

**Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský**

**Národní referenční laboratoř**



**Bulletin 2023**

**Ročník XXVII, číslo 2/2023**

**Brno 2023**

## **Obsah**

### **Diagnostika původce verticiliového vadnutí chmele v rostlinném materiálu a v půdě**

Iveta Svobodová, Hana Orságová, Kateřina Tománková, Eva Bergová, Jakub Beránek,  
Václav Čermák

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ODŠOR Olomouc, Šlechtitelů 773/23,  
779 00 Olomouc

Za obsah příspěvku odpovídají autoři.

# Diagnostika původce verticiliového vadnutí chmele v rostlinném materiálu a v půdě

*Iveta Svobodová, Hana Orságová, Kateřina Tománková, Eva Bergová, Jakub Beránek,  
Václav Čermák*

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský  
ODŠOR Olomouc, Šlechtitelů 773/23, 779 00 Olomouc  
iveta.svobodova@ukzuz.cz

## 1. Úvod

Nedávná taxonomická revize rodu *Verticillium* rozdělila *V. albo-atrum* sensu lato na tři různé druhy: *V. albo-atrum* sensu stricto, *V. nonalfalfae* (VNA) a *V. alfalfae*. *Verticillium nonalfalfae* infikuje několik hostitelů včetně chmele, brambor, petúnie a špenátu, mezi další hostitele patří také dvouděložné plevely, a jeho výskyt je hlášen z Kanady, Kubu, Japonska, Německa, Slovinska a Velké Británie. V České republice byl tento patogen poprvé zjištěn v roce 2017 na dvou chmelnicích v Olomouckém kraji v okrese Přerov a v roce 2021 na jedné chmelnici v Ústeckém kraji v okrese Louny. *Verticillium albo-atrum* sensu stricto napadá hlavně brambory a *Verticillium alfalfae* vojtěšku. Dalším druhem, který je běžný a rozšířený patogen ve většině mírných a subtropických oblastí na mnoha bylinách a dřevinách včetně chmele, je *V. dahliae*.

Verticiliové vadnutí chmele se objevuje v mírné nebo letální formě onemocnění. Letální vadnutí je způsobeno vysoce virulentními patotypy *V. nonalfalfae*, které jsou v současné době přítomny pouze v Anglii, Německu a Slovinsku. Zprávy o mírných infekcích verticiliového vadnutí chmele existují z Belgie, Francie, Německa, Polska, Slovinska a mimo Evropu z Nového Zélandu a USA (Oregon), způsobených buď *V. dahliae* nebo méně virulentními kmeny *V. nonalfalfae*. Patogeny se šíří půdou a rostlinným materiálem. V současné době neexistuje účinné kurativní ošetření, ale pouze preventivní opatření, které má zabránit zavlečení patogenů na nové plochy, popřípadě zabránit jeho šíření v již napadených chmelnicích.

Cílem metodiky je diagnostika původce verticiliového vadnutí chmele (*Humulus lupulus*) *Verticillium nonalfalfae* (dříve *V. albo-atrum* sensu lato) a *Verticillium dahliae* ve vzorcích rostlinného materiálu metodou morfologie a v půdě pomocí real-time PCR. Real-time PCR test umožňuje současnou přímou detekci obou původců ve vzorku půdy a lze jej využít i pro potvrzení výsledků u vzorků rostlinného materiálu.

## 2. Detekce a identifikace VNA v rostlinném materiálu mikroskopicky

Identifikace druhů rodu *Verticillium* je možná morfologicky pomocí světelné mikroskopie po předchozí izolaci a kultivaci patogenu na živném médiu PDA. V případě potřeby lze čistou houbovou kulturu identifikovat také pomocí real-time PCR.

### 2.1 Příznaky

Projev onemocnění závisí kromě virulence patogenů také na citlivosti kultivarů a ekologických faktorech. Mezi příznaky nemoci, které jsou známé u obou forem onemocnění, patří:

a) žloutnutí, hnědnutí a vadnutí listů, které je iniciováno na bázi rostliny a pokračuje směrem nahoru. Změna barvy listů začíná mezi hlavními žilkami a následuje okrajová a intervenální nekróza. Okraje listů se stáčí nahoru a postižené listy velmi snadno opadávají (obr. 1).

b) hnědé zbarvení cévních svazků, viditelné na řezu do výšky 30–40 cm nad zemí (obr. 2). Rostliny zůstávají pevně ukotveny v půdě.

#### 2.1.1 Mírná forma

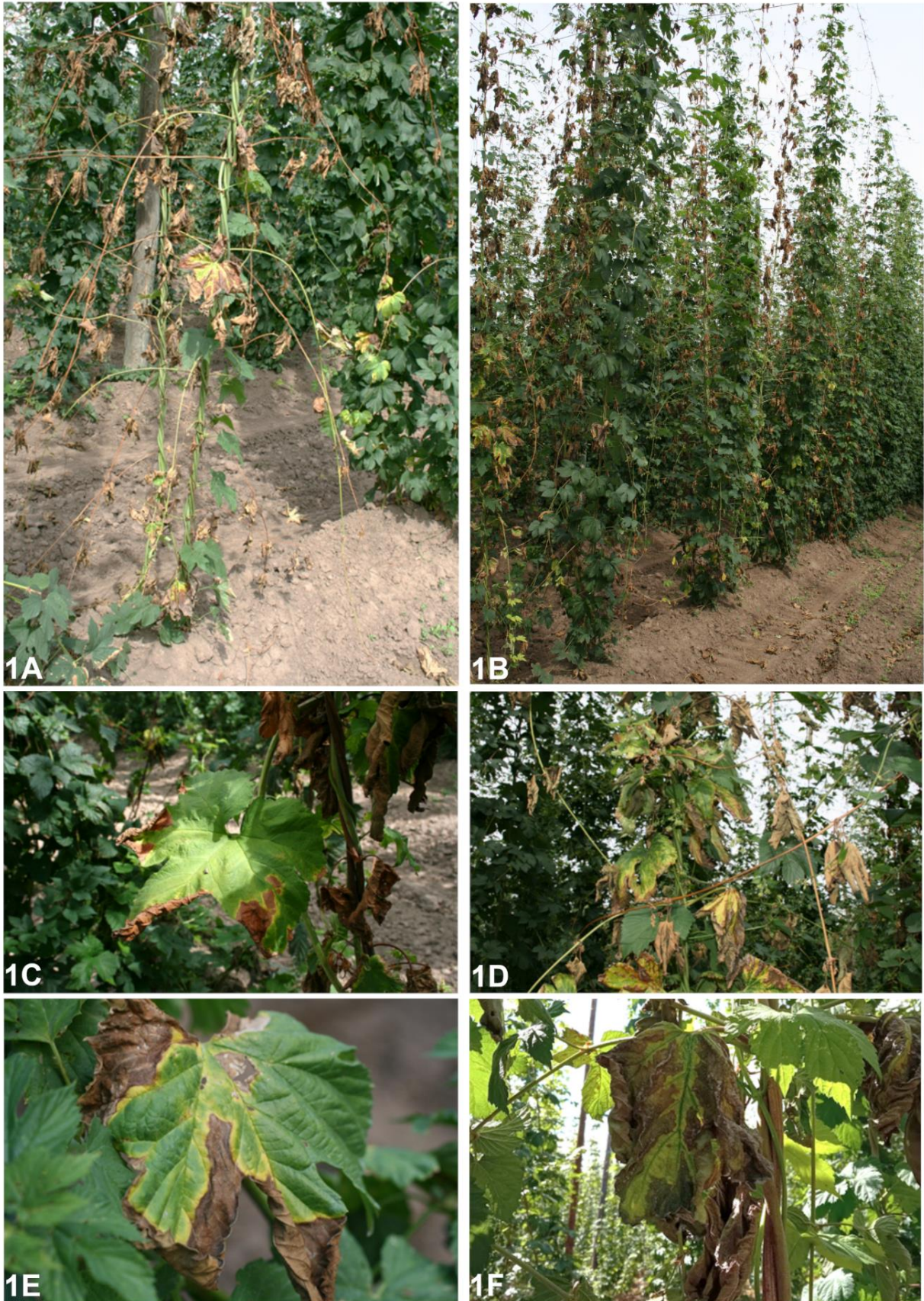
Vyvíjí se u citlivých kultivarů chmele při infekci *V. dahliae* nebo méně virulentními izoláty *V. nonalfalfae* nebo u infekce tolerantních / rezistentních kultivarů vysoce virulentními izoláty *V. nonalfalfae*. Onemocnění se liší od sezóny k sezóně a jen zřídka způsobuje odumření rostlin. Rostliny postižené v jednom vegetačním roce tak mohou v příštím vegetačním roce vypadat zdravě. Postižené rostliny jsou obvykle rozptýleny po chmelnici a výskyt příznaků je spojen s nadměrnou vlhkostí půdy. První příznaky na listech se objevují koncem července nebo začátkem srpna a postihují pouze některé části rostlin. Boční výhonky vyrůstající z hlavního výhonu s postiženými listy často nevykazují žádné příznaky. Obvykle dochází k hnědnutí a korkovatění hlavního výhonu a zhnědnutí cévních svazků.

#### 2.1.2 Letální forma

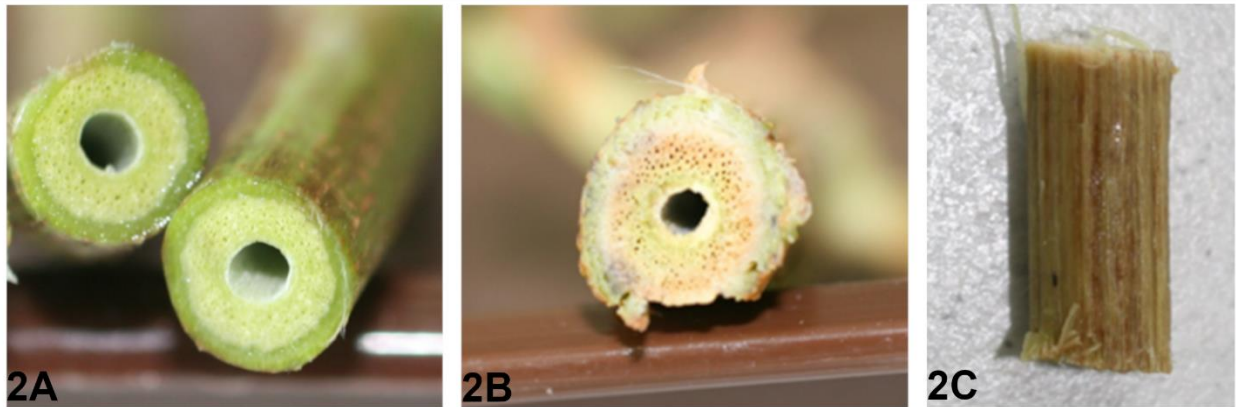
Průběh choroby je v porovnání s mírnou formou rychlejší a vážnější, a to zejména u náchylných odrůd. Patogen se vyskytuje v ohniscích a způsobuje rozsáhlé a rychlé odumírání listů i postranních výhonků, což nakonec vede k odumření celé rostliny (obr. 1A, 1B, 1D). Hned od počátku je patrné hnědé zbarvení cévních svazků. Postižené rostliny, které přezimují, často v příští sezóně vytvoří jen několik slabých výhonů, které již začátkem června odumírají. Rostliny infikované v průběhu vegetačního roku obvykle vykazují první příznaky ve fázi tvorby šišek.

#### 2.1.3 Možnost záměny

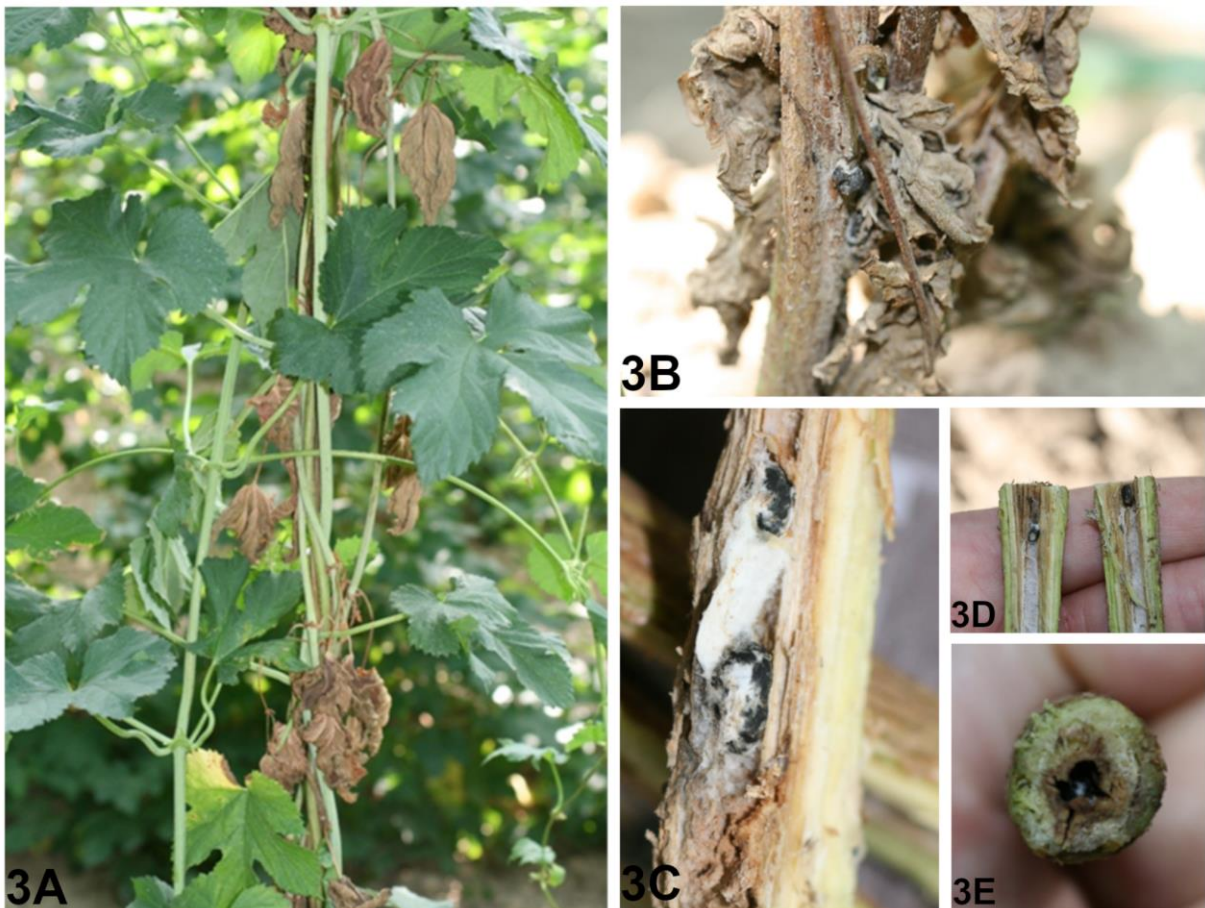
Ve chmelnici se mohou nacházet rostliny, které mají nekrotické listy bez typické barevné změny (žloutnutí a hnědnutí listů mezi žilnatinou) nebo jsou již celé nekrotické (obr. 3A). Tyto rostliny mohly být poškozeny mechanicky při pravidelných mechanizačních pracích ve chmelnici. Zda není rostlina podříznutá lze ověřit zatáhnutím za rostlinu. V případě, že rostlina mechanicky poškozená není, ale lze ji snadno vytáhnout z půdy i s kořeny, se může jednat o napadení houbovým patogenem rodu *Fusarium* (nejčastěji *F. sambucinum*), při němž dochází k poškození kořenového systému, a rostlina tak nedrží v půdě. Dále se u takových rostlin prohlíží báze, kde již mohou být vytvořena sklerocia houbového patogenu *Sclerotinia sclerotiorum*. Tato sklerocia můžeme nalézt také v napadených výhonech, které mohou být již úplně nekrotické nebo ještě zelené, ale po rozstříhnutí mají hnědý střed, ve kterém se tvoří husté bílé mycelium patogenu a sklerocia (obr. 3B, 3C, 3D, 3E).



**Obr. 1:** A, B: Příznaky napadení rostlin letální formou *V. nonalfalae*; C: Změna barvy listů začínající mezi hlavními žilkami; D: Odumírající výhony s listy s typickým příznakem intervenální nekrózy; E, F: List s typickým příznakem intervenální nekrózy.



**Obr. 2:** A – Příčný řez zdravým výhonem; B – Příčný řez napadeným výhonem; C – Napadený výhon po odstranění pokožky.



**Obr. 3:** A – Nekrotické listy bez typické intervenální nekrózy. Příčinou může být houbový patogen rodu *Fusarium* nebo mechanické poškození rostliny; B, C, D, E – Příznaky napadení *Sclerotinia sclerotiorum*: B – Vytvořená sklerocia na bázi napadeného výhonu; C – Odumřelý výhon s vytvořenými sklerocii; D – Mycelium a sklerocia uvnitř výhonu; E – Hnědnutí středu výhonu, tvorba mycelia a sklerocií.

## 2.2 Odběr vzorku

Odběr se provádí v době vegetace, nejlépe v červenci a srpnu. V každé chmelnici se vždy prohlíží všechny rostliny. Přednostně se odebírají vzorky z příznakových rostlin, ale je možné odebrat vzorky i z rostlin bezpříznakových. Napadené cévní svazky rostlin se nachází těsně nad zemí do výšky cca 30–40 cm. Pro laboratorní analýzu se vždy odebírají minimálně dva segmenty z této spodní části výhonů o délce min. 10–15 cm a uzavřou se nejlépe do plastového zip sáčku. Před odesláním do laboratoře se uchovávají v chladu (v ledničce).

### Pomůcky:

- Zahradnické nůžky
- Plastové zip sáčky
- Dezinfekce v rozprašovači (70% ethanol)
- Lihový fix
- Návleky na obuv

Při odběru vzorku ve chmelnici se používají jednorázové návleky na obuv nebo je obuv po odběru vzorku důkladně očištěna od ulpělé půdy a dezinfikována (70% ethanol). Po odběru každého vzorku se dezinfikuje nářadí (nůžky) a ruce (70% ethanol).

## 2.3 Příprava vzorku pro analýzu

Pro analýzu se používají části výhonu s napadenými cévními svazky. V případě, že nejsou ideálně pod lupou či stereomikroskopem pozorovány poškozené cévní svazky, použije se pro kultivaci část z báze výhonu.

Po očištění vzorku od hrubých nečistot se vzorek omyje demineralizovanou vodou (u silnějších výhonů se nejprve odstraní pokožka) a povrchová desinfekce se provádí roztokem 1 % chlornanu sodného po dobu 3–5 min. Poté se vzorek oplachuje v demineralizované vodě po dobu 1 min a osuší savým papírovým ubrouskem.

## 2.4 Izolace a kultivace na živném médiu

Pomůcky, zařízení a chemikálie:

- Skalpel
- Pinzeta
- Laminární box
- Dezinfekce v rozprašovači (70% ethanol)
- Nůžky
- Petriho misky (plast / sklo, 9 mm)
- Potato dextrose agar (PDA, příprava dle doporučení výrobce)
- Inkubátor

Izolace patogenu se provádí v laminárním boxu, kde se dezinfikované části pletiva rostlin rozstříhají na 0,5–1 cm velké kousky a za pomoci sterilní pinzety se přenesou na pevné živné médium PDA. Na jednu Petriho misku se dává cca. 5–7 kousků pletiva rostlin. Inkubace probíhá při teplotě 22±2 °C ve tmě. Během 3–5 dnů lze při úspěšné izolaci patogenu pozorovat narůstající bílé nadýchané mycelium (obr. 4A). V průběhu inkubace se kontroluje, zda nedošlo ke kontaminaci.

Kolonie s podezřením na rod *Verticillium* jsou přeneseny v laminárním boxu na nové živné médium PDA, kde jsou dále kultivovány za účelem morfologické identifikace. Kultivace probíhá opět při teplotě 22±2 °C ve tmě. Petriho misky se prohlíží každý den a po několika dnech (dle rychlosti růstu patogenu za cca. 2–4 dny) lze pozorovat rostoucí kulturu. Hodnocení růstových charakteristik se provádí po 7–14 dnech. Během kultivace se kontroluje, zda nedošlo ke kontaminaci. Pokud dojde ke kontaminaci, růstu několika houbových kultur nebo je nutné pro potřeby morfologické identifikace použít jiné živné médium (Prune lactose yeast agar), než bylo použito pro izolaci patogenu, části mycelia z okraje kolonie o velikosti cca. 0,5–1 cm<sup>2</sup> se přenesou na nové živné médium. Do Petriho misky se vloží vždy 1 kousek homogenního mycelia. Toto se provádí opět ve sterilních podmínkách laminárního boxu. Kultivace probíhá za výše uvedených podmínek.

## 2.5 Morfologická identifikace

### 2.5.1 Růstové charakteristiky na živném médiu PDA

Přístroje a pomůcky:

- Krycí a podložní sklíčka
- Demineralizovaná voda
- Preparační jehla
- Mikroskop
- Lihový kahan

Po 3–5 dnech inkubace tvoří *Verticillium nonalfalfae* i *V. dahliae* bílé, nadýchané mycelium (obr. 4A). Po 1–2 týdnech dochází v důsledku tvorby klidových struktur ke ztmavnutí kultur (obr. 4B, 4C, 4D, 4E). Kolonie *Verticillium nonalfalfae* dosahují na PDA po dvou týdnech kultivace velikosti 35–55 mm, kolonie *Verticillium dahliae* 40–60 mm.

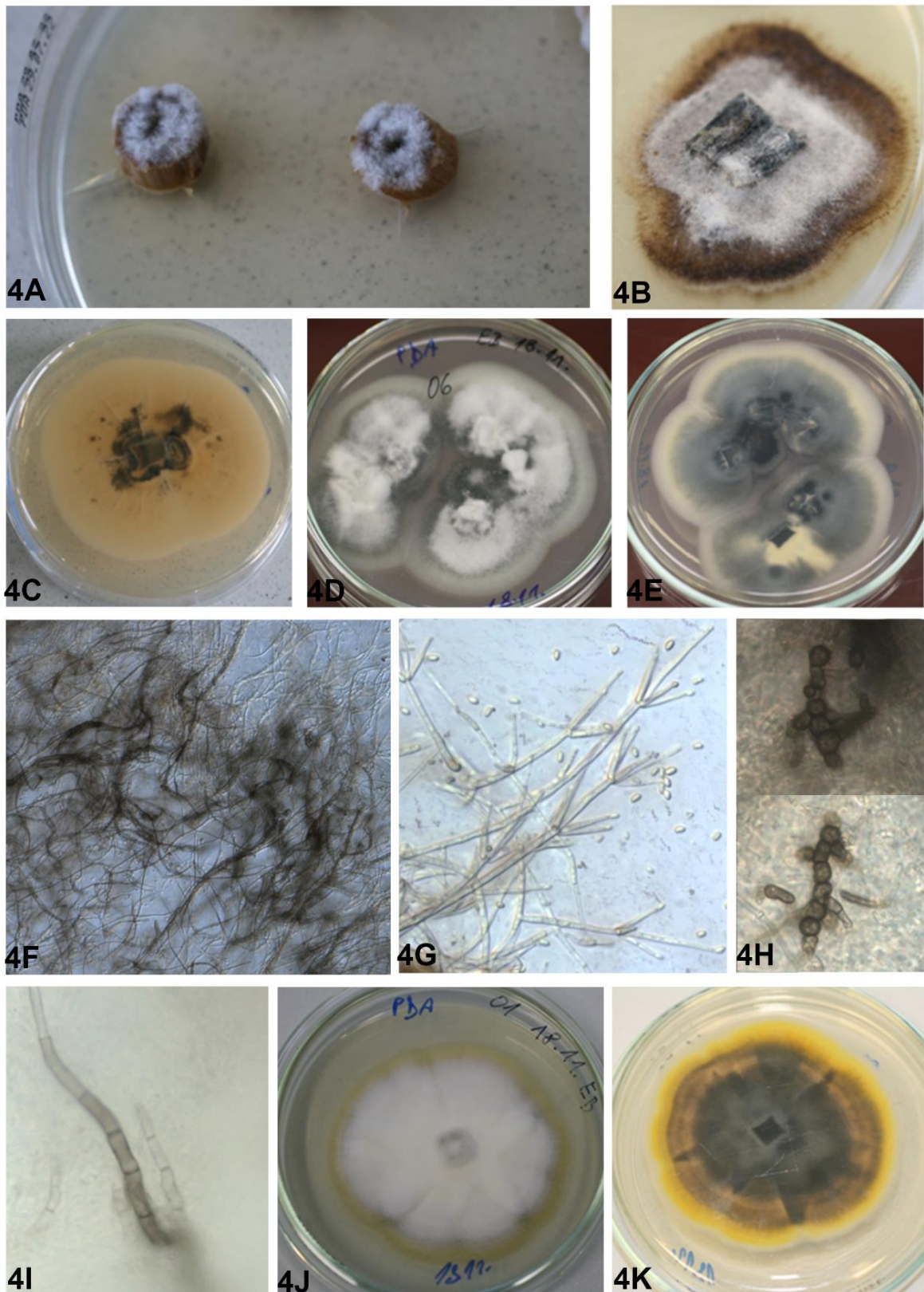
### 2.5.2 Mikroskopické vyhodnocení

Nejnápadnějším znakem rodu *Verticillium* jsou verticiliové konidiofory (obr. 4G). Další identifikace je založena na tvorbě charakteristických klidových struktur (tab. 1, obr. 4H, 4I).

#### 2.5.2.1 *Verticillium nonalfalfae*

*Verticillium nonalfalfae* tvoří hyfy široké 1,5–3 µm, konidiofory jsou vztyčené, rozvětvené nebo nerozvětvené, fialidy uspořádané ve 2–6 přeslenech, obvykle 2–5 fialid v každém přeslenu. Konidie jsou bezbarvé, jednobuněčné, válcovitého až oválného tvaru, velikosti (4.0–) 6.0 (-10.5) x (2.5–) 3.0 (-3.5) µm. Klidové mycelium (obr. 4F, 4I) je ponořeno do agaru a skládá se z hnědých pigmentovaných silnostěnných hyf až 9 µm širokých, rovných nebo zahnutých. Mikrosklerocia chybí. *V. nonalfalfae* nelze morfologicky rozlišit od *V. alfalfae*.





**Obr. 4:** A – Tvorba mycelia *V. nonalfalae* na napadených výhonech po třech dnech kultivace na PDA; B, C – *V. nonalfalae* na PDA po 10 dnech kultivace; D, E – *V. dahliae* na PDA po 10 dnech kultivace; F – mycelium *V. nonalfalae*, zvětšeno 200x; G – Verticiliový konidiofor *V. nonalfalae*, zvětšeno 400x; H – mikrosklerocia *V. dahliae*, zvětšeno 400x; I – klidové mycelium *V. nonalfalae*, zvětšeno 400x; J, K – *V. tricorpus* na PDA po 10 dnech kultivace.

### 2.5.2.2 *Verticillium dahliae*

*Verticillium dahliae* tvoří hyfy široké 2–4 µm, konidiofory jsou vztyčené, rozvětvené nebo nerozvětvené, fialidy uspořádané do 2–3 přeslenů, obvykle 2–4 fialidy v každém přeslenu. Konidie jsou bezbarvé, jednobuněčné, válcovitého až oválného tvaru, velikosti (3.5-) 6.5 (-13.5) x (2.0-) 3.0 (-4.5) µm. Mikrosklerocia jsou složená z kulatých, hnědě pigmentovaných buněk (jedna buňka může být až 13 µm široká) a jsou ponořena do agaru. Morfologické vlastnosti *V. dahliae* jsou podobné druhu *V. longisporum*, kromě menší velikosti konidií.

### 2.5.2.3 Možnost záměny s jinými druhy

Není pravděpodobné, že by kultury získané z infikovaného pletiva chmele, produkující buď klidové mycelium (*V. nonalfalfae*) nebo mikrosklerocia (*V. dahliae*) byly zaměňovány s jinými druhy *Verticillium*. Výjimkou je pouze méně patogenní druh *V. tricorpus*. Ten ovšem kromě klidového mycelia a mikrosklerocií produkuje ještě další klidové struktury - tzv. chlamydospory, na PDA tvoří žlutooranžový pigment jasně viditelný u mladých kolonií a méně intenzivní po dlouhé kultivaci (tab. 1, obr. 4J, 4K).

Rod *Verticillium* zahrnuje sedm dalších rostlinných patogenních druhů, jejichž výskyt je však omezen na jiné hostitele.

**Tab. 1:** Přehled identifikačních znaků druhů rodu *Verticillium* vyskytujících se na chmelu, po 7–14 dnech kultivace ve tmě při teplotě 22±2 °C.

	<i>Verticillium nonalfalfae</i>	<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Verticillium tricorpus</i>
Žluto-oranžový pigment	ne	ne	<b>ano</b>
Klidové mycelium	<b>ano</b>	ne	ano
Mikrosklerocia	ne	<b>ano</b>	ano
Chlamydospory	ne	ne	<b>ano</b>

### 3. Detekce a identifikace VNA v půdě metodou real-time PCR

Metodika přímé detekce *V. nonalfalfae* a *V. dahliae* v půdních vzorcích je založena na kombinaci velkokapacitní extrakce DNA a TaqMan real-time PCR. Pro detekci patogenu ve vzorcích půdy nelze využít standardní metody, které jsou využitelné pro vzorky rostlinného materiálu, a to z důvodu obsahu velkého množství rozmanitých půdních organismů (bakterií, hub) ve vzorku, od nichž nelze hledané patogeny jednoduše izolovat tak, aby mohly být následně morfologicky identifikovány. Možnost spolehlivé detekce patogenu v půdě také vyžaduje zpracování dostatečně objemného vzorku.

Velkokapacitní extrakce DNA z půdních vzorků využívá k jejich zpracování automatickou míchačku barev zn. Merris, díky níž lze analyzovat větší objemy vzorků (metoda umožňuje pohodlné zpracování půdy o hmotnosti 50 g, zatímco standardní dostupné metody extrakce DNA z půdy jsou schopny zpracovat mnohonásobně menší množství, obvykle do 1 g). Vlastní extrakce DNA je po odstranění proteinů a koncentrační fázi prováděna pomocí komerčního kitu zn. Promega vyvinutého pro vzorky, z nichž je DNA obtížně purifikovatelná. Princip purifikace DNA tímto kitem je založen na využití paramagnetických částic, díky nimž je účinnější než standardní extrakční metody kolonkového typu. Půdní vzorky obsahují velké množství huminových kyselin (vysokomolekulární organické sloučeniny obsažené v humusu, vznikající při rozkladu odumřelých rostlin vlivem mikroorganismů), které mají podobné fyzikálně-chemické vlastnosti jako DNA, kvůli čemuž není snadné je od sebe běžně používanými extrakčními metodami oddělit. Huminové kyseliny fungují jako inhibitory PCR reakce a jejich přítomnost v roztoku extrahované DNA znemožňuje molekulární diagnostiku vzorku.

Real-time PCR detekční test zahrnuje test pro současnou detekci a identifikaci *V. nonalfalfae* a *V. dahliae* v multiplexním uspořádání, a samostatný test pro kontrolu správně provedené extrakce DNA a její dostatečné kvality a koncentrace (tzv. interní PCR kontrola, IPC) detekující eukaryotickou DNA, která by měla ve vzorku být vždy přítomna (gen pro syntézu 18S rRNA). Tato kontrola se provádí ke každému testovanému vzorku a slouží k indikaci kvality a kvantity extrahované DNA.

Provedení analýzy vyžaduje vhodné prostory pro provádění analýz s odpovídajícím molekulárně-biologickým vybavením a předpokládá základní znalosti správné laboratorní praxe a principů molekulárně-biologických metod, jako je extrakce DNA a real-time PCR včetně vyhodnocení dat.

#### 3.1 Odběr vzorku

Odběr půdních vzorků z chmelnic lze provádět celoročně. Přednostně se odebírá půda z blízkosti příznakových rostlin, v množství cca. 0,5 kg do plastového sáčku.

##### Pomůcky:

- Nářadí vhodné pro odběr půdy (např. sázecí lopatka)
- Plastové zip sáčky
- Dezinfekce v rozprašovači (70% ethanol)
- Lihový fix
- Návleky na obuv

Při odběr vzorku ve chmelnici se používají jednorázové návleky na obuv nebo je obuv po odběru vzorku důkladně očištěna od ulpělé půdy a dezinfikována (70% ethanol). Po odběru každého vzorku se náradí dezinfikuje (70% ethanol).

### 3.2 Příprava vzorku pro analýzu

Vzorkem pro laboratorní analýzu je 50 g suché půdy. V případě, že je odebraná půda mokrá či vlhká, nechá se předem vysušit (např. nechat v otevřeném igelitovém pytli 1–2 dny nebo podle potřeby při laboratorní teplotě). Takto vysušená půda se proseje přes síto s velikostí ok 2 mm pro odstranění hrubších pevných částic a odváží se 50 g laboratorní vzorek do 250ml centrifugační lahve. V případě, že půda není ihned zpracována, skladuje se do začátku analýzy v chladu při  $8 \pm 4$  °C.

### 3.3 Extrakce DNA

Přístroje a zařízení:

- Výrobník ledu
- Centrifuga s rotorem pro 6 x 50 ml zkumavky s nastavitelnými otáčkami
- Centrifuga s rotorem pro 24 x 1,5 ml zkumavky s nastavitelnými otáčkami
- Automatická třepačka (např. Merris Minimix Auto)
- Vortex
- Horizontální třepačka (např. Gyro Rocker)
- Termoblok pro 1,5ml zkumavky s třepáním
- Digestoř (pro práci s Acid washed silica)
- Váhy s rozsahem pro 50 g
- Magnetický stojánek pro 1,5ml zkumavky (např. MagneSphere® Technology Magnetic Separation Stand, Promega, kat.č. Z5342)

Chemikálie:

- Antifoam B (Sigma, kat.č. A5757)
- Wizard® Magnetic DNA purification System for Food kit, 200 reakcí (Promega, kat. č. FF3750)
- Lysis buffer A, 3 ks pro 200 reakcí (Promega, kat. č. A8191)
- Isopropanol

Roztoky: (\*složení a příprava jsou uvedeny v příloze 1):

- Soil CTAB pufr \*
- 5M octan draselný \*
- Acid washed silica \*
- TE pufr
- 75% ethanol

#### Pomůcky:

- 250ml centrifugační lahve z materiálu PPCO
- 50ml, 2ml a 1,5ml plastové zkumavky
- 5ml, 1ml, 200 $\mu$ l automatické pipety včetně sterilních špiček s filtrem
- Pasteurovy pipety
- Ocelové kuličky ( $\varnothing$  20 mm, typ AISI 316 odolný vůči korozi)
- Savý papír/buničina
- Síto o velikosti ok 2 mm

#### Postup:

1. Do 250ml centrifugační lahve vložit 50 g prosáté vysušené půdy, přidat 6 ocelových kuliček, 100 ml Soil CTAB pufru a 3 ml Antifoam B. Pevně zašroubovat víko a obsah promíchat jemným převrácením lahve.
2. Lahve umístit do automatické třepačky a spustit 4minutový třepací program.
3. Získaný homogenát promíchat převrácením lahve.
4. 50 ml homogenátu přelít do 50ml centrifugační zkumavky. Pokud je homogenát hodně pěnlivý, použít k tomu 5ml pipetu.
5. Centrifugovat 5 min při 5000 g při laboratorní teplotě.
6. Opatrně pipetou přenést 20 ml čistého supernatantu (bez zbytků nahoře i bez usazenin dole) do nové 50ml zkumavky. Jestliže supernatantu je méně než 20 ml, opakovat krok 4 a 5 s dalšími 50 ml homogenátu, dokud nebude k dispozici celkem 20 ml supernatantu.
7. Přidat 2 ml 5M octanu draselného a zvortexovat.
8. Inkubovat 10 min v ledové tříšti.
9. Centrifugovat 5 min při 12000 g při laboratorní teplotě.
10. Připravit novou 50ml zkumavku a v digestoři přidat 15 ml isopropanolu a 800  $\mu$ l Acid washed silica (použít špičku s uřezaným koncem, předem důkladně promíchat, dbát na to, aby před otevřením nezůstal na stěnách suchý usazený prášek, který je snadno vdechovatelný a je karcinogenní!).

Následující manuální kroky (11–24) jsou prováděny v digestoři:

11. K připravené směsi opatrně (bez pelety) přelít supernatant. Dobře uzavřít víčko.
12. Zkumavky horizontálně třepat (např. položené v krabici, aby se nekutálely) na třepačce 10 min při 70 ot./min.
13. Centrifugovat 5 min při 12000 g při laboratorní teplotě.
14. Odstranit supernatant, zkumavky nechat chvíli stát otevřené dnem vzhůru na savém papíru.
15. Přidat 2 ml Lysis Buffer A (z kitu) a pelet resuspendovat vortexováním.
16. Pasteurovou pipetou vše přenést a rozdělit do 2 ks 1,5ml zkumavek.
17. Inkubovat 5 min při 65 °C a 300 rpm.
18. Centrifugovat 5 min při 12000 g při laboratorní teplotě.
19. Do nové 2ml zkumavky dát 250  $\mu$ l Buffer B (z kitu). (Pro 2 zkumavky jednoho vzorku se připraví jedna 2ml zkumavka).

20. Přidat 1 ml supernatantu, vortexovat dokud nezmléční / nezbělá.
21. Přidat 750 µl Precipitation buffer (z kitu), zvortexovat.
22. Centrifugovat 10 min při 13000 g při laboratorní teplotě.
23. Připravit novou 1,5ml zkumavku s 600 µl isopropanolu a 50 µl předem důkladně zvortexovaných MagneSil kuliček (z kitu, použít špičku se zastříženým koncem).
24. Přidat 750 µl čistého supernatantu (bez případného materiálu plovoucího na hladině supernatantu).

Konec práce v digestoři.

25. Promíchat 10–15x převrácením zkumavky.
26. Inkubovat 5 min při laboratorní teplotě, občas promíchat.
27. Zkumavku umístit do magnetického stojánku, inkubovat 1 min.
28. Zkumavku ponechat ve stojánku, odstranit supernatant.
29. Zkumavku vytáhnout ze stojánku, přidat 250 µl Buffer B, vortexovat, inkubovat 1 min v magnetickém stojánku.
30. Zkumavku ponechat ve stojánku, odstranit supernatant.
31. Zkumavku vytáhnout ze stojánku, přidat 1 ml 75% ethanolu, vortexovat, inkubovat 1 min v magnetickém stojánku.
32. Zkumavku ponechat ve stojánku, odstranit supernatant.
33. Zkumavku vytáhnout ze stojánku, přidat 1 ml 75% ethanolu, vortexovat, inkubovat 1 min v magnetickém stojánku.
34. Zkumavku ponechat ve stojánku, odstranit supernatant.
35. Zkumavku vytáhnout ze stojánku, přidat 1 ml 75% ethanolu, vortexovat, inkubovat 1 min v magnetickém stojánku.
36. Zkumavku ponechat ve stojánku, odstranit supernatant.
37. Zkumavku krátce stočit a znovu umístit do magnetického stojánku, po 1 min inkubace důkladně odstranit všechn supernatant.
38. Zkumavku přenést do termobloku a inkubovat s otevřeným víčkem 10 min při 65 °C.
39. Přidat 50 µl TE pufru, promíchat, inkubovat 5 min při 65 °C.
40. Zkumavku umístit na 1 min do magnetického stojánku.
41. Zkumavku ponechat ve stojánku, čistý supernatant s DNA přenést do nové 1,5 ml zkumavky.
42. Vyizolovanou DNA uchovávat při -20, popř.  $-80 \pm 4$  °C.
43. Zbytky nezpracovaného vzorku se likvidují jako karanténní odpad. Použité ocelové kuličky a centrifugační lahve jsou dekontaminovány ponořením do roztoku 1% chlornanu sodného alespoň na 60 min (nebo přes noc). Následně jsou umyty a 2x propláchnuty kohoutkovou vodou a nakonec 1x demineralizovanou vodou, poté se nechají uschnout a autoklávují se.

### 3.4 Real-time PCR

Přístroje a zařízení:

- Laminární box pro přípravu mastermixu
- PCR box pro práci s extrahovanou DNA
- Termocykler pro real-time PCR
- Mikrocentrifuga pro 1,5ml zkumavky a 0,2µl PCR zkumavky / PCR destičky
- Minitřepačka
- Sady pipet v jednotlivých boxech vč. vhodných sterilních špiček (0,1-2 µl, 2-20 µl, 20-200 µl a 100-1000 µl)
- Mrazicí box

Pomůcky:

- Mikrozukavky pro přípravu mastermixu (0,5 – 1,5ml)
- 0,2 ml PCR optické mikrozukavky/ stripy / destičky vhodné pro real-time PCR vč. vhodného stojánku
- Laboratorní rukavice bez pudru (latexové, popř. nitrilové)

Chemikálie:

- Voda v kvalitě pro molekulární biologii
- Luna Universal Probe qPCR mastermix, New England Biolabs, kat. č. M3004
- Primery a sonda pro detekci 18S rDNA (interní PCR kontrola):  
18Suni-F: 5'- GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAA -3'  
18Suni-R: 5'- CCACCACCCATAGAATCAAGA -3'  
18Suni-P: 5'-6-FAM-ACGGAAGGGCACCACCAGGAGT – BHQ1-3'
- Primery a sonda pro detekci *V. nonalfalvae*:  
Vaa\_f: 5'-GGC TTT TGC TTT CTC TTG-3'  
Vaa\_r: 5'-GAC CAA ATG TAA TTG TCC AG-3'  
Vaa\_probe: 5'-FAM-CGG CTA CGG CTC ATG CTA AC-BHQ1-3'
- Primery a sonda pro detekci *V. dahliae*:  
Vd\_f: 5'-GGC TCA AGT TAA CTA CGG-3'  
Vd\_r: 5'-CTG TCA TGT ATA TAA GAT ACT ACT G-3'  
Vd\_probe: 5'-HEX-AGG TAT AAG GTC CAT ATC CAA CAC GAG-BHQ1-3'

#### 3.4.1 Příprava reakce

Real-time PCR reakce se provádí ve dvou opakováních v reakčním objemu 10 µl popř. vyšším dle možností konkrétního real-time PCR přístroje. Složení mastermixu pro přípravu 10µl reakční směsi pro simultánní detekci *V. nonalfalvae* a *V. dahliae* je uvedeno v tab. 2, reakční směs pro interní PCR kontrolu je uvedena v tab. 3. Ke každé sadě vzorků testovaných v rámci jednoho PCR běhu je přidána negativní amplifikační kontrola (NAC; místo DNA extraktu vzorku se přidá voda použitá pro přípravu reakční směsi) a pozitivní amplifikační kontrola (PAC; místo DNA extraktu vzorku se přidá směs DNA z čisté kultury *V. nonalfalvae*

a *V. dahliae* extrahované např. s využitím komerčního kitu vhodného pro extrakci DNA z houbového mycelia).

**Tab. 2:** Složení real-time PCR směsi pro *V. nonalfalfae* a *V. dahliae*.

Reagencie	Objem v $\mu$ l	Výsledná koncentrace
Sterilní voda	1	-
Luna Universal Probe qPCR mastermix (2x)	5	1x
primer Vaa_f (10 $\mu$ M)	0,4	400nM
primer Vaa_r (10 $\mu$ M)	0,4	400nM
sonda Vaa_probe (10 $\mu$ M)	0,2	200nM
primer Vd_f (10 $\mu$ M)	0,4	400nM
primer Vd_r (10 $\mu$ M)	0,4	400nM
sonda Vd_probe (10 $\mu$ M)	0,2	200nM
DNA extrakt	2	-

**Tab. 3:** Složení real-time PCR směsi pro 18S rDNA (interní PCR kontrola).

Reagencie	Objem v $\mu$ l	Výsledná koncentrace
Sterilní voda	2	-
Luna Universal Probe qPCR mastermix (2x)	5	1x
primer 18Suni-F (10 $\mu$ M)	0,4	400nM
primer 18Suni-R (10 $\mu$ M)	0,4	400nM
sonda 18Suni-P (10 $\mu$ M)	0,2	200nM
DNA extrakt	2	-

Použitý mastermix je vhodný pro rychlou variantu protokolu ("fast protocol"). Specifická real-time PCR reakce i interní PCR kontrola probíhají odděleně při stejných reakčních podmínkách (obvykle v rámci jednoho PCR běhu): počáteční denaturace 95 °C 1 min, 50 cyklů (95 °C 15 s, 60 °C 30 s).

### 3.4.2 Vyhodnocení:

Za pozitivní se považuje takový výsledek, kdy všechna opakování testu téhož vzorku vykazují exponenciální amplifikační křivku závislosti fluorescence na čase, resp. reakčním cyklu. Za negativní se považuje takový výsledek, u něž nevzniknou v žádném opakování testu téhož vzorku exponenciální křivky.

Test je validní, jestliže:

- PAC je pozitivní a její Cq hodnota odpovídá očekávanému výsledku.
- NAC je negativní.
- Test interní PCR kontroly musí pro každý vzorek vyjít pozitivně a zároveň by měla Cq hodnota odpovídat očekávanému intervalu. Při dodržení stanoveného postupu by se Cq hodnota interní kontroly měla pohybovat do 20 (nejčastěji v rozmezí 13-18, závisí na charakteru analyzované půdy). V případě Cq hodnoty vyšší než 20 nebo při neexponenciálním sklonu amplifikační křivky (i jen nepatrně méně prudký sklon



v porovnání s PAC) je doporučeno testovat i 10x ředěný DNA extrakt (pro naředění případných PCR inhibitorů).

Vzorek je diagnostikován pozitivně na přítomnost *V. nonalfalfae* a/nebo *V. dahliae*, pokud jeho výsledek ve specifickém real-time PCR testu je pozitivní. S ohledem na skutečnost, že ve vzorcích půdy lze očekávat velmi nízkou koncentraci hledaných patogenů s C<sub>q</sub> hodnotami vyššími než 30, mohou mít C<sub>q</sub> hodnoty všech opakování téhož vzorku širší rozptyl, než je u běžného real-time PCR testu obvyklé.

Vzorek je diagnostikován negativně na přítomnost *V. nonalfalfae* a/nebo *V. dahliae*, pokud jeho výsledek ve specifickém testu je negativní.

Jestliže výsledek testu není jednoznačný, např. jeden technický replikát vzorku je pozitivní, druhý negativní, real-time PCR test se zopakuje pro ověření výsledku, nejlépe ve více opakováních. Při velmi nízké koncentraci patogenu ve vzorku nemusí vyjít všechny technické replikáty vzorku pozitivně. V případě pochybností při vyhodnocení testu je vhodné provést opakovanou analýzu vzorku včetně nové extrakce DNA.

### 3.5 Optimalizace metody

Metoda extrakce DNA byla převzata z publikace Woodhall *et al.*, 2012 popisující velkokapacitní extrakci DNA z půdy pro detekci *Sclerotium cepivorum* a přizpůsobena a optimalizována.

Vstupní navážka půdy byla pro snazší manipulovatelnost se vzorkem snížena z publikovaných 250 g na 50 g a eluční objem byl pro maximalizaci výtěžku tak, aby bylo možné diagnostikovat co nejnižší množství patogenu v půdním vzorku, upraven z 200 µl doporučených výrobcem kitu na 50 µl. Testován byl také vliv zvýšení objemu paramagnetických částic sloužících k purifikaci DNA na trojnásobek, avšak tato modifikace neměla pozitivní vliv na výtěžek DNA. Real-time PCR detekční test byl převzat z dříve publikované metody určené pro detekci *V. nonalfalfae* a *V. dahliae* v rostlinách chmele (Maurer *et al.*, 2013) a je přizpůsoben k použití pro půdní vzorky, u nichž se předpokládá velmi nízká koncentrace patogenu (půdní patogeny obecně). Je uveden také v diagnostickém standardu EPPO PM 7/78 (EPPO, 2020) jako doporučený test pro diagnostiku v rostlinném materiálu. Vzhledem k tomu, že v rostlinném materiálu lze oba patogeny spolehlivě detekovat a identifikovat po kultivaci na živném médiu pomocí morfologie, předkládaná metodika přímou molekulární diagnostiku v rostlinném materiálu nezahrnuje.

V rámci optimalizace real-time PCR testu byly porovnány různé koncentrace primerů a sond, reakční objemy 10 µl a 20 µl a dva různé mastermixy pro real-time PCR (Luna Universal Probe qPCR mastermix, New England Biolabs a TaqMan Universal PCR Master Mix, No amperase UNG, Applied Biosystems). Zatímco ani zvýšení koncentrace primerů a sond na maximum doporučené výrobcem kitu, ani zvýšení reakčního objemu nemělo významný vliv na výkonnost testu, použití Luna mastermixu se projevilo jako klíčové pro kombinaci s optimalizovanou metodou extrakce DNA. Při použití TaqMan mastermixu byla pozorována úplná inhibice PCR reakce u neředěných extraktů DNA, zatímco s Luna mastermixem byly neředěné extrakty DNA amplifikovány. Počet reakčních cyklů byl zvýšen z výrobcem doporučených 45 na 50 pro lepší vizualizaci amplifikačních křivek s ohledem na očekávané vysoké hodnoty C<sub>q</sub> (cca 30–40).

### 3.6 Validace metody

Každá diagnostická metoda může být charakterizována následujícími výkonnostními parametry: senzitivita, specifčnost (inkluzivita a exkluzivita), selektivita, opakovatelnost, reprodukovatelnost a robustnost. Za validovanou je považována taková metoda, u níž byly stanoveny výkonnostní parametry nezbytné pro danou metodu s ohledem na její zamýšlené použití.

Tato metoda kombinující velkokapacitní extrakci DNA a TaqMan real-time PCR byla validována dle validačního schématu diagnostického standardu EPPO PM 7/98 (EPPO, 2021), a to v duplexním uspořádání pro současnou detekci *V. nonalfalfae* a *V. dahliae* v jedné real-time PCR reakci a v separátní reakci pro interní PCR kontrolu. Výkonnostní parametry metody byly stanoveny s použitím výše uvedených konkrétních chemikálií a kitů. Před zavedením metody v jiné laboratoři je nezbytné metodu verifikovat pro použití s konkrétním vybavením laboratoře a používanými laboratorními reagensy. Přehled zjištěných hodnot výkonnostních parametrů metody je uveden v tab. 7.

#### 3.6.1 Senzitivita

##### *Analytická senzitivita:*

Analytická senzitivita vyjadřuje nejmenší množství patogenu ve vzorku, které může být danou metodou spolehlivě detekováno (odpovídá limitu detekce metody).

Pro stanovení detekčního limitu metody byla použita půda odebraná z lokality Olomouc (tab. 4), již měla laboratoř k dispozici neomezené množství. Pro přípravu koncentrační ředící řady detekovaných patogenů byla vypěstována čistá houbová kultura *V. nonalfalfae* a *V. dahliae* na tekutém živném médiu TSB (příloha 1). Přbytek média byl z narostlého mycelia odstraněn lisováním mezi listy filtračního papíru a mycelium bylo následně ponecháno zcela doschnout při laboratorní teplotě. Suché mycelium bylo důkladně homogenizováno v třecí misce pomocí tloučku s přísádkem mořského písku v cca 2 ml extrakčního Soil CTAB pufru a následně doředěno na koncentraci 10 mg mycelia na 1 ml pufru.

Pro předběžné řádové určení citlivosti metody byla připravena šestidílná ředící řada suspenze mycelia v 50 g půdy s ředícím faktorem 5x. Výsledná množství každého mycelia v 50 g půdy byla 200 mg, 40 mg, 8 mg, 1,6 mg, 320 µg a 64 µg. Ve všech koncentracích bylo po extrakci DNA detekováno pomocí real-time PCR *V. nonalfalfae* (Cq pro dané koncentrace v rozmezí 17-28) i *V. dahliae* (Cq pro dané koncentrace v rozmezí 19-30). Následně byla připravena navazující šestidílná ředící řada *V. nonalfalfae* a *V. dahliae* s ředícím faktorem 5x, kdy výsledná množství každého mycelia v 50 g půdy byla 64 µg, 12,8 µg, 2,56 µg, 512 ng, 102,4 ng a 20,48 ng. Ve všech koncentracích bylo po extrakci DNA detekováno pomocí real-time PCR *V. nonalfalfae* (Cq pro dané koncentrace v rozmezí 28-40) i *V. dahliae*, (Cq pro dané koncentrace v rozmezí 30-40).

Na základě tohoto předběžného testu byly zvoleny následující koncentrace pro stanovení analytické senzitivity metody, kdy každý ředící stupeň byl připraven a testován ve 3 opakováních (3 biologické replikáty): 2 µg, 200 ng, 20 ng, 2 ng mycelia v 50 g půdy. Nejnižší koncentrace, u níž byl výsledek všech 3 biologických replikátů pozitivní, byla 2 µg na 50 g půdy pro *V. nonalfalfae* i pro *V. dahliae*.

Protože se jedná o multiplexní reakci se současnou detekcí obou patogenů a připravené testovací ředící řady obsahovaly oba patogeny současně, byl testován i vliv multiplexování

na analytickou senzitivitu porovnáním se simplexovou detekcí konkrétního patogenu. Výsledky detekce byly pro oba patogeny v obou provedeních srovnatelné, nebyl zjištěn významný vliv multiplexování na senzitivitu metody. Detekční limit byl v obou variantách (simplexní i multiplexní uspořádání) pro oba patogeny stanoven na 2 µg mycelia v 50 g půdy.

*Diagnostická senzitivita:*

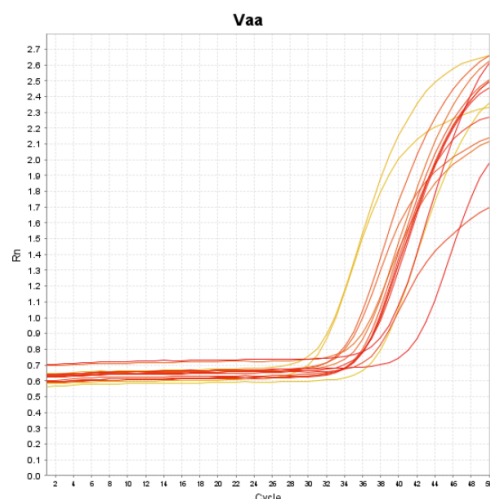
Diagnostická senzitivita vyjadřuje pravděpodobnost pozitivního výsledku v případě testování skutečně pozitivního vzorku (stanoveného jinou metodou). Výsledná hodnota je relativní číslo v intervalu 0-1 (popř. 0-100 %), kdy v ideálním případě se blíží 1 (100 %).

Navržený detekční systém byl testován na vzorcích půd odebraných z českých chmelnic s prokázaným výskytem *V. nonalfalfae* (půdy s přirozeným výskytem *V. dahliae* nebyly v době validace metody laboratoři k dispozici). Patogen byl v chmelnicích diagnostikován ve vzorcích rostlinného materiálu morfologicky po předchozí kultivaci na živném médiu a potvrzen molekulárně metodou tzv. DNA barcoding (EPPO, 2021). Pro testování byly zvoleny dvě zasažené chmelnice (tab. 4), přičemž z každé byly odebrány tři dílčí vzorky půdy v množství cca 1 kg. Z každého z těchto šesti dílčích vzorků půd byly provedeny 2–3 nezávislé laboratorní analýzy. *V. nonalfalfae* bylo detekováno v 16 z celkem 17 testovaných laboratorních vzorků (obr. 5). Diagnostická senzitivita metody byla stanovena na hodnotu 94,1 % pro *V. nonalfalfae*.

**Tabulka 4:** Přehled půd použitých pro stanovení výkonnostních parametrů metody.

Lokalita		i	Výkonnostní parametr					
			Anal. senz.	Diag. senz.	Diag. spec.	Selek.	Opak.	Repr.
Severní Morava	Chlebovice	u			√	√	√	√
	Mladějovice	u			√	√	√	√
	Olomouc	u	√		√	√	√	√
	Partutovice	u			√	√	√	√
	Štěpánov	u			√	√	√	√
	Šumperk	u			√	√	√	√
Střední Čechy	Kroučová	u				√		√
	Pochvalov	u				√		√
	Řevničov	u				√		√
	Třeboc	u				√		√
Ústecký kraj	Louny	p		√				
Olomoucký kraj	Přerov	p		√				

i – půda infikovaná uměle (u), půda infikovaná přirozeně (p); Anal.senz. = analytická senzitivita, Diag.senz. = diagnostická senzitivita, Diag. spec. = diagnostická specifičnost, Selek. = selektivita, Opak. = opakovatelnost, Repr. = reprodukovatelnost.



**Obr. 5:** Real-time PCR Detekce *V. nonalfalfae* v přirozeně infikovaných půdních vzorcích.

### 3.6.2 Specifičnost

#### *Analytická specifičnost:*

Analytická specifičnost vyjadřuje schopnost testu detekovat pouze takový patogen, který má být detekován. Inkluzivita zahrnuje schopnost detekovat cílový patogen i v případě jeho genetické diverzity, odlišného původu či hostitele škodlivého organismu. Exkluzivita naopak představuje schopnost testu nedetekovat složky, které nemají být detekovány (tzv. křížové reakce např. s příbuznými organismy, kontaminanty přítomnými ve vzorku).

Extrakce DNA ze vzorku je nespecifická fáze, která extrahuje veškerou DNA přítomnou ve vzorku. Specifičnost real-time PCR testu uvádí diagnostický standard EPPO PM 7/78 (EPPO, 2020)<sup>1</sup>. Inkluzivita dle něj byla stanovena jako 100% na souboru 23 různých izolátů *V. nonalfalfae* a 6 izolátů *V. dahliae*. Hodnota parametru byla verifikována v laboratoři ÚKZÚZ na čtyřech dostupných izolátech *V. nonalfalfae* (dva z České republiky a dva původem ze Slovinska - mírná a letální forma) a jedním izolátu *V.dahliae* z Česka.

V rámci exkluzivity dle EPPO PM 7/78 (EPPO, 2020)<sup>1</sup> bylo testováno 27 necílových mikroorganismů izolovaných ze zdravého chmele (17 druhů hub, 10 druhů bakterií). Žádné křížové reakce nebyly pozorovány. Žádné křížové reakce nebyly pozorovány ani při verifikaci parametru v laboratoři ÚKZÚZ při testování tří necílových izolátů chmel napadajících hub (*Botrytis cinerea*, *Fusarium sambucinum*, *Sclerotinia sclerotiorum*) a *Verticillium issacii* z vlastní kolekce OddŠOR Olomouc.

#### *Diagnostická specifičnost:*

Diagnostická specifičnost vyjadřuje pravděpodobnost negativního výsledku testu v případě testování skutečně negativního vzorku. Výsledná hodnota je relativní číslo v intervalu 0–1 (resp. 0–100 %), kdy v ideálním případě se blíží 1 (100 %).

Diagnostická specifičnost testu byla stanovena testováním 6 vzorků půd náhodně odebraných z 6 různých severomoravských lokalit (tab. 4) bez přítomnosti *V. nonalfalfae* / *V. dahliae* na hodnotu 100 %.

<sup>1</sup> Parametr byl testován za použití odlišného mastermixu pro real-time PCR.

### 3.6.3 Selektivita

Selektivita je schopnost nezkráceně detekovat patogen v přítomnosti dalších látek, jejichž přítomnost ve vzorku se očekává (látky neruší stanovení).

Pro ověření možného vlivu složení testované půdy na výsledek testu byly náhodně odebrány vzorky půd ze šesti různých lokalit na severní Moravě (tab. 4). Testovací 50g dílčí vzorky jednotlivých půd byly uměle infikovány roztokem čisté kultury *V. nonalfalfae* / *V. dahliae* v homogenizačním Soil CTAB pufru, v nadlimitní koncentraci. Získané C<sub>q</sub> hodnoty pro jednotlivé půdy infikované testovanými houbami v nadlimitní koncentraci jsou uvedeny v tab. 5 (*V. nonalfalfae*) a 6 (*V. dahliae*).

Při testování půd infikovaných *V. nonalfalfae* jedna z testovaných půd (Partutovice) vykazovala částečnou inhibici amplifikace v reakci interní PCR kontroly (menší sklon amplifikační křivky, viz obr. 6A) a úplnou inhibici v reakci detekující *V. nonalfalfae* (nevyznikla amplifikační křivka). Po naředění DNA vzorku 10x již měla amplifikační křivka interní PCR kontroly očekávaný tvar a v reakci pro *V. nonalfalfae* došlo k amplifikaci. U dalších tří půd (Chlebovice, Mladějovice, Štěpánov) nebyla pozorována inhibice v reakci interní PCR kontroly, avšak částečná inhibice ve *V. nonalfalfae* specifické reakci (snížení C<sub>q</sub> hodnot při testování 10x ředěné DNA oproti neředěné DNA) viz tab. 5.

Při testování půd infikovaných *V. dahliae* byla pouze u jednoho vzorku (Partutovice) pozorována částečná inhibice u reakce interní PCR kontroly, kde byl pozorován nepatrně nižší sklon amplifikační křivky (obr. 6B) V reakci *V. dahliae* při 10x ředění DNA nedošlo k očekávanému zvýšení hodnoty C<sub>q</sub> (tab. 6).

Z důvodu očekávané nízké koncentrace hledaných patogenů v půdních vzorcích byla selektivita prověřena také na 10 různých půdách uměle kontaminovaných limitním množstvím *V. nonalfalfae* a *V. dahliae*, tab. 4. Metoda umožnila detekovat oba hledané patogeny v limitním množství ve všech testovaných půdách (obr. 7).

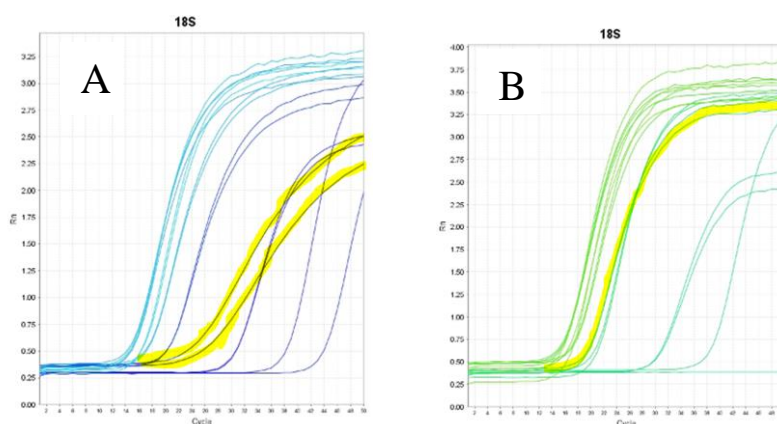
**Tab. 5:** Průměrné C<sub>q</sub> hodnoty vzorků různých druhů půd uměle infikovaných nadlimitním množstvím *V. nonalfalfae*, analyzovaných přístrojem StepOnePlus při manuálním nastavení thresholdu na hodnotu 0,04.

	Neředěná DNA		10x ředěná DNA	
	<i>V. nonalfalfae</i>	IK	<i>V. nonalfalfae</i>	IK
1 Chlebovice	29,0	18,7	26,9	21,5
2 Mladějovice	32,4	15,7	27,9	18,4
3 Olomouc	24,8	14,5	28,6	17,6
4 Partutovice	50	22,2*	27,0	18,8
5 Štěpánov	29,1	13,1	27,7	16,1
6 Šumperk	25,5	13,1	28,3	16,4

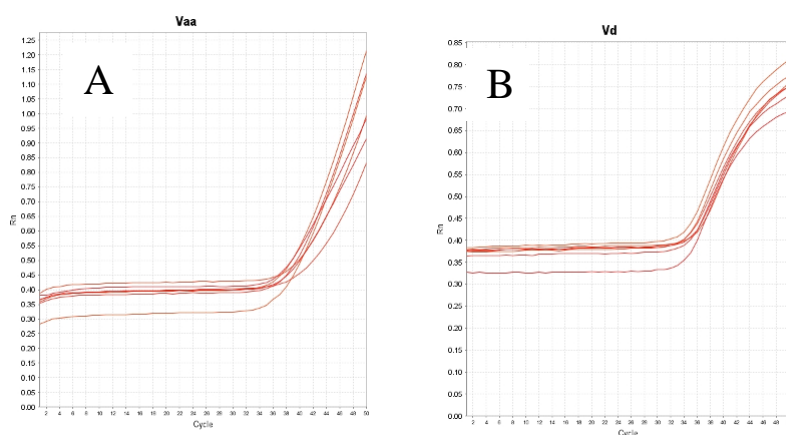
\*plošší tvar amplifikační křivky indikuje přítomnost významného množství inhibitorů real-time PCR.

**Tab. 6:** Průměrné C<sub>q</sub> hodnoty vzorků různých druhů půd uměle infikovaných nadlimitním množstvím *V. dahliae*, analyzovaných přístrojem StepOnePlus při manuálním nastavení thresholdu na hodnotu 0,04.

	Neředěná DNA		10x ředěná DNA	
	<i>V. dahliae</i>	IK	<i>V. dahliae</i>	IK
1 Chlebovice	28,5	18,1	30,8	21,2
2 Mladějovice	28,4	15,1	30,5	18,4
3 Olomouc	28,1	14,8	30,6	17,1
4 Partutovice	30,4	17,2	31,4	20,2
5 Štěpánov	28,6	13,5	30,7	16,5
6 Šumperk	27,9	13,3	30,4	16,5



**Obr. 6:** Nižší sklon amplifikačních křivek (žlutě) u reakce interní PCR kontroly u vzorků s významným obsahem PCR inhibitorů v matrici, které negativně ovlivňují *V. nonalfalae* specifickou reakci a vyžadují testování 10x ředěné DNA. A – půda uměle infikovaná *V. nonalfalae*, B – půda uměle infikovaná *V. dahliae*.



**Obr. 7:** Čtyři vzorky půd uměle infikované limitním množstvím (2 μg/50 g půdy) mycelia *V. nonalfalae* (A) a *V. dahliae* (B).

**Tab. 7:** Přehled zjištěných výkonnostních parametrů metody detekce a identifikace *V. nonalfalfae* a *V. dahliae* v půdě pomocí real-time PCR.

Výkonnostní parametr	<i>V. nonalfalfae</i>	<i>V.dahliae</i>
Senzitivita analytická	2 µg mycelia v 50 g půdy	2 µg mycelia v 50 g půdy
Senzitivita diagnostická	94,1 %	nestanoveno
Specifičnost analytická - inkluzivita	Všechny testované izoláty (4) byly detekovány.	Všechny testované izoláty (1) byly detekovány.
Specifičnost analytická – exkluzivita	Nebyly pozorovány žádné křížové reakce s testovanými necílovými organismy (5): <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Fusarium sambucinum</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Verticillium issacii</i> , <i>Verticillium dahliae</i> ,	Nebyly pozorovány žádné křížové reakce s testovanými necílovými organismy (5): <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Fusarium sambucinum</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Verticillium issacii</i> , <i>Verticillium nonalfalfae</i> .
Specifičnost diagnostická	100 %	100 %
Selektivita	Negativní vliv složení půdy neprokázán.	Negativní vliv složení půdy neprokázán.
Opakovatelnost	100 %	100 %
Reprodukovatelnost	90 %	100 %

### 3.6.4 Opakovatelnost

Schopnost testu dosáhnout stejného výsledku u opakovaných testování stejného vzorku za stejných podmínek (stejnou osobou na stejném přístroji, stejném místě, v krátkém časovém intervalu).

Jeden vzorek půdy uměle infikovaný limitním množstvím obou patogenů (2 µg každého mycelia v 50 g půdy) byl analyzován ve 3 nezávislých experimentech. Dále bylo 6 různých vzorků půd z lokalit na severní Moravě (tab. 4) uměle infikováno limitní koncentrací *V. nonalfalfae* a *V. dahliae*. Z připravených homogenátů byly odebrány vždy 2 alikvoty, které byly následně analyzovány v různé dny stejnou osobou s použitím stejného přístrojového vybavení. Oba patogeny byly detekovány ve všech testovaných vzorcích. Opakovatelnost byla stanovena na hodnotu 100 %.

### 3.6.5 Reprodukovatelnost

Schopnost testu poskytovat neměnný výsledek v případě analýzy alikvotů stejného vzorku za odlišných podmínek (jinou osobou, na jiném přístroji, v jiném čase).

Deset dostupných vzorků půd (tab.4) byly uměle infikovány limitní koncentrací *V. nonalfalfae* a *V. dahliae* (2 µg každého mycelia v 50 g půdy) a byly následně analyzovány jinou osobou s použitím jiného přístrojového vybavení (QuantStudio 3 real-time PCR system, Applied Biosystems). *V. nonalfalfae* bylo detekováno v 9 z 10 vzorků, zatímco *V. dahliae* ve všech 10 vzorcích. Reprodukovatelnost testu *V. nonalfalfae* byla stanovena na 90 %, *V. dahliae* na 100 %.

### 3.6.6 Robustnost

Robustnost je schopnost testu poskytovat správný výsledek i při úmyslně změněných podmínkách.

Při dodržení stanoveného postupu diagnostiky *V. nonalfalae* a *V. dahliae* se tento parametr neuplatňuje.

## 4. Ochranná opatření na pozemcích s výskytem patogenu VNA

- likvidace rostlin chmele i chmelových konstrukcí na zamořených pozemcích,
- zákaz vstupu na zamořené pozemky nepovolaným osobám,
- jednorázová očista a dezinfekce nářadí, mechanizace, kol traktorů, obuvi osob a dalšího vybavení použitého v průběhu likvidace rostlin chmele, pokud dojde ke kontaktu s půdou nebo rostlinnými zbytky,
- pravidelná očista a dezinfekce nářadí, mechanizace, kol traktorů, obuvi a dalšího vybavení po skončení veškerých prací na zamořených pozemcích, před jejich přemístěním z těchto pozemků na jiné místo,
- stanovení osevního postupu na zamořených pozemcích, spočívajícího v zatravnění nebo výsevu obilnin, a to v průběhu nejméně 4 ukončených vegetačních období,
- likvidace všech výhonů chmele (spálením, odstraněním z pozemku) a potlačování všech širokolistých plevelů na zamořených pozemcích po dobu trvání karanténního osevního postupu,
- snížení intenzity zpracování půdy, zvýšení dávek hnojiv (N a K), případně vyvápnění kyselejších pozemků,
- rozvrhnutí pořadí prací v zamořeném území tak, aby práce na zamořených pozemcích byly prováděny až jako poslední, a to po pracích na pozemcích bezprostředně s nimi sousedícími (chmelnice, orná půda), a tyto sousedící pozemky pak po všech ostatních, méně rizikových pozemcích.

## 5. Preventivní opatření na pozemcích bez potvrzeného výskytu patogenu

- pravidelný monitoring zdravotního stavu chmelnice a v případě nálezu podezřelých rostlin zaslat na diagnostiku původce,
- k výsadbě používat zdravý (certifikovaný) materiál, případně materiál s rezistencí proti původci,
- pravidelná očista a dezinfekce nářadí, mechanizace, kol traktorů, obuvi a dalšího vybavení po skončení veškerých prací po jejich přemístění z pozemků v blízkosti zamořeného území na jiné místo,
- rozvrhnutí pořadí prací v blízkosti zamořeného území tak, aby práce na pozemcích v blízkosti zamořených ploch byly prováděny až jako poslední (a to včetně prací na orné půdě v blízkosti rizikových lokalit).



## 6. Literatura

- EPPO (2020), PM 7/78 (2) *Verticillium nonalfalfae* and *V. dahliae*. EPPO Bull, 50: 462-476.
- EPPO (2021), PM 7/98 (5) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. EPPO Bull, 51: 468-498.
- EPPO (2021), PM 7/129 (2) DNA barcoding as an identification tool for a number of regulated pests. EPPO Bull, 51: 100-143.
- Maurer KA, Radišek S, Berg G & Seefelder S (2013) Real-time PCR assay to detect *Verticillium albo-atrum* and *V. dahliae* in hops: development and comparison with a standard PCR method *Journal of Plant Disease and Protection* 120, 105–114.
- Woodhall, JW, Webb KM, Giltrap PM, Adams IP, Peters JC, Budge GE & Boonham N. (2012) A new large scale soil DNA extraction procedure and real-time PCR assay for the detection of *Sclerotium cepivorum* in soil. *Eur J Plant Pathol* 134, 467–473.

## Příloha 1

Soil CTAB pufr (120 mM fosforečnan sodný, pH 8,0, 2% CTAB, 1,5M NaCl).

Pro přípravu 1L navážit 45,61 g  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ , rozpustit v cca. 400 ml demineralizované vody. Upravit pH na 8,0 pomocí HCl. Navážit 20 g CTAB a rozpustit v cca. 400 ml demineralizované vody. Oba roztoky smíchat. Poté přidat 87,66 g NaCl a míchat do rozpuštění. Nakonec doplnit do objemu 1L demineralizovanou vodou. Skladovat při laboratorní teplotě!

5M Octan draselný:

Pro přípravu 50 ml navážit 24,53 g octanu draselného a doplnit do objemu 50 ml demineralizovanou vodou.

Acid washed silica - doba přípravy cca. 9 dní (pracovat velmi opatrně, v digestoři (práškový oxid křemičitý je karcinogenní při opakované nebo dlouhodobé inhalaci prachu):

Navážit 2 x 48 g oxidu křemičitého, každých 48 g opatrně přenést do jedné 500ml skleněné lahve. Obě lahve doplnit demineralizovanou vodou do 500 ml, důkladně uzavřít a promíchat. Nechat odstát cca. 3 dny (dokud není vidět usazený oxid křemičitý na dně). Opatrně slít většinu supernatantu (ponechat asi 2 cm hladinu nad usazeninou). Znovu doplnit demineralizovanou vodou do 500 ml, důkladně uzavřít a promíchat, nechat odstát cca. 3 dny (dokud není vidět usazený oxid křemičitý na dně). Opatrně slít většinu kapaliny, zbylou usazeninu promíchat a obě suspenze slít do jedné 250 ml skleněné lahve. Nechat odstát cca. 3 dny (dokud není vidět usazený oxid křemičitý na dně). Odstranit přebytek kapaliny a ponechat asi 2 cm hladinu. Promíchat. Druhou stejnou lahev naplnit do stejné úrovně kohoutkovou vodou, tu přelít do odměrného válce pro zjištění objemu suspenze. K suspenzi přidat konc. HCl 1,25  $\mu\text{l/ml}$  suspenze. Promíchat.

TSB

Navážit 30,0 g přípravku TSB a zahřívát s 1000 ml destilované vody do úplného rozpuštění. Autoklávovat 15 minut při 121°C.

---

**Bulletin Národní referenční laboratoře XXVII, 2023/2**

Ročník: XXVII, č. 2

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2023

Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová

Počet stran: 23

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196