

METODIKA DIAGNOSTIKY *HELMINTHOSPORIUM SOLANI* V HLÍZÁCH BRAMBORU POMOCÍ REAL-TIME PCR

Martin KMOCH
Věra LOUBOVÁ
Marie VESELSKÁ
Barbora JÍLKOVÁ
Ludmila HOLKOVÁ

Certifikovaná metodika



**VÝZKUMNÝ ÚSTAV
BRAMBORÁŘSKÝ
HAVLÍČKŮV BROD**

**VÝZKUMNÝ ÚSTAV BRAMBORÁŘSKÝ
HAVLÍČKŮV BROD, s.r.o.**

Oddělení genetických zdrojů

Laboratoř virologie



**VÝZKUMNÝ ÚSTAV
BRAMBORÁŘSKÝ
HAVLÍČKŮV BROD**



Certifikovaná metodika

**Metodika diagnostiky *Helminthosporium solani* v hlízách
bramboru pomocí real-time PCR**

Ing. Martin KMOCH, Ph.D.

Mgr. Věra LOUBOVÁ

Bc. Marie VESELSKÁ

Ing. Barbora JÍLKOVÁ, Ph.D.

RNDr. Ludmila HOLKOVÁ, Ph.D

Realizační výstup podpory od Ministerstva zemědělství ČR – NAZV č. QK21010083
„*Ekologická ochrana konzumních brambor jako zdravé zeleniny proti vybraným půdou
a sadbou přenášeným patogenům*“

Havlíčkův Brod, 2023

Metodika diagnostiky *Helminthosporium solani* v hlízách bramboru pomocí real-time PCR

Dedikace

Metodika byla vypracovaná v rámci podpory od Ministerstva zemědělství ČR – projektu NAZV č. QK21010083 s názvem „*Ekologická ochrana konzumních brambor jako zdravé zeleniny proti vybraným půdou a sadbou přenášeným patogenům*“.

Poděkování patří pracovníkům České sbírky mikroorganismů (CCM) – Masarykova univerzita (Národní program genetických zdrojů mikroorganismů a drobných živočichů hospodářského významu) za poskytnutí potřebných kultur hub (pozitivních kontrol).

Podíly autorů

Ing. Martin Kmoch, Ph.D.	55 %
Mgr. Věra Loubová	20 %
Bc. Marie Veselská	15 %
Ing. Barbora Jílková, Ph.D.	5 %
RNDr. Ludmila Holková, Ph.D.	5 %

Oponenti

RNDr. Anna Kryštofová, Ph.D. (*oponent z odborného orgánu státní správy*)

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
Oddělení diagnostiky škodlivých organismů rostlin
Šlechtitelů 773/23, 779 00 Olomouc 9
e-mail: anna.krystofova@ukzuz.cz

Ing. Petr Svoboda, CSc. (*odborný oponent*)

Chmelařský institut s.r.o.
Oddělení biotechnologie
Kadaňská 2525, 438 46 Žatec
e-mail: svoboda@chizatec.cz

Metodika byla uplatněna v roce 2023.

ISBN:978-80-88614-02-9

Obsah

1	Cíl metodiky	5
2	Vlastní popis metodiky.....	5
2.1	Úvod.....	5
2.2	Podstata použitých diagnostických metod.....	7
2.3	Vlastní postup	8
2.3.1	Izolace DNA	8
2.3.2	PCR reakce.....	10
2.3.3	Vyhodnocení real-time PCR reakce	15
2.4	Příklad praktického využití.....	18
3	Srovnání „novosti postupů“	20
4	Popis uplatnění Certifikované metodiky.....	20
5	Ekonomické aspekty	20
6	Seznam použité související literatury	21
7	Seznam vybraných publikací, které předcházely metodice	23

1 Cíl metodiky

Cílem certifikované metodiky je optimalizace molekulárních metod diagnostiky *Helminthosporium solani* Durieu & Mont., (1849), původce stříbřitosti slupky, v posledních letech důležité skládkové choroby bramboru (*Solanum tuberosum* L.), která snižuje především tržní hodnotu hlíz. Použité metody založené na PCR, tj. TaqMan real-time PCR a SybrGreen real-time PCR, zvýší citlivost detekce *H. solani* v hlízách bramboru, zajistí vyšší spolehlivost a rychlost diagnostiky. Protokoly budou optimalizovány pro použití v běžné diagnostické laboratoři vybavené zařízením pro molekulární biologii.

2 Vlastní popis metodiky

2.1 Úvod

Stříbřitost slupky, způsobená houbou *Helminthosporium solani* Durieu & Mont., (1849) [*H. atrovirens* syn. *Spondylocladium atrovirens*], je choroba bramboru (*Solanum tuberosum* L.), která se stala ekonomicky významnou (Errampalli *et al.*, 2001). Vzestup výskytu stříbřitosti je připisován nedostatečné odolnosti odrůd bramboru k *H. solani* (Rodriguez *et al.*, 1996) a neúčinným ochranným opatřením (Errampalli *et al.*, 2001).

Stříbřitost vyvolává většinou kosmetické vady hlíz, čímž může negativně ovlivnit trh s konzumními a sadbovými bramborami. Stříbřitost obvykle nezpůsobuje ztráty na výnosech (Wale *et al.*, 2008). Vzhledem k rostoucí poptávce po praných hlízách snižuje tržní hodnotu hlíz (Cullen *et al.*, 2001). Světle hnědé léze zvyšují propustnost slupky hlíz pro vodu, a proto dochází ke snížení jejich hmotnosti během skladování (Secor & Gudmestad, 1999). Choroba může mít významný vliv na vývoz, zejména sadbových hlíz, protože na certifikovaných sadbových hlízách je povolena pouze omezená infekce *H. solani* (Denner *et al.*, 1997). Hranolky a chipsy vyrobené z napadených hlíz mají často nepřijatelné hnědé okraje (Holley & Kawchuk, 1996).

Mycelium *H. solani* je tmavé, vyskytující se často v substrátu. Konidiofory a konidie vznikají ze stromat (Barnett & Hunter, 1998). Hyfy se vyskytují ve felému, felodermu a kortikální vrstvě hlíz (Heiny & McIntyre, 1983). První konidie se vyvíjí terminálně na vrcholu tmavých, přehrádkovaných a nepravidelných konidioforů a následné konidie, v počtu mezi 5 a 30 se vyvíjejí bazipetálně (Hunger & McIntyre, 1979). *H. solani* vytváří velké, válcové, tmavé, 3-10 buněčné, mírně prohnuté, silnostěnné konidie o délce 15-64 μm a šířce 4-8 μm (Hunger & McIntyre, 1979). Konidie se tvoří v přeslenech na konidioforech. Léze s hojnější produkcí konidií a konidioforů jsou tmavší než nesporulující léze. Většina konidií a konidioforů je vytvářena na rozhraní mezi odumřelým pletivem vykazující příznaky a zdravým pletivem. Léze s hojnou sporulací se jeví jako hnědé až spálené, zatímco zralé léze jsou stříbřité (Hunger & McIntyre, 1979). Teploty v rozmezí 15-32 $^{\circ}\text{C}$ a vysoká vlhkost má často za následek klíčení konidií, což vede k infekci hlíz. Konidie vyklíčí do 16 hodin a apresoria jsou pozorována dva dny po inokulaci (Heiny & McIntyre, 1983). Mycelium proniká do epidermis přes lenticely a/nebo proniká do peridermu a způsobuje ztrátu pigmentace, což má za následek vznik stříbřitých lézí (Rodriguez *et al.*, 1995, 1996; Wale *et al.*, 2008). S výjimkou hlíznatých druhů *Solanum tuberosum* (Rodriguez *et al.*, 1995) a *S. elaeagnifolium* (Sethuraman *et al.*, 1997) nejsou jiné rostliny hostiteli pro *H. solani* (Jellis & Taylor, 1974).

Cyklus onemocnění stříbřitostí má dvě fáze: plní a skladovací. Primárním zdroje inokula

Metodika diagnostiky *Helminthosporium solani* v hlízách bramboru pomocí real-time PCR

H. solani jsou infikované sadbové hlízy (Hide & Adams, 1980; Jellis & Taylor, 1977). K infekci hlíz může dojít během vegetačního období z infikovaných sadbových hlíz (Secor & Gudmestad, 1999) nebo půdního inokula (Firman & Allen, 1995b) a při skladování (Jellis & Taylor, 1977; Rodriguez *et al.*, 1996), kdy za příznivých podmínek dochází ke sporulaci houby činící hlízy sazovité (Secor & Gudmestad, 1999). Primární infekce, ke které dochází brzy po iniciaci hlízy, je často soustředěna na stolonové konce hlíz (Jellis & Taylor, 1977). Většina infekcí se vyskytuje před sklizní, i když k nim může dojít při sklizni nebo mohou být konidie přeneseny při zavlažování (Firman & Allen, 1995a). Závažnost onemocnění se výrazně zvyšuje při dlouhodobém skladování hlíz (Secor & Gudmestad, 1999). *H. solani* může sportovat a infikovat hlízy ve skladech brambor (Rodriguez *et al.*, 1996), a konidie mohou sloužit jako zdroj inokula pro sekundární infekční cykly v obchodech (Mérida & Loria, 1994). Konidie z infikovaných hlíz mohou být rozptýleny ventilačním systémem (Rodriguez *et al.*, 1996). Ačkoliv je *H. solani* považováno za patogena hlíz, může přezimovat v půdě jako saprofyt na rostlinných zbytcích (Jellis & Taylor, 1977; Mérida & Loria, 1994). Přezimující půdní inokulum nehraje v epidemiologii důležitou roli (Jellis & Taylor, 1974).

Název onemocnění je odvozen od charakteristického kovového, stříbřitého lesku starších lézí na povrchu hlíz bramboru. Příznaky onemocnění se objevují na hlízách, ale ne na stonku nebo kořenech (Fahn, 1982). Stříbrné zbarvení peridermu je způsobeno ztrátou pigmentu, prostřednictvím vysoušení buněk a ukládáním suberinu (Frazier *et al.*, 1998). Pigmentace hlíz je zcela skryta u kultivarů brambor s červenou slupkou (Jellis & Taylor, 1977) Léze zůstávají po vytvoření na hlízách v půdě malé, ale během skladování se zvětšují (Mérida & Loria, 1994). První příznaky stříbřitosti na hlízách jsou světle hnědé kruhové skvrny popř. léze na konci stolonu, které mohou být tmavě olivové barvy (Cullen *et al.*, 2001; Jellis & Taylor, 1977). Po vytvoření hlíz v půdě zůstávají léze malé, ale během skladování se zvětšují (Jellis & Taylor, 1977; Mérida & Loria, 1994). Jednotlivé léze postupně splývají (Mérida & Loria, 1994). Závažnost onemocnění lze snížit ošetřením sadbových hlíz fungicidy nebo dodržováním osevního sledu (Kutuzova *et al.*, 2017).



Obr. 1 Symptomy stříbřitosti hlíz vyvolané *H. solani*



Obr. 2 Sporulace *H. solani* na hlíze bramboru

2.2 Podstata použitých diagnostických metod

Real-time PCR (qPCR)

Real-timePCR (Real Time Polymerase Chain Reaction) metoda je založena na klasické PCR s tím rozdílem, že termocykler umožňuje kontinuálně monitorovat (v reálném čase) přírůstky DNA během každého cyklu (u klasické PCR se detekuje až finální produkt). 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 (vzniklého produktu). Data jsou sbírána během celého PCR procesu na speciálních termocyklerech s optikou umožňující excitaci substrátů a následnou detekci fluorescence v každé jamce. Přístroj po každém cyklu změří fluorescenci a výsledek předá řídicímu softwaru, který zobrazuje kontinuálně množství uvolněné fluorescence (Raclavský, 2003; Mičuda *et al.*, 2006).

Typická amplifikační křivka má esovitě zakřivený tvar a lze ji rozdělit na čtyři části:

- 1) „background“ fázi, kdy je amplifikátu tak málo, že jeho fluorescence ještě nedosahuje měřitelných hodnot
- 2) exponenciální fázi, kdy množství produktu exponenciálně roste (trvá asi 4–8 cyklů)
- 3) lineární fázi (množství produktu přibývá lineárně)
- 4) plateau fázi, kdy dochází k saturaci systému, množství amplifikovaného produktu se dále nemění a fluorescenční signál zůstává konstantní.

Platí, že čím dříve amplifikační křivka dosáhne exponenciální fáze, popř. překročí určitý fluorescenční práh umístěný do této fáze, tím více startovních templátových molekul bylo přítomno ve vzorku na počátku reakce (Mičuda *et al.*, 2006; Raclavský, 2003).

Metodika diagnostiky *Helminthosporium solani* v hlízách bramboru pomocí real-time PCR

Detekce probíhá při real-time PCR v exponenciální fázi, kdy jsou ve vzorcích zachovány kvantitativní poměry a reakce je precizní a specifická. Oproti tomu u klasické PCR probíhá detekce v plató fázi, při níž nelze rozlišit množství matricové DNA ve vzorku.

Kvantifikace DNA se provádí prostřednictvím matematické analýzy amplifikačních křivek vzniklých vynesemím naměřené fluorescence oproti pořadovému číslu příslušného cyklu. Pro detekci PCR produktů lze využít nespecifické fluorescenční barvivo (SYBR® Green real-time PCR) nebo specifické sondy (TaqMan real-time PCR).

SYBR Green real-time PCR

Pro detekci PCR produktů se nejčastěji využívá nespecifické interkalační barvivo SYBR® Green I., které se během cyklů váže na vznikající ds DNA. Vazbou na DNA se aktivuje – emituje fluorescenční záření, které je průběžně snímáno a vyhodnocováno. Nárůst fluorescenčního signálu vidíme na obrazovce jako narůstající křivku.

TaqMan real-time PCR

Pro detekci PCR produktů lze použít kromě barviva SYBR® Green specifické sondy (próby), nejčastěji TaqMan. Kromě primerů se do reakce vkládá další oligonukleotid, který dosedá na amplifikovaný úsek. Tento oligonukleotid je na jednom konci označený fluorescenční značkou (fluorofor) a na druhém konci nese tzv. zhášec (quencher). Pokud je fluorescenční látka v těsné blízkosti zhášec, je její fluorescence potlačena. Vlastní PCR probíhá obvyklým způsobem až do okamžiku, kdy DNA polymeráza při syntéze nového řetězce narazí na fluorescenčně značený nukleotid (sondu). V tom okamžiku jej začne vytěšňovat z templátového vlákna, štěpí jej a do roztoku se uvolňuje fluorescenční barvivo, jehož fluorescenci je možné měřit v průběhu amplifikace. Intenzita fluorescence je úměrná množství nasynťezovaného PCR produktu (Mičuda *et al.*, 2006; Raclavský, 2003).

2.3 Vlastní postup

2.3.1 Izolace DNA

DNA o požadované kvalitě (bez inhibitorů PCR) a kvantitě lze izolovat z hlíz bramboru nebo kultur hub na živné půdě pomocí standardních metod nebo pomocí komerčních izolačních a purifikačních kitů. Pro izolaci DNA z hlízových vzorků bramboru lze doporučit zejména kity DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, 69104) a dle vlastních pokusů též kit GenElute Plant Genomic DNA Kit (Sigma). Po extrakci se ve vzorcích změří množství a kvalita DNA pomocí spektrofotometru.

Technické vybavení pro izolaci DNA z pletiv bramboru a pro její uchování

- ✓ Laboratorní váhy – na navážky vzorků (Mettler AE 160)
- ✓ Zásobní nádoba na tekutý dusík (Dewarova nádoba)
- ✓ Pracovní nádoba na tekutý dusík z PVC
- ✓ Laboratorní analytické váhy (Mettler AE 160) – na případné navážky vzorků

Metodika diagnostiky *Helminthosporium solani* v hlízách bramboru pomocí real-time PCR

- ✓ Centrifuga s otáčkami $\geq 12\,000$ rpm, s rotorem na plastové mikrozkušavky o objemu 2,0 ml (Hettich Zentrifugen EBA 12R)
- ✓ Vortex (Techno Kartell TK3S)
- ✓ Spektrofotometr (NanoDrop 2000c, případně Perkin Elmer MBA 2000)
- ✓ Mrazicí box (-20 °C)
- ✓ Hlubokomrazicí box (-80 °C) – pro dlouhodobé skladování vzorků
- ✓ Třecí misky s tloučky
- ✓ Pipety (2–20 μ l, 20–200 μ l a 100–1000 μ l) a kompatibilní sterilní RNase-free špičky s filtrem
- ✓ Plastové mikrozkušavky 1,5 ml a 2,0 ml (Eppendorf)
- ✓ Skalpel nebo ostrý nůž, pinzeta (odběr vzorku), špachtle
- ✓ Jednorázové rukavice

Chemikálie potřebné pro izolaci DNA z pletiv bramboru

- ✓ Tekutý dusík
- ✓ Extrakční kit GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, G2N70)
- ✓ RNase A Solution (Sigma-Aldrich, R6148-25ML nebo R4642)
- ✓ Etanol (96–100%), analytický stupeň čistoty (Sigma-Aldrich, E7023, E7148 nebo 459836) – do pufrů
- ✓ Technický etanol (70%) – sterilizace pracovních prostor

Postup izolace DNA pomocí kitu GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit

Před zahájením vlastní izolace je nutno připravit:

- Přidat do pufru Wash Solution požadované množství 95–100% etanolu – 72 ml na 30 ml pufru (70 extrakcí)
- Předehřát termoblok na 75 °C
- Důkladně promíchat reagenty, v případě precipitátu v reagentech zahřát na 55–65 °C ve vodní lázni, po rozpuštění precipitátu zchladit na laboratorní teplotu
- Předehřát eluční pufr (Elution Solution) na 65 °C

Vlastní postup

- a) Navázat vzorek slupky hlíz bramboru se symptomy stříbřitosti (25 mg) nebo mycelia z čisté kultury houby (50 mg), vzorek homogenizovat (rozetřít) pomocí tloučku v třecí misce za použití tekutého dusíku (pro kvalitní homogenizaci je nutno misky s tloučky důkladně předem namrazit). Nižší navážka u vzorků ze slupky hlíz je z důvodu ucpávání kolonek bobtnavým škrobem při následných krocích.
- b) Homogenizovaný vzorek přenést pomocí špachtle do mikrozkušavky (1,5 ml) s 350 μ l Lysis Solution [part A], 50 μ l Lysis Solution [part B] a 4 μ l RNase (50 U) [homogenizovaný vzorek nesmí roztát mimo lyzační pufr].
- c) Inkubovat mix při 75 °C po dobu 30 min, během inkubace několikrát promíchat převrácením mikrozkušavky.

Metodika diagnostiky *Helminthosporium solani* v hlízách bramboru pomocí real-time PCR

- d) Přidat 130 μ l Precipitation Solution, promíchat převrácením mikrozkušavky, umístit na led po dobu 5 min.
- e) Centrifugovat 16 000 \times g 5 min (*vytvoření pelety zbytků buněk, proteinů a polysacharidů*).
- f) Opatrně přelít supernatant do filtrační kolonky (GenElute filtration column, modrá, s 2 ml záchytnou zkumavkou).
- g) Centrifugovat 1 min při max. otáčkách (16 000 \times g).
- h) Vyhodit filtrační kolonku a k filtrátu přidat 700 μ l Binding Solution a promíchat otáčením mikrozkušavky.
- i) Připravit Binding Column – vložit GenElute Miniprep Binding Column (s červeným kroužkem) do mikrozkušavky (pokud již není sestavené), přidat 500 μ l Column Preparation Solution do každé kolonky, centrifugovat 12 000 \times g 1 min, vylít filtrát.
- j) Opatrně přelít (přepipetovat) mix z kroku h) a centrifugovat při max. otáčkách (16 000 g) 1 min, vylít filtrát.
- k) Přelít zbytek mixu z kroku h) a opakovat centrifugaci, vylít filtrát.
- l) Přidat 500 μ l Wash Solution (pozor – přidat požadované množství etanolu do pufru!) na kolonku, centrifugovat při max. otáčkách (16 000 \times g) 1 min, vylít filtrát.
- m) Přidat dalších 500 μ l Wash Solution na kolonku a centrifugovat při max. otáčkách 3 min (vysušení kolonky), filtrát se nesmí dostat na kolonku! (setřít filtrát, který se drží vně kolony).
- n) Přenést kolonku s membránou do nové 2,0 ml mikrozkušavky, opatrně přidat 100 μ l přehřátého (65 °C) elučního pufru (Elution Solution) přímo na střed membrány a centrifugovat při max. otáčkách (16 000 \times g) 1 min, vyhodit membránu (*eluze DNA*).
- o) Po extrakci DNA je nezbytné stanovení její kvality a kvantity pomocí spektrofotometru. Čistota DNA se hodnotí na základě stanovení poměru absorbance při 260 a 280 nm (čistá DNA má A_{260}/A_{280} 1,7-1,9).
- p) Zamrazit vzorky DNA (při -20 °C, pro dlouhodobé uchování při -80 °C).

2.3.2 PCR reakce

Technické vybavení potřebné pro real-timePCR

- ✓ Termocykler (Mx3005P qPCR System – Agilent Technologies) – obr. 3
- ✓ Počítač – řídicí jednotka termocykleru (součástí termocykleru)
- ✓ Software na vyhodnocení PCR reakcí (součástí termocykleru)
- ✓ Laminární RNA/DNA box (Captair Biocap RNA/DNA nebo Köttermann 8580)
- ✓ Minicentrifuga (BiosanMulti-Spin MSC-6000)
- ✓ Vortex (Techno Kartell TK3S)
- ✓ Centrifuga (na destičky) – není nezbytná (zkvalitnění práce)
- ✓ Plastové RNase-free mikrozkušavky 1,5 ml (Eppendorf) – příprava směsi
- ✓ Pipety - 0,2–2,0 μ l, 2–20 μ l, 20–200 μ l a 100–1000 μ l (Finnpipette), kompatibilní sterilní RNase-free špičky (nejlépe s filtrem – zabránění kontaminaci)
- ✓ Autokláv – sterilizace špiček, pipet, mikrozkušavek (Stolní laboratorní autokláv OT 032)
- ✓ Chladicí podložka nebo polyesterová nádoba na led
- ✓ PCR destičky – 96 jamek (Bio-Rad)

Metodika diagnostiky *Helminthosporium solani* v hlízách bramboru pomocí real-time PCR

- ✓ Jednorázové rukavice



Obr. 3 Termocykler Mx3005P qPCR

Chemikálie potřebné pro real-time PCR

- ✓ Druhově specifické primery a TaqMan sonda (syntéza firmou Generi Biotech, s.r.o. podle sekvencí uvedených v tab. 1)
- ✓ FastStart Universal Probe Master (ROX) [Roche Diagnostics, Mannheim, Germany, kat. č. 04913949001]
- ✓ FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) [Roche Diagnostics, Mannheim, Germany, kat. č. 04 913 850 001]
- ✓ DNase/RNase Free dH₂O (Sigma-Aldrich, kat. č. W4502)

Metodika diagnostiky *Helminthosporium solani* v hlízách bramboru pomocí real-time PCR

Tab. 1 Sekvence použitých primerů a TaqMan sondy pro *H. solani* a interní kontrolu

Název primeru	Sekvence primeru, sondy (5' - 3')	Poznámka
HsTqF1	GTTTCAGCGGCCGCAAG	<i>H. solani</i> (Cullen <i>et al.</i> , 2001)
HsTqR1	TTCAGATACAAGGGTTTAAGGGATTC	
HsTqP1	[Cy5] TCGGAACCCTCTGTCTACCTGTACCACTTGTT [BHQ2]	
MultiPot-F	GGTTTCGTAATGTTCCCTCACCAA	interní kontrola (Massart <i>et al.</i> , 2014)
MultiPot-R	AAAGGTATTTATCCAGCAGTAGATCCTT	
MultiPot-P	[VIC] CATGGTTGACGTTGAAT [MGBNFQ]	

Legenda: FAM – 6-carboxyfluorescein; Cy5 – 1-(5-karboxypentyl)-1'-methylindodikarbocyaninhalid N hydroxysukcinimidylester; VIC – 4,7,2'-trichloro-7'-phenyl-6-carboxyfluorescein; MGBNFQ – Minor Groove Binder Non fluorescent Quencher

Před zahájením přípravy PCR reakce nutno připravit:

- ✓ Naředit primery a sondu na pracovní koncentraci (10 µM) pomocí RNase-free dH₂O
- ✓ Rozpustit na ledu primery a sondu (pokud jsou již naředěné)
- ✓ Rozpustit na ledu složky reakčního kitu

Vlastní postup real-time PCR reakce

Všeobecné pokyny:

- všechny složky kitu FastStart Universal Probe Master (ROX) uchovávat v mrazničce, chránit před světlem
- používané chemikálie rozmrazit až těsně před použitím, promíchat (zvortexovat)
- rozmražené vzorky DNA udržovat při 0 °C na ledu, před odebráním určeného množství vždy promíchat
- namíchané vzorky udržovat při 0 °C na ledu nebo chladicí podložce
- pracovat sterilně (předcházení kontaminace reakcí)

Příprava reakční směsi (premixu)

Nejprve se do mikrozkuřavky (1,5 ml) připraví tzv. premix (namíchaná reakční směs pro všechny hodnocené vzorky bez DNA). Objemy jednotlivých komponent se musí vypočítat podle počtu analyzovaných vzorků. Do reakce se navíc zařadí pozitivní kontrola (standard) a negativní kontrola (NTC – bez templátu a DNA z negativní – zdravé rostliny). Reakce probíhaly v duplikátech pro eliminaci chybných výsledků. Je nutné počítat s rezervou 10 % pro kompenzaci možných chyb pipetováním. Po napipetování všech složek se premix pipetou dobře promíchá a krátce odstředí.

Metodika diagnostiky *Helminthosporium solani* v hlízách bramboru pomocí real-time PCR

Složení reakční směsi pro *H. solani* a interní kontrolu na jednu reakci (25 µl)

TaqMan real-time PCR:

• FastStart Universal Probe Master (ROX)	12,5 µl (1 ×)
• Primer HsTqR1 (10 µM)	0,75 µl (300 nM)
• Primer HsTqR1 (10 µM)	0,75 µl (300 nM)
• Sonda HsTqP1 (10 µM)	0,5 (200 nM)
• Primer MultiPot-F (10 µM)	0,75 µl (300 nM)
• Primer MultiPot-R (10 µM)	0,75 µl (300 nM)
• Sonda MultiPot-P (10 µM)	0,25 µl (100 nM)
• RNase Free dH ₂ O	6,75 µl
• DNA (5–10 ng/µl, ředěno 10×)*	2,0 µl

Sybr Green real-time PCR:

• FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)	12,5 µl (1×)
• PrimerHsTqR1/MultiPot-F (10 µM)	0,75 µl (300 nM)
• PrimerHsTqR1/MultiPot-R (10 µM)	0,75 µl (300 nM)
• PCR-grade dH ₂ O	9,0 µl
• DNA (5–10 ng/µl, ředěno 10×)†	2,0 µl

Nanesení reakční směsi (premixu) na destičku (96 jamek)

- Ze zásobního reakčního mixu napipetovat do každé jamky na destičce určené množství reakční směsi a k tomu přidat určený objem naředěné DNA hodnoceného vzorku. Pipetou DNA opatrně promíchat s premixem. PCR reakce probíhá v objemu 25 µl reakční směsi.
- Do několika jamek ke každému premixu přidat místo DNA pouze vodu (slepý vzorek = NTC – *no template control*) a DNA z negativní (zdravé) rostliny.
- Destičku uzavřít průhledným krytem.
- Destičku vhodné následně krátce stočit na centrifuze (1 500 × g) ve speciálním rotoru, aby stekl reakční mix ze stěn a odstranily se případné vzduchové bublinky.
- Pokud není možné provést PCR amplifikaci bezprostředně po přípravě, nutné napipetovanou destičku uložit krátkodobě v chladničce, eventuálně v mrazničce.

Nastavení pozice vzorků, popis vzorků a nastavení protokolu podmínek reakcí

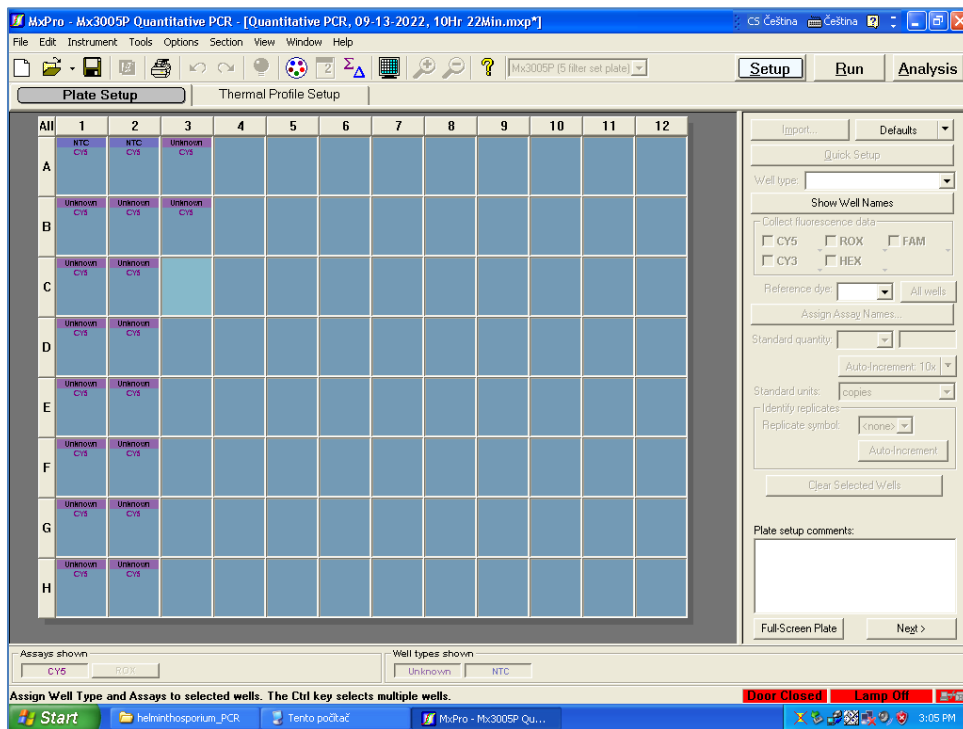
Reakce se provede v termocykleru Mx3005P qPCR System. Nastavení pozice testovaných vzorků, negativní a pozitivní kontroly v jednotlivých jamkách PCR-destičky (obr. 4), popis

*DNA analyzovaných vzorků se upraví na stejnou koncentraci. Do reakcí se DNA z analyzovaných vzorků naředí 1 : 10 (pro vyšší účinnost reakce).

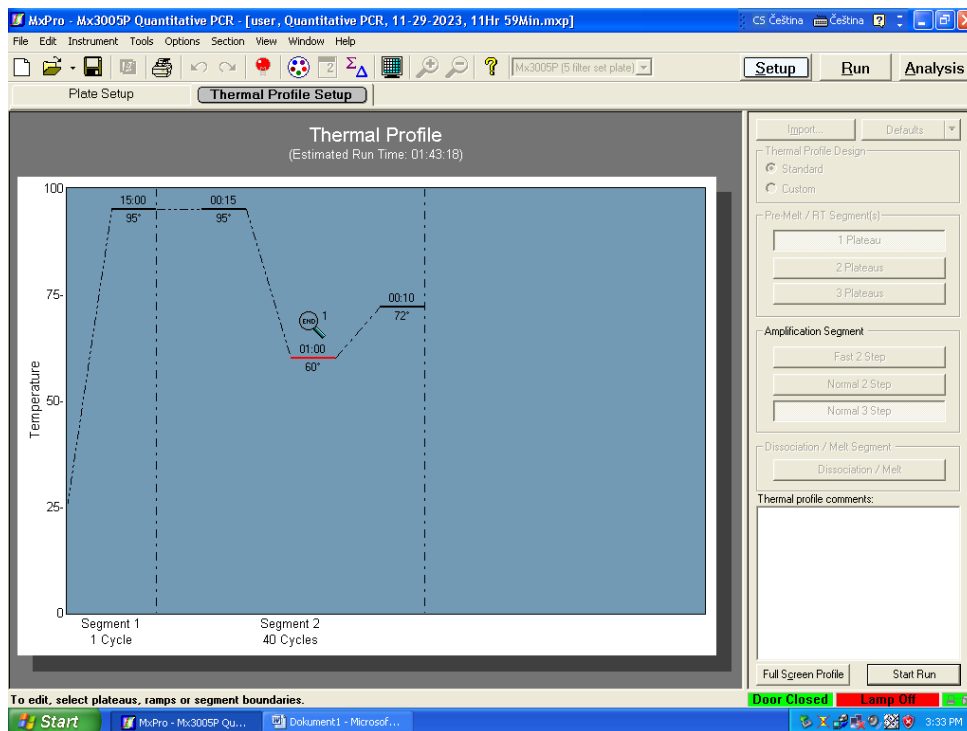
†DNA analyzovaných vzorků se upraví na stejnou koncentraci. Do reakcí se DNA z analyzovaných vzorků naředí 1 : 10 (pro vyšší účinnost reakce).

Metodika diagnostiky *Helminthosporium solani* v hlízách bramboru pomocí real-time PCR

vzorků a nastavení protokolu podmínek reakcí (obr. 5) se provede v příslušném softwaru, který je součástí termocykleru. Při použití jiného typu termocykleru se může vzhled a používání software lišit.



Obr. 4 Nastavení pozice vzorků a popis vzorků v softwaru termocykleru



Obr. 5 Nastavení protokolu podmínek TaqMan real-time PCR reakcí v softwaru termocykleru

Metodika diagnostiky *Helminthosporium solani* v hlízách bramboru pomocí real-time PCR

Reakční podmínky pro *H. solani* a interní kontrolu TaqMan real-time PCR:

Počet cyklů	Teplota (°C)	Čas
1	95	15 min
40	95	15 s
	60	60 s
	72	10 s

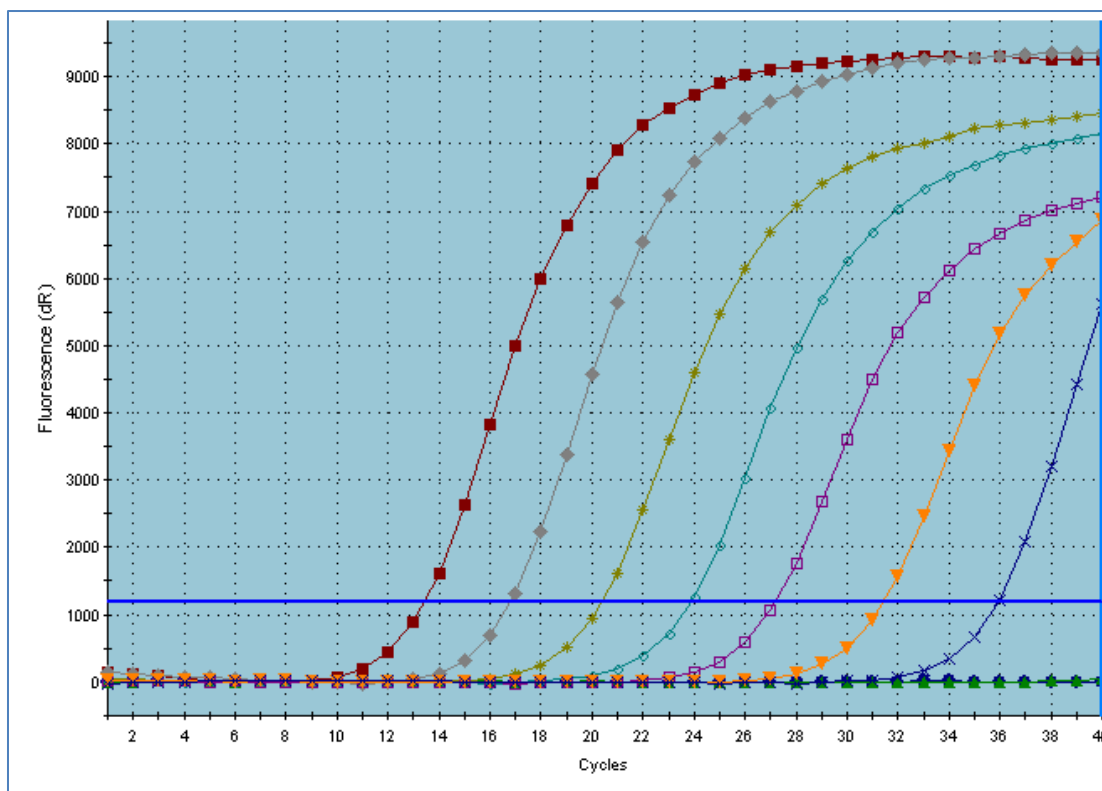
Sybr Green real-time PCR:

Počet cyklů	Teplota (°C)	Čas
1	95	10 min
40	95	15 s
	60	60 s
	72	5 s
1	95	30 s
	60	60 s
	95	30 s

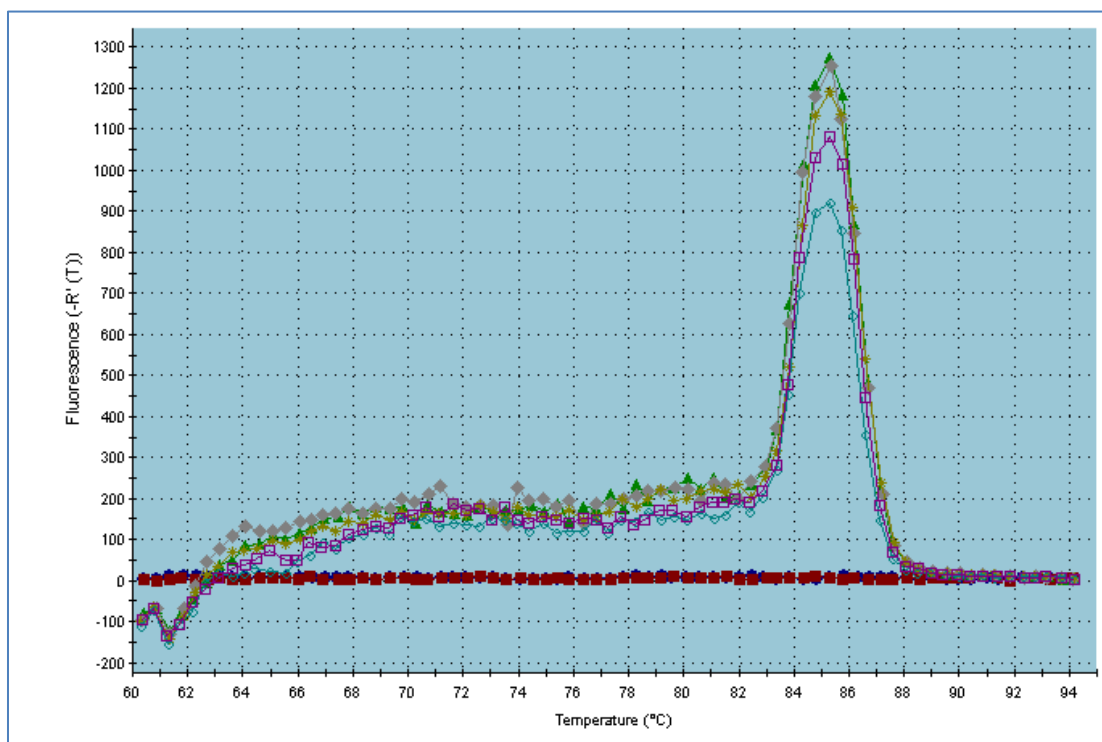
2.3.3 Vyhodnocení real-time PCR reakce

Na základě hodnot C_T (Threshold cycle) sledovaných vzorků, pozitivní kontroly (standard), interní kontroly a negativní kontroly (zdravá rostlina) se vyhodnotí real-time PCR reakce (obr. 6–10). Stanoví se, zda je testovaný vzorek daného druhu negativní nebo pozitivní na *H. solani*. Veškeré hodnoty C_t nižší než 35 jsou považovány za pozitivní. Vzorky na hranici detekce ($C_t = 35$) musí být překontrolovány opakováním PCR reakce. Interní standard (obr. 10) zařazený do testů, jehož C_t se pohybuje od 15 do 25 (průměrná hodnota C_t je 20) slouží ke kontrole kvality extrahované DNA a vzniku falešně negativních výsledků. U metody Sybr Green je nutné ověření specifity a čistoty produktů po posledním cyklu pomocí analýzy teploty tání (*melting analyse*) [obr. 7].

Metodika diagnostiky *Helminthosporium solani* v hlízách bramboru pomocí real-time PCR

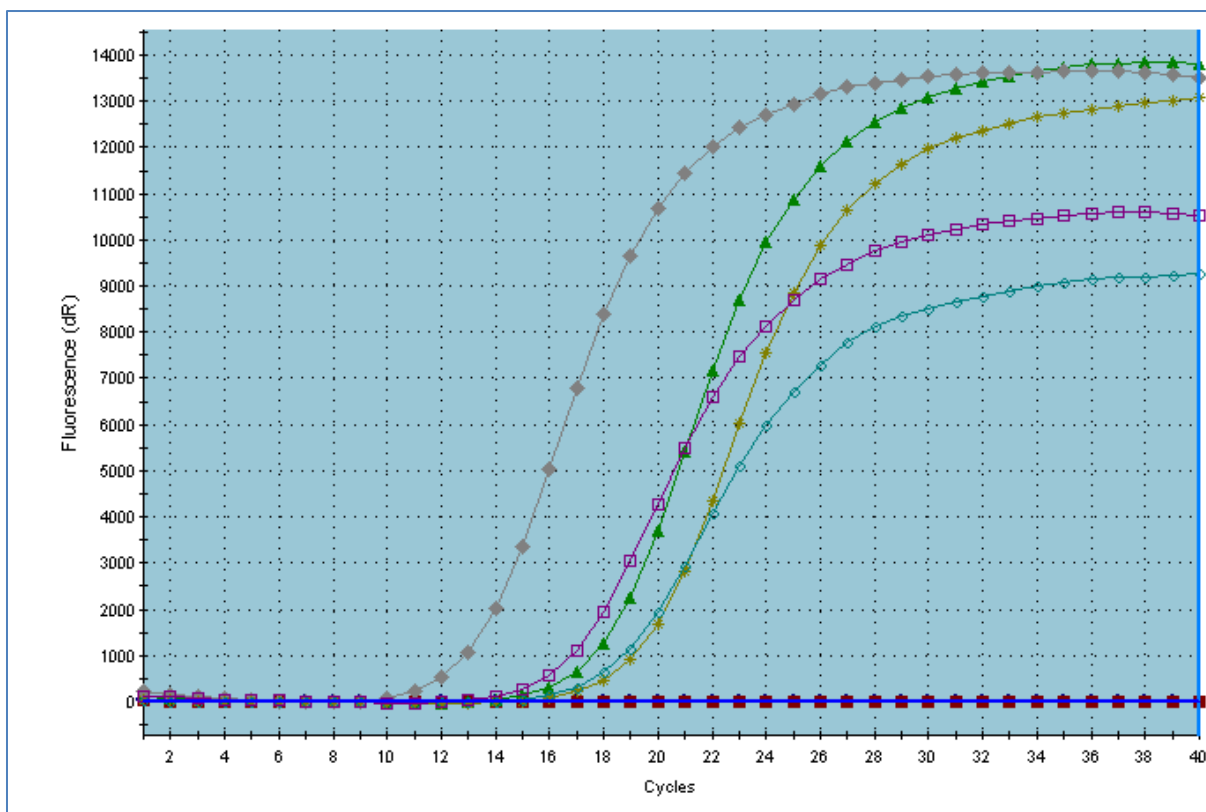


Obr. 6 Detekce *H. solani* pomocí Sybr Green real-time PCR (amplifikační křivky ředící řady, 1:1, 1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵ a 1:10⁶)

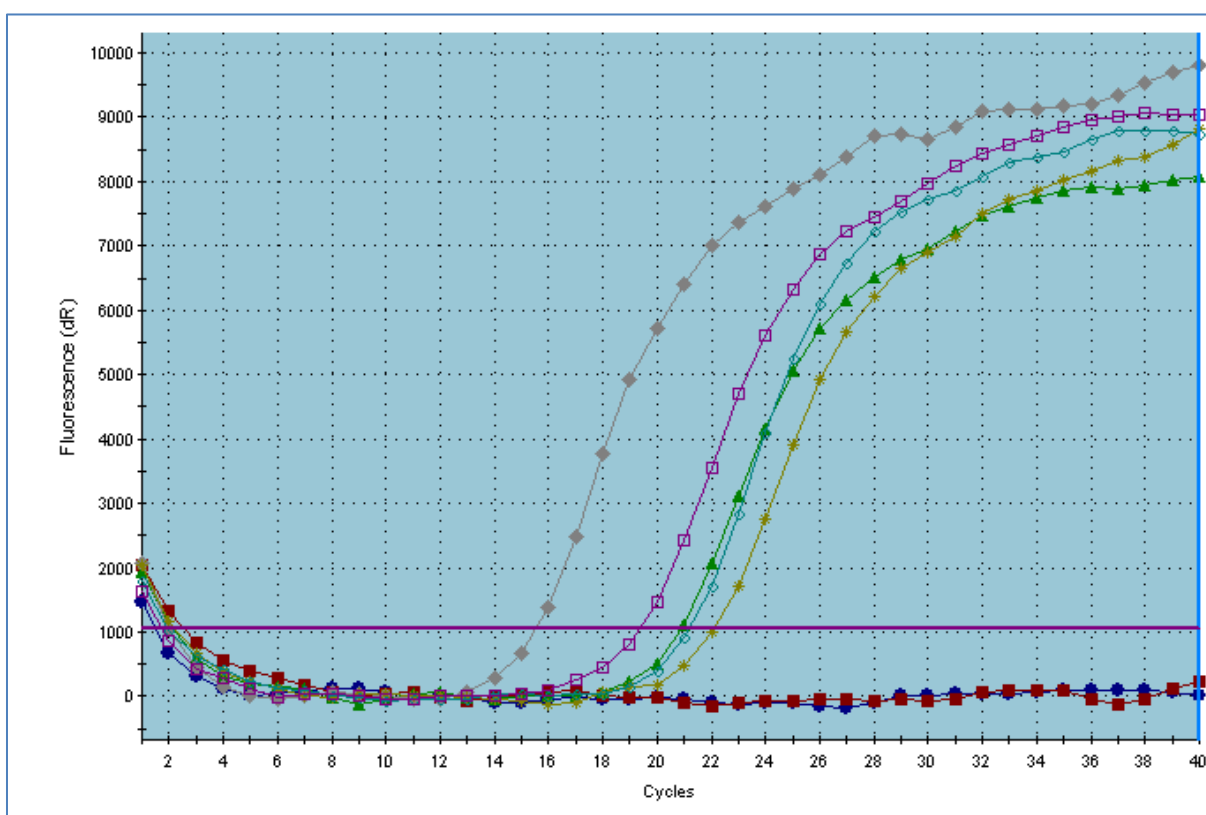


Obr. 7 Detekce *H. solani* metodou Sybr Green real-time PCR (disociační křivky)

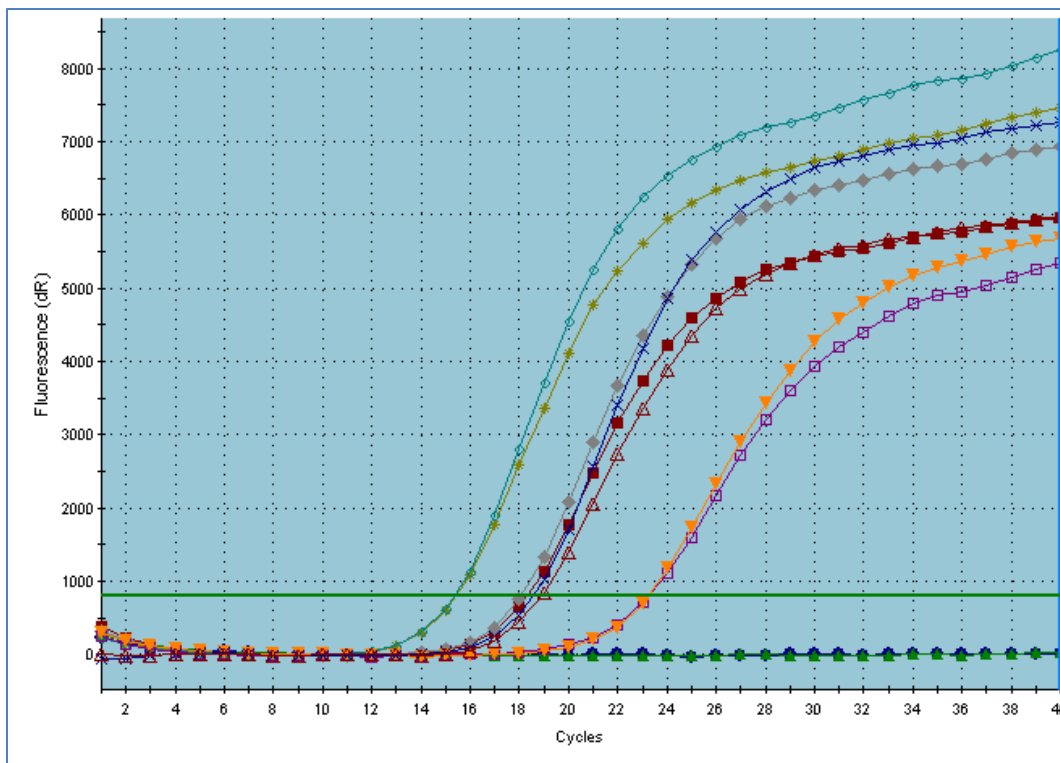
Metodika diagnostiky *Helminthosporium solani* v hlízách bramboru pomocí real-time PCR



Obr. 8 Detekce *H. solani* pomocí Sybr Green real-time PCR (amplifikační křivky)



Obr. 9 Detekce *H. solani* pomocí TaqMan real-time PCR (amplifikační křivky)



Obr. 10 Reakce vnitřního standardu v TaqMan real-time PCR (amplifikační křivky)

2.4 Příklad praktického využití

Do experimentů byly zařazeny hlízy bramboru se symptomy stříbřitosti slupky a kultury *H. solani* pocházející ze sbírky hub. Při extrakci DNA, zvláště při použití silikagelových kolonek komerčních extrakčních sad, vyvstává riziko jejich ucpávání bobtnavým škrobem, kterého hlízy bramboru obsahují velké množství. Z tohoto důvodu je nezbytné optimalizovat hmotnost navážky vzorku, aby nedocházelo k jejímu předimenzování a následnému ucpávání kolonek. Při těchto potížích může docházet k extrakci DNA o nízké kvalitě a kvantitě a následná PCR analýza může potom vykazovat falešně negativní výsledky. Pro správný průběh PCR reakcí byla stanovena koncentrace primerů a sond. Dalším úkolem bylo zjištění hranice detekce optimalizované real-time PCR metody. Pro toto zjištění byla vytvořena ředící řada (1:1, 1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵ a 1:10⁶) [obr. 6]. Ředící řada byla vytvořena ředěním DNA z odebraných segmentů slupky pozitivních a negativních vzorků hlíz bramboru.

Na základě všech provedených analýz byly všechny testované vzorky zařazené do experimentů specificky a spolehlivě diagnostikovány (tab. 3, obr. 7-9). Po vyhodnocení ředící řady byly veškeré hodnoty C_t nižší než 35 považovány za pozitivní a vyšší za negativní. Vzorky s hodnotou C_t 35 bylo nutné překontrolovat opakováním reakce. Pro duplex PCR reakce je vždy nezbytná optimalizace koncentrací primerů a sond. Po provedení PCR reakcí s různými poměry množství primerů a sond byla stanovena jejich optimální finální koncentrace, tj. 300 nM každého primeru pro *H. solani*, 200 nM TaqMan sondy pro *H. solani* a 300 nM každého primeru pro vnitřní standard, 100 nM TaqMan sondy pro vnitřní standard.

Metodika diagnostiky *Helminthosporium solani* v hlízách bramboru pomocí real-time PCR

Tab. 2 Citlivost detekce *H. solani* pomocí real-time PCR (průměrné hodnoty Ct)

Ředění	TaqMan real-time PCR		Sybr Green real-time PCR	
	Ct	+	Ct	+
1×	14,62	+	13,06	+
1:10	18,49	+	16,46	+
1:10 ²	21,59	+	19,77	+
1:10 ³	24,98	+	23,47	+
1:10 ⁴	29,99	+	26,74	+
1:10 ⁵	31,42	+	31,04	+
1:10 ⁶	34,31	+	34,28	+
K ⁻	No Ct	-	38,52	-
Blank (pufr)	No Ct	-	No Ct	-

Výsledky ředící řady (tab. 2) dále ukázaly velmi vysokou citlivost použité real-time PCR metody. Z výsledků je patrné, že testované vzorky byly všemi metodami specificky a spolehlivě detekovány. Mezi oběma variantami real-time PCR nebyly prokázány významné rozdíly za předpokladu odpovídající *melting* analýzy u varianty s využitím nespecifického barviva SYBR Green. Kvalita DNA a případná inhibice real-time PCR reakcí byla kontrolována zařazením vnitřního standardu do PCR. Reakce interního standardu prokázala kvalitní extrakci DNA. Použitý postup extrakce nukleových kyselin pomocí silikagelových kolonek byl vhodný pro získání DNA z hlíz bramboru o odpovídajících parametrech. Z hlediska kvality a kvantity DNA potřebné do PCR je výběr správného postupu extrakce DNA stěžejní a ovlivňuje exaktnost následných PCR analýz. Hlavním omezením pro použití diagnostických technik založených na PCR je výskyt falešně negativních výsledků kvůli nežádoucímu účinku inhibitorů PCR, reagensiím nebo dysfunkci termocykleru (Abu Al-soud *et Rådström*, 1998; Malorny *et al.*, 2004). Problémy může potencionálně způsobit kompetitivní amplifikační účinek, kdy velké množství jednoho DNA produktu inhibuje amplifikaci jiných DNA produktů (Boivin *et al.*, 2004). K ověřování negativních reakcí slouží tzv. vnitřní standard (Paterson, 2006), protože PCR může být inhibována přítomností polysacharidů a fenolických sloučenin obsažených v hlízách bramboru (van der Wolf *et al.*, 2001).

Tab. 3 Porovnání detekce *H. solani* pomocí TaqMan a Sybr Green real-time PCR

Testovaný vzorek	TaqMan real-time PCR		Sybr Green real-time PCR	
	Ct	+	Ct	+
V1 kultura	20,97	+	18,48	+
V3 hlíza	22,19	+	20,03	+
V4 hlíza	20,15	+	19,52	+
V5 hlíza	17,37	+	17,66	+
K+ (standard)	15,81	+	13,70	+
K-	No Ct	-	No Ct	-
Blank (pufr)	No Ct	-	No Ct	-

3 Srovnání „novosti postupů“

V metodice jsou uvedeny podrobné ověřené a optimalizované laboratorní manuály postupů detekce *H. solani* v hlízách bramboru nebo čisté kultuře pomocí real-time PCR (TaqMan a Sybr Green), které zahrnují přípravu vzorků, izolaci DNA, vlastní postup přípravy reakcí, kontrolu specificity a vyhodnocení výsledků. Příznaky stříbřitosti hlíz vyvolané *H. solani* jsou často zaměňovány s černou tečkovitostí bramboru způsobenou *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) S. Hughes, 1958, a proto mají význam exaktní laboratorní diagnostické metody nezávislé na vizuální kontrole. Obě onemocnění způsobují skvrny na slupce hlíz a často se vyskytují společně. Oba patogeny produkují tmavé mycelium a lze je rozlišit pouze na základě morfologie spor, a proto je sporulace nezbytná pro diagnostiku patogenů. Na základě našeho pozorování a údajů z publikací sporuluje *H. solani* na živném médiu velmi špatně a za poměrně dlouhou dobu. Konvenční mikrobiologický rozbor je díky tomu časově náročný a vyžaduje zkušenosti při mikroskopické identifikaci. Použité metody založené na PCR zvýší především rychlost a citlivost detekce *H. solani* a zajistí vyšší spolehlivost diagnostiky. Metody mohou pro svoji citlivost odhalit i počáteční infekce, které by byly jinak přehlíženy. Kvalitu extrahované DNA a případný vznik možných falešně negativních výsledků lze snadno kontrolovat pomocí vnitřní kontroly zařazené do testů. Protokoly byly optimalizovány pro použití v běžné diagnostické laboratoři vybavené zařízením pro molekulární biologii.

4 Popis uplatnění Certifikované metodiky

Optimalizované molekulární metody diagnostiky *H. solani* založené na PCR (tj. Sybr Green a TaqMan real-time PCR) uvedené v metodice jsou 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 určena pro pracoviště, která se zabývají diagnostikou patogenů rostlin, především pro akreditované diagnostické laboratoře státní správy, šlechtitelské organizace, výzkumné ústavy a zemědělskou praxi. Podrobné laboratorní protokoly uvedené v metodice mohou sloužit studentům středních a 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 *H. solani* je nezbytné pořízení speciálního přístrojového vybavení jako je termocykler pro real-time PCR (300–500 tis. Kč)
- Cena za extrakci DNA z jednoho vzorku pletiva bramboru potřebné pro real-time PCR je 50–150 Kč (dle zvolené extrakční sady).
- Vlastní náklady na detekci *H. solani* pomocí real-time PCR jsou 100–140 Kč (TaqMan, jeden test; dle zvolené reakční sady) nebo 20–50 Kč (Sybr Green; jeden test; dle zvolené reakční sady).

Ceny jsou kalkulovány na základě nejlevnější nabídky spotřebního materiálu, nezahrnují režie

Metodika diagnostiky *Helminthosporium solani* v hlízách bramboru pomocí real-time PCR

a jsou bez DPH. Metoda Sybr Green real-time PCR je v současnosti levnější z důvodu absence sondy, kterou vyžaduje TaqMan real-time PCR. Konvenční PCR je cenově srovnatelná s metodou Sybr Green real-time PCR. Vyžaduje však analýzu konečného produktu pomocí gelové elektroforézy.

H. solani snižuje především tržní hodnotu hlíz, vzhledem k rostoucí poptávce po praných hlízách, čímž může negativně ovlivnit trh s konzumními a sadbovými bramborami. Choroba může mít významný vliv na vývoz, zejména sadbových hlíz, protože na certifikovaných sadbových hlízách je povolena pouze omezená infekce *H. solani*. Během skladování může docházet ke snižování hmotnosti hlíz, protože slupka napadených hlíz má vyšší propustnost pro vodu. Hranolky a chipsy vyrobené z hlíz napadených mají často nepříjemné hnědé okraje. Včasná a citlivá detekce *H. solani* pomocí real-time PCR ve šlechtitelských a sadbových materiálech přispěje k eliminaci infekce, a tím ke snížení ekonomických ztrát daného podniku odhadovaných na cca 100 tis. Kč ročně.

6 Seznam použité související literatury

- Abu Al-Soud, W., Rådström, P. (1998). Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (10): 3748–3753.
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi* (4th ed). APS Press.
- Boivin, G., Côté, S., Déry, P., De Serres, G., Bergeron, M.G. (2004). Multiplex real-time PCR assay for detection of influenza and human respiratory syncytial viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (1): 45–51.
- 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(4), 387–398. <https://doi.org/10.1023/A:1011247826231>
- Denner, F. D. N., Millard, C., Geldenhuys, A., & Wehner, F. C. (1997). Treatment of seed potatoes with prochloraz for simultaneous control of silver scurf and black dot on progeny tubers. *Potato Research*, 40(2), 221–227. <https://doi.org/10.1007/BF02358247>
- Errampalli, D., Saunders, J. M., & Holley, J. D. (2001). Emergence of silver scurf (*Helminthosporium solani*) as an economically important disease of potato: Review: silver scurf of potato. *Plant Pathology*, 50(2), 141–153. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00555.x>
- Fahn, A. (1982). *Plant anatomy* (3rd rev. ed). Pergamon Press.
- Firman, D. M., & Allen, E. J. (1995a). Effects of seed size, planting density and planting pattern on the severity of silver scurf (*Helminthosporium solani*) and black scurf (*Rhizoctonia solani*) diseases of potatoes. *Annals of Applied Biology*, 127(1), 73–85. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1995.tb06652.x>
- Firman, D. M., & Allen, E. J. (1995b). Transmission of *Helminthosporium solani* from potato seed tubers and effects of soil conditions, seed inoculum and seed physiology on silver scurf disease. *The Journal of Agricultural Science*, 124(2), 219–234. <https://doi.org/10.1017/S0021859600072890>

Metodika diagnostiky *Helminthosporium solani* v hlízách bramboru pomocí real-time PCR

- Frazier, M. J., Shetty, K. K., Kleinkopf, G. E., & Nolte, P. (1998). Management of silver scurf (*Helminthosporium solani*) with fungicide seed treatments and storage practices. *American Journal of Potato Research*, 75(3), 129–135. <https://doi.org/10.1007/BF02895847>
- Heiny, D. K., & McIntyre, G. A. (1983). *Helminthosporium solani* Dur. & Mont. Development on potato periderm. *American Potato Journal*, 60 (10), 773–789. <https://doi.org/10.1007/BF02856896>
- Hide, G. A., & Adams, M. J. (1980). Relationships between disease levels on seed tubers, on crops during growth and in stored potatoes. 3. Silver scurf. *Potato Research*, 23(2), 229–240. <https://doi.org/10.1007/BF02356271>
- Holley, J. W., & Kawchuk, L. W. (1996). Distribution of thiabendazole and thiophanate-methyl resistant strains of *Helminthosporium solani* and *Fusarium sambucinum* in Alberta potato storages. 76, 21–22.
- Hunger, R. M., & McIntyre, G. A. (1979). Occurrence, development, and losses associated with silver scurf and black dot on Colorado potatoes. *American Potato Journal*, 56(6), 289–306. <https://doi.org/10.1007/BF02855598>
- Jellis, G. J., & Taylor, G. S. (1974). The relative importance of silver scurf and black dot: Two disfiguring diseases of potato tubers. 14, 97–112.
- Jellis, G. J., & Taylor, G. S. (1977). The development of silver scurf (*Helminthosporium solani*) disease of potato. *Annals of Applied Biology*, 86(1), 19–28. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1977.tb01811.x>
- Kutuzova, I. A., Kokaeva, L. Yu., Pobendinskaya, M. A., Krutyakov, Yu. A., Skolotneva, E. S., Chudinova, E. M., & Elansky, S. N. (2017). Resistance of *Helminthosporium solani* strains to selected fungicides applied for tuber treatment. *Journal of Plant Pathology*, 99(3). <https://doi.org/10.4454/jpp.v99i3.3950>
- Malorny, B., Paccassoni, E., Fach, P., Bunge, C., Martin, A., Helmuth, R. (2004). Diagnostic realtime PCR for detection of *Salmonella* in food. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (12): 7046–7052.
- Massart, S., Nagy, C., Jijakli, M.H. (2014). Development of the simultaneous detection of *Ralstonia solanacearum* race 3 and *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by a multiplex real-time PCR assay. *Eur J Plant Pathol*, 138: 29–37.
- Mérida, C. L., & Loria, R. (1994). Survival of *Helminthosporium solani* in soil and in vitro colonization of senescent plant tissue. *American Potato Journal*, 71(9), 591–598. <https://doi.org/10.1007/BF02851524>
- Mičuda, S.; Fuksa, L.; Brčáková, E.; Cermanová, J. & Geršl, V. (2006). Molekulárně biologické metodiky ve farmakologii. [Cit. 21. 9. 2011]. Dostupné na [www: http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/micuda/real-PCR.htm](http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/micuda/real-PCR.htm).
- Paterson, R.R.M. (2006). Internal amplification controls have not been employed in fungal PCR hence potential false negative results. *J. Appl. Microbiol.*, 102: 1–10. Raclavský, V. (2003). Metody molekulární genetiky. [cit. 23. 9. 2011]. Dostupné na <http://biologie.upol.cz/metody/>.
- Rodriguez, D. A., Secor, G. A., Gudmestad, N. C., & Franci, L. J. (1996). Sporulation of *Helminthosporium solani* and infection of potato tubers in seed and commercial storages. *Plant Disease*, 80, 1063–1070.

Metodika diagnostiky *Helminthosporium solani* v hlízách bramboru pomocí real-time PCR

- Rodriguez, D. A., Secor, G. A., Gudmestad, N. C., & Grafton, K. (1995). Screening tuber-bearing *Solanum* species for resistance to *Helminthosporium solani*. *American Potato Journal*, 72(11), 669–679. <https://doi.org/10.1007/BF02849176>
- Secor, G. A., & Gudmestad, N. C. (1999). Managing fungal diseases of potato. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 21(3), 213–221. <https://doi.org/10.1080/07060669909501184>
- Sethuraman, K., Ramakrishnan, G., & Balasubramanian, A. (1997). A leafspot disease of *Solanum elaeagnifolium* caused by *Helminthosporium solani*. 84, 561.
- Van der Wolf, J.M., van Beckhoven, J.R.C.M., Bonanats, P.J.M., Schoen, C.D. (2001). New technologies for sensitive and specific routine detection of plant pathogenic bacteria. In: De Boer, S. H. ed. *Plant Pathogenic Bacteria*. Dordrecht: Kluwer, 77–79.
- Wale, S., Platt, B. H. W., & Cattlin, N. D. (2008). *Diseases, pests and disorders of potatoes: A colour handbook*. Manson publ.

7 Seznam vybraných publikací, které předcházely metodice

- Dědič, P., Kmoch, M., Krpáková, A. (2016). Alternativní metody a postupy laboratorní diagnózy *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Certifikovaná metodika (osvědčení UKZUZ 6700/2016-MZE-17221). První vydání. Havlíčkův Brod: Výzkumný ústav bramborářský, Poradenský svaz "Bramborářský kroužek". Praktické informace č. 60. ISBN 978-80-86940-68-7.
- Dědič, P., Kmoch, M., Mertelík, J. (2016). Detection of PSTVd originating from ornamental plants by qRT-PCR and Luminex xTAG technology. In: 16th EAPR Virology section meeting, 8th Annual meeting of PVY-Wide organization, May 31 – Jun 3, 2016, Ljubljana, Slovenia. Abstracts p. 79.
- Kmoch, M. (2018). Detekce PVY (*Potato virus Y*) v listech a hlízách bramboru pomocí TaqMan real-time RT-PCR. *Úroda LXVI* (12, vědecká příloha): 205–208. ISSN 0139-6013.
- Kmoch, M. (2019). Zjišťování přítomnosti PVY (*Potato virus Y*) v sadbových hlízách bramboru pomocí real-time RT-PCR. In: *Osivo a sadba - XIV. národní odborný a vědecký seminář: sborník referátů*. Praha: Česká zemědělská univerzita, katedra rostlinné výroby, s. 144–149. ISBN 978-80-213-2732-0.
- Kmoch, M., Binderová, D., Kopačka, V., Vacek, J., Brázdová, S., Petrzik, K., Ševčík, R. (2020). Metodika diagnostiky bakterií *Pectobacterium atrosepticum* a *Dickeya solani* pomocí realtime PCR. Certifikovaná metodika (osvědčení UKZUZ 217957/2020). Vydání první. Havlíčkův Brod: Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s. r. o. 27 s. ISBN: 978-80-86940-90-8.
- Kmoch, M., Dědič, P. (2015). Molekulární metody detekce viroidu vřetenovitosti hlíz bramboru (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd). *Úroda, LXIII* (12, vědecká příloha): 195-198. ISSN 0139-6013.
- Kmoch, M., Dědič, P. (2018). Metodika detekce PSTVd (*Potato spindle tuber viroid*) v bramboru a okrasných rostlinách pomocí Real-Time RT-PCR a technologie Luminex. Certifikovaná metodika (osvědčení UKZUZ 155885/2018). První vydání. Havlíčkův Brod: Výzkumný ústav bramborářský. ISBN 978-80-86940-79-3.
- Kmoch, M., Dědič, P. (2020). Metodika detekce Y viru bramboru (*Potato virus Y*) v listech a hlízách pomocí metod založených na PCR. Certifikovaná metodika (osvědčení UKZUZ

Metodika diagnostiky *Helminthosporium solani* v hlízách bramboru pomocí real-time PCR

224027/2020). Vydání první. Havlíčkův Brod: Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s. r. o. 27 s. ISBN: 978-80-86940-85-4.

Název titulu: Metodika diagnostiky *Helminthosporium solani* v hlízách bramboru pomocí real-time PCR

Certifikovaná metodika

Autoři: Ing. Martin Kmoch, Ph.D.
Mgr. Věra Loubová
Bc. Marie Veselská
Ing. Barbora Jílková, Ph.D.
RNDr. Ludmila Holková, Ph.D.

Vydavatel: Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s. r. o., Dobrovského
2366, CZ-580 01 Havlíčkův Brod., Česká republika

Vydání: První, 2023

Počet stran: 25

Náklad: 200 ks

Tisk: Tiskárna Havlíčkův Brod

Text neprošel jazykovou úpravou.

ISBN: 978-80-88614-02-9

© Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o., 2023

Publikace nesmí být přetiskována vcelku nebo po částech, přenášena nebo uváděna do oběhu pomocí elektronických, mechanických, fotografických či jiných prostředků bez výslovného souhlasu autorů.