanými druhovými komplexy rodu *Fusarium* v rámci jednotlivých vzorků, což odráží přítomnost odlišných patogenů v různých vzorcích i heterogenitu jednotlivých lokalit. Nízké hodnoty směrodatné odchylky u většiny vzorků naznačují vysokou konzistenci opakování, správnost technického provedení metody a reprodukovatelnost měření. Reziduální variabilita mezi jednotlivými opakováními je pravděpodobně způsobena zejména technickými omezeními při přípravě vzorků a drobnými přirozenými odchylkami procesu qPCR.

Pro primery a sondu k detekci FTSC byla detekce pozitivní u 8 z 10 vzorků. Nejvyšší koncentrace patogenní DNA byla zjištěna u vzorku M115 (1,89 ng DNA patogenu/ μ g celkové DNA) a u vzorku M96 (1,55 ng DNA patogenu/ μ g celkové DNA), což naznačuje silné napadení rostlin druhu komplexu FTSC. U vzorku M96 vychází více než 5x vyšší hodnota relativní kvantifikace než u vzorku M115, což může znamenat, že rostlinná tkáň vzorku mohla podléhat vyšší míře degradace než u vzorku M115. Vzorky M85, M90, M93 a M100 vykázaly střední úroveň infekce, s množstvím patogenní DNA v rozmezí 0,1–0,5 ng/ μ g celkové DNA. U zbývajících vzorků (M25, M32) byla detekce rovněž pozitivní, avšak koncentrace patogenní DNA byla nízká, odpovídající minimální míře infekce.

Druhový komplex FSSC byl v analyzovaných vzorcích pozitivně detekován u 3 z 10 vzorků. Celkové zastoupení infekce ve vzorcích je nejnižší ze tří sledovaných druhových komplexů. Mezi jednotlivými vzorky byly zaznamenány zřetelné rozdíly. Velmi vysokou míru infekce vykázal vzorek M90 (3,35 ng DNA patogenu/ μ g celkové DNA), což potvrzuje i relativní kvantifikace, která je u tohoto vzorku vyšší v porovnání s ostatními pozitivními vzorky. Mezi vzorky se silnou infekcí patří také vzorek M85 (0,9 ng DNA patogenu/ μ g celkové DNA). U vzorku M93 byla detekována střední hladina patogenní DNA 0,36 ng/ μ g celkové DNA. U ostatních vzorků nebyl patogen detekován nebo jeho množství odpovídalo úrovni NTC.

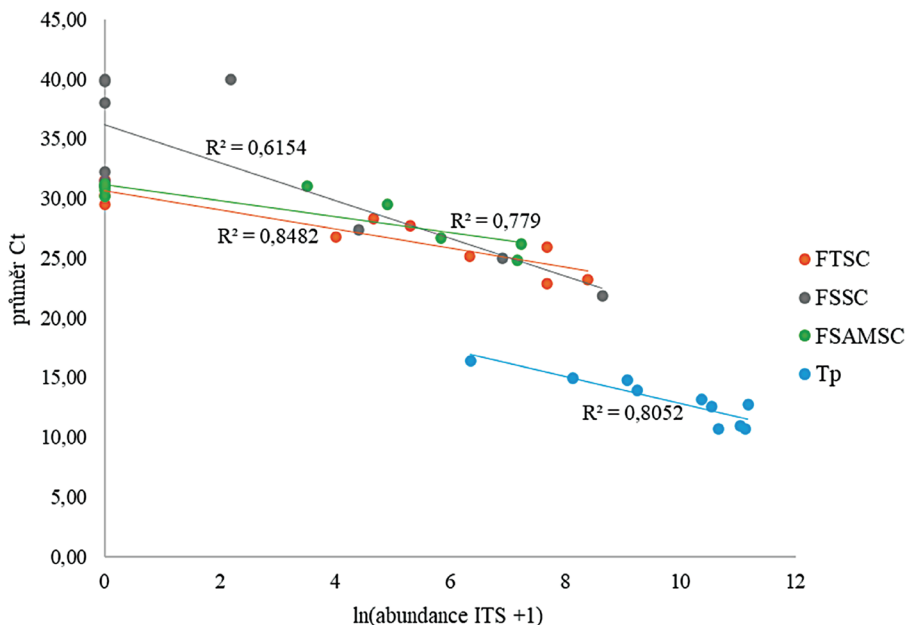
U druhového komplexu FSAMSC byla pozitivní detekce zjištěna u 4 z 10 vzorků, konkrétně u vzorků M25, M85, M100 a M115. Nejvyšší míru infekce vykázal vzorek M100 (1,06 ng patogenní DNA/ μ g celkové DNA). U vzorků M25 a M115 byla infekce střední s koncentracemi patogenní DNA v rozmezí 0,1–0,5 ng/ μ g celkové DNA, zatímco u vzorku M85 byla detekována nízká hladina DNA

i nízká relativní hodnota kvantifikace, oboje odpovídající velmi slabé infekci.

Vzorky M80, M90, M93, M96 a M112 vykázaly negativní detekci, přičemž u vzorku M32 nebyla během sledovaného počtu cyklů reakce detekována žádná hladina DNA tohoto cíle.

Dodatečně proběhlo ověření robustnosti výsledků qPCR porovnáním s výsledky sekvenování ITS amplikonů v analyzovaných vzorcích (Obrázek 4). Ověření dopadlo uspokojivě, neboť výsledky Ct hodnot negativně korelují s reálným počtem cílových ITS sekvencí ve vzorcích. To potvrzují hodnoty koeficientu determinace a korelačních koeficientů u FTSC ($R^2 = 0,85$; $r = -0,92$), u FSSC ($R^2 = 0,62$; $r = -0,78$), u FSAMSC ($R^2 = 0,78$; $r = -0,88$), a u hostitele ($R^2 = 0,81$; $r = -0,9$).

Obrázek 4: Porovnání míry detekce qPCR a četnosti ITS sekvencí získaných cíleným ITS sekvenováním u vybraných vzorků – závislost průměrné Ct hodnoty získané pomocí qPCR na přirozeném logaritmu abundancí ITS sekvencí. Patogenní druhové komplexy: FTSC – oranžová; FSSC – šedá; FSAMSC – zelená. Hostitel: Tp – modrá. Body představují jednotlivé vzorky, úsečky jsou lineární regresní přímky pro každý druhový komplex/hostitele. Hodnoty R^2 u regresních přímek ukazují sílu korelace mezi qPCR výsledky a abundancí ITS sekvencí.



3. Srovnání novosti postupů

Výběr houbových patogenů vycházel z molekulární analýzy mikrobiomu, která byla provedena u 146 kořenových vzorků jetele lučního odebraných na 15 lokalitách na území České republiky (Dybová et al., 2025; v přípravě). Na základě výsledků sekvenace regionu ITS ve vzorcích DNA izolovaných z kořene a přilehlé rhizosféry bylo možné charakterizovat spektrum hub (mykobiom) reálně přítomných v kořenovém mikrobiomu a identifikovat patogenní druhy, které se vyskytovaly hojně a nejčastěji v korelaci se symptomatickými jedinci. Na základě analýzy těchto kritérií bylo sestaveno spektrum konkrétních patogenů, které je nezbytné sledovat ve šlechtitelských programech jetele lučního zaměřených na selekci jedinců odolných ke kořenovým chorobám v oblasti střední Evropy. Metodika je zaměřena na cílené sledování vybraných patogenů a jejich rozlišení na molekulární úrovni na základě rozdílů v ITS a jejich kvantifikaci.

Novost vychází z unikátního výběru nově navržených primerů a sond sloužících k qPCR detekci a kvantifikaci patogenních hub krčku a kořene jetele lučního vybraných na základě kombinace znalostí o patogenním působení hub vedoucí ke kořenové hnilobě a moderního přístupu molekulární determinace mykobiomu. Literatura se této problematice věnuje zejména v kontextu jiných hostitelských rostlin, například kukuřice či ječmene (Bluhm et al., 2004), nebo se zaměřuje na odlišné spektrum houbových patogenů (Abd-Elmagid et al., 2013). V porovnání s běžně používanými postupy determinace patogenu nakažených jedinců na základě morfologie a mikroskopických charakteristik je metoda přesnější, se zvyšujícím se rozsahem méně nákladná a dobře škálovatelná. U nejvýznamnějšího houbového patogenu rodu *Fusarium* navíc metoda dosahuje vysokého rozlišení na úroveň jednotlivých druhových komplexů. V posledních letech je sledování patogenů pomocí qPCR standardem v klinické i rostlinolékařské praxi a je vhodné i pro hromadnou aplikaci ve šlechtění.

4. Popis uplatnění schválené metodiky

Metodika je určena především pro šlechtitelskou praxi zaměřenou na jetel luční (*Trifolium pratense* L.) a současně nachází uplatnění ve výzkumných aktivitách. Umožňuje rychlou a spolehlivou identifikaci významných krčkových a kořenových patogenů z rodu *Fusarium* přímo v rostlinném materiálu, čímž poskytuje podklady pro hodnocení šlechtitelského materiálu a selekci odolných genotypů.

Metodika je využitelná v diagnostických a výzkumných laboratořích, které se zabývají detekcí a kvantifikací houbových patogenů. Standardizovaný postup umožňuje porovnatelnost výsledků napříč různými pracovišti, což je důležité jak pro opakovaná kola selekce v různých letech a lokalitách, tak pro získání robustních dat použitelných ve šlechtění i ve vědeckém výzkumu. Zvláště významná je aplikace při hodnocení genových zdrojů, studiu variability v rámci kolekcí a při genetickém mapování genů podmiňujících odolnost vůči kořenovým chorobám.

Součástí metodiky je možnost detekce souboru více patogenů v paralelní qPCR reakci, což umožňuje efektivní screening rozsáhlejších souborů vzorků a současně získání komplexnější informace o přítomnosti významných původců chorob. Praktické uplatnění tedy spočívá nejen v urychlení a zpřesnění identifikace původců chorob, ale také v podpoře vědeckých a šlechtitelských aktivit, jejichž cílem je efektivní využití genetické variability a dlouhodobé zajištění odolnosti jetele lučního.

5. Ekonomické aspekty

5. 1. Odhad nákladů v případě zavedení metodiky

V podmínkách standardně vybavené laboratoře molekulární biologie, která již disponuje přístroji potřebnými k izolaci DNA a qPCR, představují hlavní náklady na zavedení metodiky spotřební materiál a syntéza oligonukleotidů (primery a vnitřní sondy) v rozsahu specifikovaném metodikou.

Spotřební materiál (sady pro izolaci DNA, PCR reagentie, mikrozkuhavky, pipetové špičky, ochranné pomůcky): náklady v rozsahu 25–40 tis. Kč při zpracování série 100 vzorků.

Oligonukleotidy: Cena za syntézu sond se pohybuje v rozmezí 10–33 tis. Kč za 100 nmol v závislosti na použitém fluoroforu a zhášecí skupině. Cena za syntézu primerů závisí na jejich délce a činí přibližně 200 Kč za 25 nmol primer. Množství 100 nmol sondy vystačí na statisíce vzorků, a proto představuje jednorázovou investici při zavedení metodiky.

Pokud laboratoř nedisponuje potřebným vybavením pro izolaci DNA a qPCR, je nutné počítat s počáteční investicí do přístrojů:

Další laboratorní vybavení (pipety, centrifugy, homogenizátory, chlazení vzorků): 100–400 tis. Kč, qPCR přístroj: 400–1.100 tis. Kč.

Celkové počáteční náklady na zavedení metodiky se pohybují přibližně od 600 tis. Kč, přičemž nejsou započítány osobní náklady na personál laboratoře a přípravu vzorků.

5. 2. Odhad nákladů na provedení dle počtu vzorků

Níže je uveden výpočet ceny za jeden rostlinný vzorek zahrnující izolaci DNA a qPCR ve 3 technických opakováních reakce (Tabulka 9). Použity byly orientační ceny vycházející z ceníků místních dodavatelů a interní kalkulace.

Tabulka 9: Souhrn nákladů na izolaci DNA a qPCR pro 1 vzorek, 30 a 100 vzorků. Každý vzorek je testován ve 3 samostatných reakcích (3x duplex qPCR) a každá reakce probíhá ve 3 technických opakováních. Jednotka – 1 technické opakování 1 reakce.

položka	jednotka [Kč]	1 vzorek [Kč]	30 vzorků [Kč]	100 vzorků [Kč]
odběr + spotřební materiál	10	10	300	1.000
izolace DNA (QIAamp® PowerFecal® DNA Kit) a QC DNA	165	165	4.950	16.500
qPCR master mix (LightCycler Multiplex)	46,1	415 (3x3 reakcí)	12.450	41.500
plast (zkumavky, špičky)	5	45 (3x3 reakcí)	1.350	4.500
pozitivní a negativní reakce (izolace, qPCR)	511	511	1.533	3.066
negativní technická kontrola	102	102	307	613
celkem		1.248	20.890	67.179

5. 3. Ekonomický přínos

Rozsah ekonomického přínosu metodiky závisí na konkrétním způsobu jejího využití. Předpokládá se zejména její aplikace pro cílenou šlechtitelskou selekci nebo jako nástroj pro fenotypovou analýzu a genetické mapování. V následujících případech je ilustrován vysoký potenciál ekonomického efektu této metodiky.

Selektivní šlechtění jetele lučního s lepší perzistencí

Ve standardním agrotechnickém scénáři v příhodných klimatických podmínkách ČR je jetel luční pěstován na stanovišti dva produkční roky, během nichž poskytuje 2–3 seče s průměrným výnosem kolem 8 t/ha suché hmoty. Třetím rokem porosty obvykle ztrácejí na výnosu, zejména kvůli snížené vitalitě a zdravotnímu stavu rostlin. Využití metodiky při selekci odolné, persistentní odrůdy umožní prodloužit plnou produkční výkonnost porostu i do třetího roku, čímž se získá dodatečný výnos. Zavedení odolnějších odrůd přináší dlouhodobý efekt ve stabilitě a zvýšení výnosu porostů, protože odolné rostliny lépe vzdorují chorobám a stresovým podmínkám již od založení produkčního porostu. Tento efekt je zvláště významný u intenzivně pěstovaných ploch, kde stabilnější výnosy snižují riziko ekonomických ztrát a umožňují efektivnější plánování produkce, čímž zvyšují ekonomickou efektivitu pěstování a přinášejí přímý finanční prospěch pěstitelům.

Cílené fenotypování pro mapování genů rezistence

Metodika umožňuje rychlé a robustní fenotypování různých genetických původů jetele, což zpřístupňuje mapování genů rezistence k sledovaným patogenům pomocí moderních genetických přístupů, jako jsou celogenomové asociační studie (GWAS) a QTL analýzy. Díky tomu lze identifikovat spolehlivé genetické markery spojené s odolností a využít je k selekci v raných fázích šlechtitelského procesu. Aplikace těchto markerů zkracuje dobu vyšlechtění nové odrůdy a umožňuje cílenou selekci rostlin s vysokou rezistencí, což minimalizuje ztráty způsobené chorobami. Metodika je tedy nástrojem pro přesné a efektivní šlechtění a zkrácení šlechtitelského cyklu, což umožňuje rychlejší zavedení nových odrůd do produkce. Přímé ekonomické přínosy zahrnují snížení nákladů na náročné fenotypové hodnocení, zvýšení efektivity práce a komerční využití odrůd s vysokou přidanou hodnotou prostřednictvím licencí a odprodeje osiva. Stabilnější výnosy a vyšší odolnost porostů snižují riziko ekonomických ztrát pro pěstitele, čímž zvyšují ekonomickou efektivitu zavedení nových odrůd a dlouhodobou návratnost investic do šlechtění.

6. Seznam použité literatury

Abd-Elmagid A., Garrido P. A., Hunger R., Lyles J. L., Mansfield M. A., Gugino B. K., Smith D. L., Melouk H. A., Garzon C. D. (2013) Discriminatory simplex and multiplex PCR for four species of the genus *Sclerotinia*. *Journal of Microbiological Methods*, 92(3): 293-300.

Aoki T., O'Donnell K., Geiser D. M. (2014) Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *Journal of General Plant Pathology*, 80(3): 189-201.

Armer V. J., Kroll E., Darino M., Smith D. P., Urban M., Hammond-Kosack K. E. (2024) Navigating the *Fusarium* species complex: Host-range plasticity and genome variations. *Fungal Biology*, 128(8), 2439-2459.

Bai G. H., Desjardins A. E., Plattner R. (2002) Deoxynivalenol-nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. *Mycopathologia*, 153(2): 91–98.

Barilli E., Cobos M. J., Rubiales D. (2016) Clarification on host range of *Didymella pinodes* the causal agent of pea ascochyta blight. *Frontiers in Plant Science*, 7: 592.

Beccari G., Arellano C., Covarelli L., Tini F., Sulyok M., Cowger C. (2019) Effect of wheat infection timing on *Fusarium* head blight causal agents and secondary metabolites in grain. *International Journal of Food Microbiology*, 290: 214-225.

Bluhm B. H., Cousin M. A., Woloshuk C. P. (2004) Multiplex real-time PCR detection of fumonisin-producing and trichothecene-producing groups of *Fusarium* species. *Journal of Food Protection*, 67(3): 536-543.

Bottalico A. a Perrone G. (2002) Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European journal of plant pathology*, 108(7): 611-624.

Campos M. D., Varanda C., Patanita M., Amaro Ribeiro J., Campos C., Materatski P., Albuquerque A., Félix M. D. R. (2023) A TaqMan® assay allows an accurate detection and quantification of *Fusarium* spp., the causal agents of tomato wilt and rot diseases. *Biology*, 12(2): 268.

Cerón-Bustamante M., Ward T. J., Kelly A., Vaughan M. M., McCormick S. P., Cowger C., Leyva-Mir S. G., Villaseñor-Mir H. E., Ayala-Escobar V., Nava-Díaz C. (2018) Regional differences in the composition of *Fusarium* head blight pathogens and mycotoxins associated with wheat in Mexico. *International Journal of Food Microbiology*, 273: 11-19.

Cromey M. G., Parkes R. A., Fraser P. M. (2001) *Fusarium* levels in grain harvested from New Zealand wheat and barley crops in 2000. *New Zealand Plant Protection*, 54: 193-197.

Crous P. W., Lombard L., Sandoval-Denis M., Seifert K. A., Schroers H.-J. et al. (2021) *Fusarium*: more than a node or a foot-shaped basal cell. *Studies in Mycology*, 98: 100116.

Frey L. A., Vleugels T., Ruttink T., Schubiger F. X., Pégard M., Skøt L., Grieder C., Studer B., Roldán-Ruiz I., Kölliker R. (2022) Phenotypic variation and quantitative trait loci for resistance to southern anthracnose and clover rot in red clover. *Theoretical and Applied Genetics*, 135(12): 4337-4349.

Geiser D. M., Al-Hatmi A. M., Aoki T., Arie T., Balmas V., Barnes I., Bergstrom G. C. et al. (2021) Phylogenomic analysis of a 55.1-kb 19-gene dataset resolves a monophyletic *Fusarium* that includes the *Fusarium solani* species complex. *Phytopathology*, 111(7): 1064-1079.

Ghiat N., Meamiche-Neddaf H., Infantino A., Le May C., Keddad A., Taoutaou A., Affichard M., Bouznad Z. (2025) Pathogenicity of *Ascochyta nigripyncnidia*, *Didymella pinodella* and *Boeremia exigua* isolated from *Trifolium alexandrinum* in Algeria and assessment of their host range on some Fabaceae. *Journal of Plant Pathology*, 107 (2): 1133-1146.

Goswami R. S. a Kistler H. C. (2005) Pathogenicity and in planta mycotoxin accumulation among members of the *Fusarium graminearum* species complex on wheat and rice. *Phytopathology*, 95(12): 1397–1404.

Gräfenhan T., Johnston P. R., Vaughan M. M., McCormick S. P., Proctor R. P., Busman M., Ward T. J., O'Donnell K. (2016) *Fusarium praegraminearum* sp. nov., a novel nivalenol mycotoxin-producing pathogen from New Zealand can induce head blight on wheat. *Mycologia*, 108: 1229–1239.

Hering O. a Nirenberg H. I. (1995) Differentiation of *Fusarium sambucinum* Fuckel sensu lato and related species by RAPD PCR. *Mycopathologia*, 129: 159–164.

- Ioos R., Belhadj A., Menez M. (2004) Occurrence and distribution of *Microdochium nivale* and *Fusarium* species isolated from barley, durum and soft wheat grains in France from 2000 to 2002. *Mycopathologia*, 158(3): 351-362.
- Jambagi S., Hodén K. P., Öhrlund L., Dixelius C. (2023) Red clover root-associated microbiota is shaped by geographic location and choice of farming system, *Journal of Applied Microbiology*, 134(4): lxad067.
- Jansen C., von Wettstein D., Schäfer W., Kogel K.-H., Felk A., Maier F. J. (2005) Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proceedings of the National Academy of Science*, 102(46): 16892–16897.
- Jestoi M. (2008) Emerging *Fusarium*-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin – A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(1): 21-49.
- Jing S. a Boelt B. (2021) Seed production of red clover (*Trifolium pratense* L.) under danish field conditions. *Agriculture*, 11: 1289.
- Kelly A. C., Clear R. M., O'Donnell K., McCormick S., Turkington T. K., Tekauz A., Gilbert J., Kistler H. C., Busman M., Ward T. J. (2015) Diversity of *Fusarium* head blight populations and trichothecene toxin types reveals regional differences in pathogen composition and temporal dynamics. *Fungal Genetics and Biology*, 82: 22–31.
- Kelly A., Proctor R. H., Belzile F., Chulze S. N., Clear R. M., Cowger C., Elmer W., Lee T., Obanor F., Waalwijk C., Ward T. J. (2016) The geographic distribution and complex evolutionary history of the NX-2 trichothecene chemotype from *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology*, 95: 39–48.
- Klimenko I., Razgulayeva N., Gau M., Okumura K., Nakaya A., Tabata S., Kozlov N. N., Isobe S. (2010) Mapping candidate QTLs related to plant persistency in red clover. *Theoretical and Applied Genetics*, 120(6): 1253-1263.
- Kolander T. M., Bienapfl J. C., Kurle J. E. and Malvick D. K. (2012) Symptomatic and asymptomatic host range of *Fusarium virguliforme*, the causative agent of soybean sudden death syndrome. *Plant Disease*, 96: 1148–1153.
- Kosiak B., Torp M., Skjerve E., Thrane U. (2003) The prevalence and distribution of *Fusarium* species in Norwegian cereals: a survey. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science*, 53(4): 168-176.

- Kralik P. a Ricchi M. (2017) A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. *Frontiers in Microbiology*, 8: 108.
- Lindblad M., Gidlund A., Sulyok M., Börjesson T., Krska R., Olsen M., Fredlund E. (2013) Deoxynivalenol and other selected Fusarium toxins in Swedish wheat – Occurrence and correlation to specific Fusarium species. *International Journal of Food Microbiology*, 167(2): 284-291.
- Logrieco A., Moretti A., Castella G., KostECKI M., Golinski P., Ritieni A., Chelkowski J. (1998) Beauvericin production by Fusarium species. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(8): 3084-3088.
- Logrieco A., Rizzo A., Ferracane R., Ritieni A. (2002) Occurrence of beauvericin and enniatins in wheat affected by Fusarium avenaceum head blight. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1): 82-85.
- Milton J. M. a Isaac I. (1976) Verticillium wilt of clover. *Plant Pathology*, 25(3): 119-121.
- Munkvold G. P. (2016). Fusarium species and their associated mycotoxins. In: Moretti A., Susca A. (Eds.) *Mycotoxigenic Fungi. Methods in Molecular Biology*, vol 1542. Humana Press, New York, NY, USA. Str.: 51-106. Online ISBN: 978-1-4939-6707-0.
- Nganje W. E., Kaitibie S., Wilson W. W., Leistritz F. L., Bangsund D. A. (2004) Economic impacts of Fusarium head blight in wheat and barley: 1993–2001. *Agribusiness and Applied Economics Report 23627*. North Dakota State University, Department of Agribusiness and Applied Economics, ND, USA.
- O'Donnell K., Kistler H. C., Tacke B. K., Casper H. H. (2000) Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of Fusarium graminearum, the fungus causing wheat scab. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 97(14): 7905–7910.
- O'Donnell K., Ward T. J., Robert V. A., Crous P. W., Geiser D. M., Kang, S. (2015) DNA sequence-based identification of Fusarium: current status and future directions. *Phytoparasitica*, 43(5): 583-595.
- Ouellet T. a Seifert K. A. (1993) Genetic characterization of Fusarium graminearum strains using RAPD and PCR amplification. *Phytopathologia*, 83(9): 1003–1007.
- Parry D. W. a Nicholson P. (1996) Development of a PCR assay to detect Fusarium poae in wheat. *Plant Pathology*, 45(2): 383-391.

Pelikán J., Hýbl M. a kolektiv (2012) Rostliny čeledi Fabaceae LINDL. (bobovitě) České republiky. Ed. Knotová D. Vydavatelství Petr Baštan, Olomouc, CZ. ISBN 978-80-905080-2-6.

Pereira C. B., Ward T. J., Tessmann D. J., Del Ponte E. M., Laraba I., Vaughan M. M., McCormick S. P., Busman M., Kelly A., Proctor R. H., O'Donnel K. (2018) *Fusarium subtropicale*, sp. nov., a novel nivalenol mycotoxin-producing species isolated from barley (*Hordeum vulgare*) in Brazil and sister to *F. praegraminearum*. *Mycologia*, 110: 860–871.

Pestka J. (2010) Toxicological mechanisms and potential health effects of deoxynivalenol and nivalenol. *World Mycotoxin Journal*, 3(4): 323–347.

Pfaffl M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9): e45.

Proctor R. H., Hohn T. M., McCormick S. P. (1995) Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8(4): 593–601.

Rabie C. J., Sydenham E. W., Thiel P. G., Lübben A., Marasas W. F. (1986) T-2 toxin production by *Fusarium acuminatum* isolated from oats and barley. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(3): 594-596.

Rasmussen R. (2001) Quantification on the LightCycler. In: Meuer S., Wittwer C., Nakagawara K. I. (eds), *Rapid Cycle Real-Time PCR*. Springer, Berlin, Heidelberg, DE. Str.: 1-34. Online ISBN: 978-3-642-59524-0.

Sandoval-Denis M., Swart W. J., Crous P. W. (2018) New *Fusarium* species from the Kruger National Park, South Africa. *MycKeys*, 34: 63–92.

Schilling A. G., Möller E. M., Geiger H. H. (1996) Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum*. *Molecular Plant Pathology*, 8(5): 515-522.

Skipp R. A. a Christensen M. J. (1990) Selection for persistence in red clover: Influence of root disease and stem nematode. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 33(2): 319-333.

Stakheev A. A., Khairulina D. R., Zavriev S. K. (2016) Four-locus phylogeny of *Fusarium avenaceum* and related species and their species-specific identification based on partial phosphate permease gene sequences. *International Journal of Food Microbiology*, 225: 27-37.

Strejčková M. a Nedělník J. (2020) Zdravotní stav jetele lučního v ČR

s přihlédnutím ke krčkovým a kořenovým hnilobám a jejich původům, houbám rodu *Fusarium* [online]. [vid. 2023-3-28]. Dostupné z: <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/choroby/zdravotni-stav-jetele-lucniho-v-cr-s-prihlednutim-ke-krckovym-a-korenovym-hnilobam-a-jejich-puvodcum>.

ÚKZÚZ (2023) Rostlinolékařský portál [online]. [vid. 2023-3-28]. Dostupné z: https://eagri.cz/public/app/srs_pub/fytoportal/public/#rlp|domu|uvod.

VanEtten H. D. (1978) Identification of additional habitats of *Nectria haematococcamating* population VI. *Phytopathology*, 68: 1552–1556.

Vogelgsang S., Sulyok M., Hecker A., Jenny E., Krska R., Schuhmacher R., Forrer H.-R. (2008) Toxicogenicity and pathogenicity of *Fusarium poae* and *Fusarium avenaceum* on wheat. *European Journal of Plant Pathology*, 122(2): 265-276.

Yli-Mattila T., Paavanen-Huhtala S., Bulat S. A., Alekhina I. A., Nirenberg H. I. (2002) Molecular, morphological and phylogenetic analysis of the *Fusarium avenaceum*/*F. arthrosporioides*/*F. tricinctum* species complex—a polyphasic approach. *Mycological Research*, 106(6): 655-669.

Yli-Mattila T., Paavanen-Huhtala S., Parikka P., Konstantinova P., Gagkaeva T. Y. (2004) Molecular and morphological diversity of *Fusarium* species in Finland and north-western Russia. *European Journal of Plant Pathology*, 110(5): 573-585.

Yli-Mattila T., Kalko G., Hannukkala A., Paavanen-Huhtala S., Hakala K. (2010) Prevalence, species composition, genetic variation and pathogenicity of clover rot (*Sclerotinia trifoliorum*) and *Fusarium* spp. In red clover in Finland. *European Journal of Plant Pathology*, 126(1): 13-27.

Żelechowski M., Olszewski J., Kulik T. (2019) A preliminary survey of cultured fusaria from symptomatic legume grains in North-Eastern Poland. *Toxins*, 11(10): 569.

7. Seznam publikací, které předcházely metodice

Holková L., Jílková B., Víchová J., Kmoch M. (2023) Metodika kvantifikace houbového patogenu *Rhizoctonia solani* v půdě metodou real-time PCR. Certifikovaná metodika. Mendelova univerzita v Brně, Brno, ČR. ISBN 978-80-7509-947-1.

Kmoch M., Šafránková I., Holková L., Pokorný R., Marková J. (2011) Houby rodu *Fusarium* v přirozeně infikovaných porostech sladovnických odrůd / linií ječmene (*Hordeum vulgare* L.) a jejich identifikace a kvantifikace za využití real-time PCR metody. *Kvasný průmysl*, 57(7-8): 203-208.

Nedělník J., Moravcová H., Hajšlová J, Lancová K, Váňová M., Salava J. (2007) *Fusarium* spp. in wheat grain in the Czech Republic analysed by PCR method. *Plant Protection Science*, 43(4): 135-137.

Sabolová T., Hortová B., Palicová J., Strejčková M., Nedělník J. (2014) Metodika detekce *Fusarium oxysporum* pomocí druhově-specifické PCR. Uplatněná certifikovaná metodika. *Metodika* 28/14. Troubsko, ČR. ISBN: 978-80-88000-03-07.

Strejčková M. a Nedělník J. (2020) Zdravotní stav jetele lučního v ČR s přihlédnutím ke krčkovým a kořenovým hnilobám a jejich původům, houbám rodu *Fusarium* [online]. [vid. 2023-3-28]. Dostupné z: <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/choroby/zdravotni-stav-jetele-lucniho-v-cr-s-prihlednutim-ke-krckovym-a-korenovym-hnilobam-a-jejich-puvodcum>.

8. Oponenti

doc. Mgr. Pavel Matušinský, Ph.D. – Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

RNDr. Kateřina Tománková, Ph.D. – Oddělení molekulární biologie Olomouc, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

9. Dedikace

Schválená metodika je výstupem řešení výzkumného projektu TA ČR pod č. TQ03000327 s názvem “Detekce významných houbových patogenů kořene jetele lučního a jejich korelace s obsahem mykotoxinů”.

v y d á v á

OSVĚDČENÍ

UKZUZ 194031/2025

o uznání metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací, schválené usnesením vlády dne 8. února 2017, číslo 107 a její samostatné přílohy č. 4 schválené usnesením vlády dne 29. listopadu 2017 č. 837.

Název metodiky: **Molekulární detekce a kvantifikace kořenových patogenů *Fusarium ssp.* (druhové komplexy FSAMSC, FSSC a FTSC) jetele lučního (*Trifolium pratense L.*) pomocí qPCR.**

Auťoři: **Mgr. Magdaléna Dybová, Ing. Mária Neoralová, Ph.D., Mgr. Markéta Michutová, Ph.D., Ing. Oldřich Trněný, Ph.D., Ing. Nicole Frantová, Ph.D., Bc. Antonín Drda, Ing. Jakub Prudil, Mgr. Jana Staveníková, RNDr. Jan Nedělník, Ph.D., RNDr. Ludmila Holková, Ph.D**

Název organizací: **Zemědělský výzkum, spol. s r. o., Mendelova univerzita v Brně**

Místo vydání: **Brno**

Rok vydání: **2025**

Schválená metodika je výstupem řešení výzkumného projektu TA ČR pod č. TQ03000327 s názvem "Detekce významných houbových patogenů kořene jetele lučního a jejich korelace s obsahem mykotoxinů".

Brno 28. 11. 2025

Dokument je podepsán elektronickým podpisem	
Podepisující:	Ing. Daniel Jurečka
Organizace:	Ústřední kontrolní a zkušební ústav země
Sémiové č. cert.:	24041124
Vydávatel cert.:	Pořísťágnum Qualified CA 4
Datum a čas:	01.12.2025 08:45:56
Dřívot:	
Mřto:	

Ing. Daniel Jurečka
ředitel ústavu

.....
podpis/elektronický podpis
zřstupce odborného řtvaru střtní sprřvy

Souhlas ředitele Odboru precizního zemědělství, výzkumu a vzdělřvání MZe řR:

V dne

Mgr. Jan Radoř
Digitálně podepsal
Mgr. Jan Radoř
Datum: 2025.12.15
16:47:53 +01'00'

.....
podpis/elektronický podpis
ředitele/ředitelky
Odboru precizního zemědělství,
výzkumu a vzdělřvání

Molekulární detekce a kvantifikace kořenových patogenů
Fusarium spp. (druhové komplexy FSAMSC, FSSC a FTSC)
jetele lučního (*Trifolium pratense* L.) pomocí qPCR

Vydali:

© Zemědělský výzkum, spol. s r. o., 2025

© Mendelova univerzita v Brně, 2025

ISBN 978-80-88000-49-5

Vydání: první

Náklad: 50 ks

Tazo publikace neprošla jazykovou úpravou.