

Molekulární metody detekce a identifikace vybraných patogenů řepky

Certifikovaná metodika

Prof. Ing. Pavel Ryšánek, CSc. (20 %)

Ing. Jana Mazáková, Ph.D. (45 %)

Mgr. Veronika Řičařová (15 %)

MSc. Khuswant Sandhu Singh (10 %)

Ing. Miloslav Zouhar, Ph.D. (10 %)

Katedra ochrany rostlin, Česká zemědělská univerzita v Praze

Metodika je výsledkem řešení projektů NAZV QH81127 a QJ1310227.

Oponentní posudky vypracovali:

Doc. Dr. Ing. Jaroslav Salava, VÚRV, v. v. i., Praha - Ruzyně

RNDr. Kateřina Tománková, Ph.D., ÚKZÚZ, ODIA Olomouc

Publikaci bylo Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským uděleno osvědčení č. 010704/2016 o uznání uplatněné certifikované metodiky v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje“.

Obsah

Seznam použitých zkratk	3
1. Úvod	4
2. Cíl metodiky	6
3. Vlastní popis metodiky	6
3. 1. Odběr a úprava vzorků	6
3. 2. Molekulární analýzy vzorků	8
3. 2. 1. Izolace DNA ze vzorku	8
a) postup izolace DNA z rostlinných pletiv s použitím CTAB pufru.....	9
b) izolace DNA z rostlinných pletiv pomocí kitu Gene Elute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich).....	10
c) izolace DNA z půdy pomocí kitu NucleoSpin® Soil (Macherey-Nagel).....	12
3. 2. 2. Polymerázová řetězová reakce – PCR	14
a) Determinace původce nádorovitosti kořenů brukvovitých (<i>Plasmodiophora brassicae</i>) v pletivu rostlin a v půdě.....	15
b) Determinace původce plísně brukvovitých (<i>Hyaloperonospora parasitica</i>) v pletivu rostlin	16
c) Determinace původců fomového černání stonků řepky (<i>Leptosphaeria maculans</i> a <i>L. biglobosa</i>) v pletivu rostlin.....	17
d) Determinace původců verticiliového vadnutí řepky (<i>Verticillium</i> spp.) v pletivu rostlin	19
e) Determinace původce bílé hniloby řepky (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>) v pletivu rostlin	22
3. 2. 3. Elektroforetická separace a vizualizace amplifikovaných úseků DNA	23
3. 2. 4. Detekce <i>Plasmodiophora brassicae</i> pomocí qPCR	24
4. Srovnání novosti postupů	26
5. Popis uplatnění metodiky	26
6. Ekonomické aspekty	26
7. Seznam související literatury	28
8. Seznam publikací, které předcházely metodice	30

Seznam použitých zkratk

zkratka	název
A	adenin
bp	pár bází
C	cytosin
CTAB	cetyl trimetylamonium bromid
cq	cyklus kvantifikace
ddH₂O	re-destilovaná voda
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
EDTA	etylendiaminotetraoctová kyselina
g	tíhové zrychlení
G	guanin
HCl	kyselina chlorovodíková
MgCl₂	chlorid hořečnatý
NaCl	chlorid sodný
PCR	polymerázová řetězová reakce
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RFU	relativní fluorescenční jednotka
rpm	počet otáček za minutu
SDS	dodecylsírán sodný
T	thymin
Taq polymeráza	DNA polymeráza z mikroorganismu <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	tris-borátový pufr s EDTA
TE	tris-borátový pufr
Tris	trihydroxymethylaminomethan
U	enzymová jednotka
UV	ultrafialové záření

1. Úvod

Řepka je v současnosti druhou nejvýznamnější polní plodinou v ČR. Její plocha se v průběhu posledních 25 let více než ztrojnásobila a v některých letech přesahuje i 400 000 ha (Anonym, 2014). S prudkým vzestupem rozsahu ploch, na kterých se pěstuje, souvisí i stále větší riziko jejího napadení nejrůznějšími patogeny, protože roste nejen počet a koncentrace jejich zdrojů v podobě samotných porostů řepky, ale roste i zamořenost půdy některými z nich. V současnosti musíme považovat za nejvýznamnější choroby především bílou hnilobu řepky, fomové černání stonku a nádorovitost kořenů. Ty se v jednotlivých letech střídají ve vedení pomyslného žebříčku škodlivosti podle toho, jaké právě panují podmínky v době kritické pro napadení rostlin. Bílá hniloba řepky je způsobena houbou *Sclerotinia sclerotiorum*, fomové černání stonku je vyvoláno houbami z rodu *Leptosphaeria* (*L. maculans*, *L. biglobosa*) a nádorovitost je způsobena prvokem *Plasmodiophora brassicae* (obr. 1–3). Za méně významné lze považovat virózy, způsobované virem mozaiky vodnice a virem žloutenky vodnice (dříve byl tento virus označován jako virus západní žloutenky řepy), pro jejichž diagnostiku jsou k dispozici kity ELISA, plíseň brukvovitých (*Hyaloperonospora parasitica*), černě a verticiliové vadnutí rostlin (*Verticillium longisporum*). Tyto choroby se buď vyskytují jen občas, např. virózy naposled v roce 2010 (Kazda, Ryšánek, 2011), nebo sice častěji, ale v omezeném měřítku, případně s nižší závažností infekce (Bernardová, 2015; Plachká, 2015). Spíše okrajový je význam dalších patogenů, např. plísně šedé, která má pouze lokální význam za deštivého počasí (Plachká, Odstrčilová, 2007; Kazda a kol., 2008; Plachká, Poslušná, 2014).



Obr. 1. Příznaky způsobené *Sclerotinia sclerotiorum*.

Obr. 2. Příznaky způsobené *Leptosphaeria* spp. na stonku.

Obr. 3. Příznaky způsobené *Plasmodiophora brassicae*.

Přesná determinace jednotlivých patogenů přímo na napadených rostlinách nebývá ani tak zásadní pro ochranná opatření v daném porostu, protože v době projevu příznaků už je obvykle na ně pozdě, jako pro celkovou strategii ochrany řepky v daném podniku. Podle frekvence a závažnosti výskytu jednotlivých chorob lze navrhnout případnou optimalizaci ochranných opatření v příštích letech.

Polní diagnostika je v určitých případech a při projevu typických příznaků poměrně jednoduchá. Asi každý agronom pozná rozvinuté typické příznaky bílé hniloby nebo fomového černání stonku. U jiných chorob a u neúplně vyvinutých příznaků je však situace

komplikovanější. Například virózy mohou být při menším výskytu zaměněny s příznaky nedostatku některých živin. Podobně i u *V. longisporum* můžeme jím způsobené příznaky přisuzovat různým jiným příčinám. Ani nekrózy báze stonku v počátečních fázích napadení jednotlivými patogeny není jednoduché vizuálně rozlišit. Některé patogeny potřebujeme určit právě u příznaků, jejichž etiologie nám zatím není známa. To je třeba případ syndromu praskání šesulí, kde je jedním z podezřelých faktorů plíseň brukvovitých (Říha, 2015). Podobně u fomového černání stonku je někdy užitečné vědět, zda je zde původcem *L. maculans*, nebo *L. biglobosa*, protože oba druhy se od sebe některými vlastnostmi liší. V těchto případech je nutné použít některé z laboratorních diagnostických metod. Proto se v rámci řešení projektů QH81127 a QJ1310227 zaměřených na choroby řepky a financovaných Ministerstvem zemědělství (NAZV) zabýváme i adaptací a optimalizací různých laboratorních diagnostických metod. Podle charakteru předpokládaného původce onemocnění můžeme vybírat především ze tří základních skupin diagnostických metod – kultivačních (+ mikroskopických), sérologických a molekulárních.

Jednou z nejběžnějších metod, které umožňují determinaci houbových patogenů ať už přímo nebo následně za pomoci mikroskopu, je jejich izolace z nemocné rostliny a kultivace na umělých médiích (obr. 4). Tyto metody jsou sice po technické stránce relativně jednoduché, ale mohou být časově i prostorově poměrně náročné, protože potřebujeme ze směsi všech možných hub, které se v (nebo na) dané rostlině vyskytují, vybrat a nakultivovat právě daného patogena. Některé fytopatogenní houby rostou v kultuře pomalu a hrozí nebezpečí jejich přerůstání houbami saprofytickými. Navíc, zvláště u báze stonku, se často jedná o směsné infekce. Obligátní patogeni (např. *Plasmodiophora brassicae*) nemohou být na umělých médiích vůbec kultivováni, mohou být pouze pozorovány a určovány mikroskopicky, a jejich determinace tímto způsobem proto nepřichází v úvahu. Izolaci a kultivaci na umělých médiích tedy použijeme spíše tam, kde chceme studovat některé vlastnosti příslušného izolátu patogena, např. citlivost k fungicidním látkám. Pro vlastní diagnostiku je však ideální, pokud můžeme patogena determinovat přímo v pletivech rostliny. To umožňují metody molekulární, na které je zaměřena tato metodika.



Obr. 4. Kultury hub v Petriho miskách. Nahoře zleva – *Verticillium longisporum* a *Sclerotinia sclerotiorum* na ovesném agaru; dole zleva – *Leptosphaeria biglobosa* a *L. maculans* na V8 juice agaru.

2. Cíl metodiky

V publikacích lze najít řadu popisů metod determinace patogenů řepky. Podle našich zkušeností však v řadě případů podle nich nejde prakticky postupovat. Příčinou bývají chybějící základní údaje, chyby v popisu postupů, ať už nevědomé, nebo dokonce záměrné (např. uvedení sekvence primerů v opačném směru), a také chybějící validace těchto metod na dostatečně velkém souboru patogenů, které se mohou na rostlinách vyskytovat společně s cílovým organismem. Cílem této metodiky je tedy uvedení metod, které byly v naší laboratoři testovány, dále optimalizovány a validovány. Konkrétně se jedná o diagnostiku patogenů způsobujících jednak všechny tři nejvýznamnější choroby řepky – *Sclerotinia sclerotiorum*, *Plasmodiophora brassicae*, *Leptosphaeria maculans* a *L. biglobosa*, a jednak dalších patogenů, na něž je současně běžící projekt QJ1310227 z různých důvodů také zaměřen – *Verticillium longisporum* a *Hyaloperonospora parasitica*. U *V. longisporum* je tím důvodem to, že existují rozporuplné údaje o jeho výskytu a škodlivosti u nás a patogen *H. parasitica* je podezřelý z toho, že způsobuje určitou formu praskání šesulí.

3. Vlastní popis metodiky

3. 1. Odběr a úprava vzorků

Odběr a následná úprava vzorků jsou velmi důležitou součástí analýz. Chyby ve vzorkování už nelze napravit sebecitlivějším postupem determinace. Pečlivost je při odběru a přípravě vzorků naprosto nezbytná.

1) Odběr rostlinného materiálu (Prokinová, 2001)

V závislosti na účelu rozborů je třeba odebírat reprezentativní vzorky, ať už z jednotlivých rostlin nebo z celého porostu. Pokud jde o monitoring výskytu nějakého patogena v celém porostu, postupuje se v optimálním případě po uhlopříčce a v určitých intervalech (např. na každém desátém řádku) se odebírají vzorky, a to bez ohledu na to, zda příslušné rostliny mají příznaky, nebo ne. Na 1 ha by mělo být odebráno 20–30 vzorků. Pokud je třeba stanovit konkrétní diagnózu u skupiny napadených rostlin, odebírají se napadené orgány s typickými příznaky pokud možno alespoň z několika (5–10) rostlin. Stonky je třeba odebírat i s částí hlavního kořene, zvláště pokud je cílem testovat přítomnost *L. maculans*. Je tedy vhodné s sebou mít rýč nebo alespoň polní lopatku a nůž či zahradnické nůžky. Rýč je samozřejmě potřeba i při odběru vzorků na rozborov nadorovitosti. V žádném případě se nedá spoléhat na pouhé vytržení rostlin z půdy, protože v tomto případě se poškozené kořeny trhají a nejdůležitější části s příznaky zůstávají v půdě. Vzorky se ukládají jednotlivě do mikrotenových nebo igelitových sáčků, které je třeba řádně označit.

V optimálním případě by porost v době odběru vzorků měl být suchý. Pokud tomu tak není, je třeba vzorky co nejdříve dopravit do laboratoře, vyndat ze sáčků a nechat oschnout, zvláště za teplého počasí. Při déletrvajících odběrech je vhodné používat k dočasnému uskladnění vzorků autochladničku nebo alespoň chladicí box s vychlazenými vložkami.

Další úprava vzorků závisí na konkrétní situaci. Pokud vzorky není třeba následně někam dopravovat či posílat, je možné je rovnou nebo po případném oschnutí vody ukládat do

mrazáku (-20 nebo ještě lépe -70 °C). Krátkodobě (1–3 dny podle stavu) je možné je skladovat i v chladničce. Pokud se vzorky mají dále dopravovat nebo posílat na místo zpracování, je nejvhodnější je usušit za laboratorní teploty rozložené na filtračním papíru. Po vysušení se vloží do označených papírových sáčků, ve kterých se mohou dopravovat i dále skladovat až několik let. V žádném případě by se čerstvé vzorky neměly posílat poštou, protože potom dochází k jejich degradaci a sekundární kontaminaci saprofytickými organismy.

Je třeba si uvědomit, že molekulární metody jsou velmi citlivé a zachytí i třeba jen povrchovou kontaminaci vzorku patogeny z jiného vzorku. Pokud tedy jde o stanovení poměru jednotlivých patogenů v odebraných vzorcích (např. *L. maculans/L. biglobosa*), je třeba ve všech fázích odběru a další úpravy dbát na individuální zacházení s jednotlivými vzorky a zamezení jejich vzájemnému kontaktu. Stejně tak je třeba dbát na řádnou desinfekci odběrových a ochranných pomůcek mezi odběry vzorků z různých lokalit, aby se minimalizovalo riziko falešně pozitivních výsledků (kontaminací).

2) Odběr půdních vzorků

Při monitoringu výskytu půdních patogenů, např. *P. brassicae*, je vždy potřeba odebrat dostatečný počet vzorků, přičemž každý vzorek by se měl skládat z několika menších vrypů. *P. brassicae* není regulovaným škodlivým organismem a pro odběr vzorků tedy neexistuje oficiální metodika. Při odběru však lze postupovat podle metodik odběru vzorků pro monitoring háďátka bramborového a řepného nebo původce rakoviny bramboru - *Synchytrium endobioticum* (např. Čermák a Gaar, 2013). Z jednoho hektaru je třeba odebrat 1 vzorek o objemu minimálně 1 l, který se skládá minimálně ze 100 jednotlivých vrypů. U menších ploch (ohniska napadení) počet vrypů roste. Např. u ploch pod 0,1 ha je vhodné udělat nejméně 25 vrypů. Je zřejmé, že čím detailnější vzorkování bude, tím přesnější výsledky lze získat, ale tím náročnější a dražší průzkum bude. I když se *P. brassicae* vyskytuje v celém profilu ornice i pod ní, vzorky se odebírají z hloubky 5–10 cm, neboť zde hrozí největší nebezpečí napadení hlavních kořenů vcházejících rostlin, v jehož důsledku vznikají největší ztráty. To je nejdůležitější kritérium pro rozhodnutí, zda použít odrůdu rezistentní, nebo zda stačí vysoce výkonná odrůda náchylná. Při odběru vzorků je potřeba postupovat v převládajícím směru kultivace půdy, protože tímto směrem se také intenzivněji šíří *P. brassicae* i další půdní škodlivé organismy.

Při odběru je vhodné používat více lopatek (nebo půdních sondýrek, které umožní dodržení odběrové hloubky do min. 10 cm), nebo alespoň lopatku mezi odběrem jednotlivých vzorků důkladně očistit (desinfikovat). Z hlediska jednoduchosti čištění je lépe mít lopatky chromované či nerezové, v žádném případě by neměly být zrezivělé, protože na nerovných plochách zemina ulpívá daleko důkladněji. Je vhodné už na poli ze vzorků vyloučit větší kameny a případně i kusy nerozložené organické hmoty, např. slámy.

Půdní vzorky se dále usuší při laboratorní teplotě a prosejí se na co nejmenší frakci (<2 mm). U slévavých vzorků je potřeba si při sušení dát pozor na vytvoření velmi pevných agregátů, zvláště pokud se vzorkuje za vyšší vlhkosti. Takové vzorky je lépe prosévat ještě před úplným vysušením jakmile to vlhkost vzorku dovolí. Při veškeré manipulaci se vzorky je třeba dbát na zamezení jejich vzájemné kontaminace např. prachem při prosévání nebo zbytky

vzorků na sítu, zvláště pokud se prosévají neúplně suché vzorky. Síto je třeba před každým vzorkem důkladně omýt vodou a vysušit v sušárně při teplotě alespoň 80°C nebo desinfikovat chemicky, jinak hrozí kontaminace). Důkladná homogenizace (promíchání) vzorků je naprosto nezbytná, protože k vlastní analýze se odebírá jen velmi malá část vzorku. Ze souhrnného vzorku se pro molekulárně biologickou analýzu použije 5 vzorků.

3. 2. Molekulární analýzy vzorků

Metody molekulární detekce a determinace patogenů zahrnují tři základní fáze: izolaci DNA ze vzorku, vlastní PCR (polymerázovou řetězovou reakci) a vyhodnocení produktů pomocí elektroforetické separace v gelu a následné detekce pomocí UV transiluminátoru.

Při práci v molekulárně-biologické laboratoři je nutné dodržovat základní bezpečnostní pokyny týkající se práce v takovémto typu laboratoře, které eliminují riziko poškození zdraví pracovníka (používání rukavic, ochranných brýlí, laboratorního pláště, vhodné obuvi atd.) a zároveň riziko kontaminace vzorku nežádoucí nukleovou kyselinou (desinfekce a sterilizace pracovních ploch, pomůcek, materiálu, používání rukavic, správná manipulace s nástroji atd.).

3. 2. 1. Izolace DNA ze vzorku

Prvním krokem úspěšného získání DNA v dostatečném množství a kvalitě je homogenizace vzorku metodou vhodně zvolenou dle výchozího použitého biologického materiálu. Rozrušení buněčných stěn lze dosáhnout mechanickou i chemickou cestou. Materiál lze rozmělnit v předchlazené třecí misce tloučkem v prostředí tekutého dusíku nebo s využitím skleněných kuliček o různém průměru (glass beads). Také lze využít různé typy homogenizátorů např. oscilační mlýn, u kterého se k rozmělnění pletiva používají mlecí kuličky a vzorek je uzavřen v mlecí nádobce nebo v mikrozkuhavce umístěné v adaptérovém držáku, vertikální (zkumavkový) homogenizátor nebo tyčový homogenizátor. K rozmělnění vzorku přímo v mikrozkuhavce slouží také ruční homogenizátor. K chemické lyzi buněk, uvolnění buněčných složek a denaturaci proteinů se používají izolační pufrы obsahující detergent (např. CTAB, SDS), chelatační a pufrovací činidlo (EDTA, Tris), alkoholy, soli a další látky.

Z buněčného lyzátu jsou vysráženy proteiny a rozpuštěny lipidy pomocí fenol-chloroformové extrakce. Z vodného roztoku nukleové kyseliny, který je získán oddělením od organické fáze centrifugací, je nukleová kyselina precipitována alkoholem (isopropanol, etanol). Získaná nukleová kyselina je promyta od solí a vysušena. Suchý sediment (peletu) DNA lze skladovat při laboratorní teplotě, případně dopravovat či posílat do jiné laboratoře. Běžnějším postupem je rozpustit sediment DNA ve vhodném pufru (TE) a skladovat při teplotě -20 °C.

K izolaci DNA jsou často využívány komerční izolační kity (mini, midi, maxi), jejichž princip je založen na lyzi buněk, precipitaci proteinů a dalších látek, filtraci a především na adsorpci DNA na křemičité částice (silikátovou membránu – tzv. kolonku) v přítomnosti chaotropních solí, dále promývání a uvolnění DNA do pufru. Další typy izolačních kitů jsou založeny na vazbě DNA na magnetické partikule a slouží především pro automatizované

(robotické) metody extrakce DNA. Výhodou uvedených kitů je především jejich kratší časová náročnost oproti tradičním metodám extrakce nukleových kyselin.

Metoda FTA karet je založena na lyzi buněk, denaturaci bílkovin a imobilizaci DNA na tzv. FTA kartách - celulózních vláknech impregnovaných tenzidem, chelatačním činidlem a jinými látkami. Biologický vzorek je na FTA matrici otištěn nebo aplikován jako homogenát. Postupným promýváním v pufrch jsou z matrice odstraněny buněčné zbytky a další látky a DNA může být v tomto stavu dlouhodobě uchovávána při pokojové teplotě několik měsíců až let, zasílána poštou, nebo rovnou použita pro PCR (Marek *et al.*, 2014).

Před samotnou analýzou DNA je vhodné stanovit koncentraci a čistotu nukleové kyseliny na základě spektrofotometrického měření absorpance při vlnových délkách 260 a 280 nm. V případě vysoké koncentrace naředíme DNA na požadovanou hodnotu koncentrace. V případě nízké koncentrace a znečištění DNA proteiny a dalšími organickými látkami je nutné provést opětovnou extrakci. Optimální koncentrace DNA pro standardní PCR je 10–100 ng/μl a optimální čistota DNA se pohybuje v rozmezí hodnot 1,7–2,0.

a) postup izolace DNA z rostlinných pletiv s použitím CTAB pufru

Homogenizace vzorku

- v případě měkkého pletiva (list, kořínek) rozmělnit vzorek v třecí misce tloučkem za přídavku tekutého dusíku na jemný prášek,
- v případě tvrdých suchých částí (stonek, kořeny) rozdrtit nastříhaný usušený vzorek pomocí oscilačního mlýnu (MM 400, Retsch) v mlecí nádobce s 1 ocelovou kuličkou (Ø 25 mm) po dobu 10 min při frekvenci 30×/s a dále rozmělnit vzorek v třecí misce tloučkem za přídavku tekutého dusíku na jemný prášek,

Lyze buněk

- smíchat 100 mg homogenizovaného vzorku se zhruba 700 μl CTAB pufru (1% CTAB, 50mM Tris-HCl (pH 8.0), 0,7 mM NaCl, 10 mM EDTA, 20 mM β-merkaptetanol),
- převést homogenát do mikrozkuřavky,
- inkubovat homogenát 60 min při 65 °C (Dry Block Thermostat TDB-120, Biosan) s občasným promícháním na vortexu (Vortex 4 Basic, IKA),

Poznámka: V případě izolace DNA z čerstvých kořenů navážku 100 mg rozmělněného vzorku převést do mikrozkuřavky, přidat 100 μl CTAB pufru a 3 ocelové kuličky (Ø 3 mm), mikrozkuřavku umístit do adaptérového držáku a homogenizovat pomocí oscilačního mlýnu po dobu 1,5 min při frekvenci 30×/s, poté přidat 400 μl CTAB pufru a homogenizovat pomocí oscilačního mlýnu po dobu 2 min při frekvenci 30×/s, nakonec přidat dalších 400 μl CTAB pufru.

Extrakce proteinů a dalších buněčných složek

- přidat k lyzátu stejný objem směsi fenol-chloroform-isoamylalkohol (25:24:1),
- třepat na horizontální třepače (Vibrax-VXR, IKA) 10 min (2200 rpm),

- centrifugovat (Universal 320R, Hettich) 10 min při $7000 \times g$,
- odebrat vodnou (horní) fázi do nové mikroskopické zkumavky a přidat stejný objem směsi chloroform-izoamylalkohol (24:1),
- třepat na horizontální třepačce 10 min (2200 rpm),
- centrifugovat 10 min při $7000 \times g$,
- odebrat vodnou (horní) fázi do nové mikroskopické zkumavky,

Poznámka: V případě izolace DNA z listů lze vypustit krok zahrnující extrakci směsí fenol-chloroform-izoamylalkohol a použít pouze směs chloroform-izoamylalkohol.

Precipitace DNA

- přidat k odebrané vodné fázi ekvivalentní množství vychlazeného isopropanolu,
- inkubovat směs minimálně 1 hodinu, případně přes noc při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo 5 min v tekutém dusíku,
- centrifugovat 10 min při $9000 \times g$,
- slít supernatant,

Promytí a sušení DNA

- přidat 200 μl 70% etanolu,
- centrifugovat 10 min při $9000 \times g$,
- slít supernatant,
- ponechat sediment (peletu) DNA sušit při laboratorní teplotě,

Rozpuštění a uchování DNA

- rozpustit sediment DNA ve 100–200 μl TE pufru (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0),
- rozpuštěnou DNA lze dlouhodobě skladovat při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

b) izolace DNA z rostlinných pletiv pomocí kitu Gene EluteTM Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)

Homogenizace vzorku

- v případě měkkého pletiva (list, kořínek) rozmělnit vzorek v třecí misce tloučkem za přítomnosti tekutého dusíku na jemný prášek,
- v případě tvrdých částí (stonek, kořeny) rozdrtit nastříhaný usušený vzorek pomocí oscilačního mlýnu (MM 400, Retsch) v mlecí nádobce s 1 ocelovou kuličkou (\varnothing 25 mm) po dobu 10 min při frekvenci $30 \times /s$, a dále rozmělnit vzorek v třecí misce tloučkem za přítomnosti tekutého dusíku na jemný prášek,

Lyze buněk

- smíchat maximálně 100 mg rozmělněného vzorku s 350 μ l lyzačního roztoku A (Lysis solution part A) a přemístit homogenát z třecí misky do mikrozkuhavky,

Poznámka: V případě izolace DNA z čerstvých kořenů přidat ke vzorku do mikrozkuhavky 3 ocelové kuličky (\emptyset 3 mm), mikrozkuhavku umístit do adaptérového držáku a homogenizovat pomocí oscilačního mlýnu po dobu 3 min při frekvenci 30 \times /s, poté odpipetovat homogenát do nové mikrozkuhavky, kuličky promýt ve 100 μ l lyzačního roztoku A a lyzační roztok z mikrozkuhavky odpipetovat k homegenátu.

- přidat 50 μ l lyzačního roztoku B (Lysis Solution part B) a promíchat směs opakovaným obrácením mikrozkuhavky,
- inkubovat směs 10 min při 65 °C (TDB-120, Dry Block Thermostat, Biosan) s občasným promícháním směsi opakovaným obrácením mikrozkuhavky,

Precipitace buněčných zbytků, proteinů a polysacharidů

- přidat k lyzátu 130 μ l precipitačního roztoku (Precipitation Solution), promíchat směs opakovaným obrácením mikrozkuhavky,
- inkubovat 5 min v ledové tříšti,
- centrifugovat (Universal 320R, Hettich) 5 min při 12000–16000 \times g.

Filtrace lyzátu

- převést supernatant do filtrační kolonky (GenElute Filtration Column) umístěné v mikrozkuhavce,
- centrifugovat 1 min při 12000–16000 \times g,
- odstranit filtrační kolonku,

Navázání DNA na membránu v kolonce

- přidat k filtrátu 700 μ l vazebného roztoku (Binding Solution), promíchat směs opakovaným obrácením mikrozkuhavky,
- připravit vazebnou kolonku (GenElute Miniprep Binding Column) umístěnou v mikrozkuhavce pro navázání DNA přidáním 500 μ l roztoku aktivujícího kolonku (Column Preparation Solution) přímo na kolonku, centrifugovat 1 min při 12000 \times g, vylít filtrát,
- převést 700 μ l filtrátu smíchaného s vazebným roztokem na připravenou vazebnou kolonku,
- centrifugovat 1 min při 12000–16000 \times g, vylít filtrát z mikrozkuhavky,
- převést zbytek filtrátu smíchaného s vazebným roztokem na připravenou vazebnou kolonku,
- centrifugovat 1 min při 12000–16000 \times g, vylít filtrát z mikrozkuhavky,

Promývání DNA

- umístit vazebnou kolonku do nové mikrozkušavky,
- přidat 500 μl promývacího roztoku (Wash Solution) do kolonky,
- centrifugovat 1 min při $12000\text{--}16000 \times g$, vylít filtrát z mikrozkušavky,
- přidat opět 500 μl promývacího roztoku do kolonky,
- centrifugovat 3 min při $12000\text{--}16000 \times g$, vylít filtrát z mikrozkušavky,

Eluce DNA

- umístit vazebnou kolonku do nové mikrozkušavky,
- přidat 100 μl elučního roztoku (Elution Solution) předehřátého na $65\text{ }^\circ\text{C}$ do kolonky,
- centrifugovat 1 min při $12000\text{--}16000 \times g$, odstranit kolonku,

Uchování DNA

- rozpuštěnou DNA lze dlouhodobě skladovat při $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

c) izolace DNA z půdy pomocí kitu NucleoSpin® Soil (Macherey-Nagel)

Příprava a lyze vzorku

- vložit navážku 250 mg jemnozeme ze souhrnného vzorku viz kapitola 3. 1. odstavec 2) do mikrozkušavky obsahující keramické kuličky (NucleoSpin® Bead Tube Type A),
- přidat 700 μl pufru SL,
- přidat 150 μl zesilovače lyze SX (Enhancer SX),
- třepat 5 min na horizontální třepače (Vibrax-VXR, IKA) 2200 rpm,
- centrifugovat (Universal 320R, Hettich) 2 min při $11000 \times g$,

Precipitace kontaminantů

- přidat 150 μl pufru SL3 a krátce (5 s) vortexovat (Vortex 4 Basic, IKA),
- inkubovat 5 min v ledové tříšti,
- centrifugovat 1 min při $11000 \times g$,

Filtrace lyzátu

- převést 700 μl supernatantu do kolonky (NucleoSpin Inhibitor Removal Column) umístěné v mikrozkušavce,
- centrifugovat 1 min při $11000 \times g$, odstranit kolonku, a pokud je ve zkušavce vidět peleta, čirý supernatant odpipetovat do nové mikrozkušavky; pokud peleta není přítomna, lze supernatant ponechat ve stejné mikrozkušavce,

Navázání DNA

- přidat 250 μ l pufru SB k supernatantu,
- vortexovat 5 s,
- převést 550 μ l vzorku do kolonky (NucleoSpin Inhibitor Soil Column) umístěné v mikrozkuhavce,
- centrifugovat 1 min při 11000 \times g, vylít filtrát z mikrozkuhavky,
- převést zbytek vzorku do kolonky,
- centrifugovat 1 min při 11000 \times g, vylít filtrát z mikrozkuhavky,

Promývání DNA

- přidat 500 μ l pufr SB do kolonky,
- centrifugovat 30 s při 11000 \times g, vylít filtrát z mikrozkuhavky,
- přidat 550 μ l pufru SW1 do kolonky,
- centrifugovat 30 s při 11000 \times g, vylít filtrát z mikrozkuhavky,
- přidat 700 μ l pufru SW2 do kolonky,
- krátce (2 s) vortexovat a následně centrifugovat 30 s při 11000 \times g, vylít filtrát z mikrozkuhavky,
- přidat 700 μ l pufru SW2 do kolonky,
- krátce (2 s) vortexovat a následně centrifugovat 30 s při 11000 \times g, vylít filtrát z mikrozkuhavky,
- centrifugovat 2 min při 11000 \times g,

Eluce DNA

- umístit kolonku do nové mikrozkuhavky,
- přidat 50 μ l pufru SE do kolonky,
- inkubovat s otevřeným víčkem 1 min při laboratorní teplotě,
- zavřít víčko a centrifugovat 30 s při 11000 \times g, odstranit kolonku,

Uchování DNA

- rozpuštěnou DNA lze dlouhodobě skladovat při -20 $^{\circ}$ C.

Poznámky: V případě potřeby lze stanovit koncentraci a čistotu DNA pomocí spektrofotometru. Opakované zmrazování a rozmrazování způsobuje degradaci DNA, proto je vhodné každý vzorek DNA před uskladněním rozdělit na několik menších částí, které se mohou využít při případných pozdějších opakováních analýz.

3. 2. 2. Polymerázová řetězová reakce – PCR

Cílem této metody je získat amplifikací dostatečný počet molekul specifického úseku DNA, který chceme detekovat. Amplifikace tohoto specifického úseku je umožněna jeho koncovým ohraničením dvojicí primerů. Tyto primery jsou krátké oligonukleotidy nasedající komplementárně na templátové vlákno a vymezující tak oblast syntézy komplementárního vlákna DNA polymerázou. Pro detekci patogena pomocí PCR je tedy nezbytně nutné zvolit takové primery, které budou druhově specifické. Dostupné sekvence primerů můžeme najít v publikacích. Rovněž si můžeme navrhnout primery *in silico* na základě využití sekvencí zveřejněných ve volně dostupných databázích a aplikací pro navrhování primerů na internetu. Pokud nejsou potřebné sekvence v databázi uvedeny, přistupuje se k sekvenování určitých úseků DNA a potom k návrhu primerů. U houbových patogenů jsou nejčastěji sekvenovány např. ITS regiony rDNA a úseky genů/geny kódující proteiny (β -tubulin, MAT faktory aj.). Kromě *in silico* analýzy je nezbytné ověřit specifčnost primerů v praxi, a to zařazením kontrolní DNA izolované z hostitelské rostliny a dalších patogenů napadajících hostitele z důvodu možné komplementarity primerů s DNA necílového organismu a získání falešně pozitivních výsledků. Pro většinu amplifikačních reakcí je vhodné provést optimalizaci koncentrací jednotlivých látek reakční směsi a teploty nasedání primerů.

U všech níže popsaných metod byly jako negativní kontroly používány zdravé rostliny řepky z výsevů desinfikovaného osiva ve skleníku. Přítomnost rostlinné DNA byla potvrzena amplifikací s primery rbcl F1F (Wolf *et al.*, 1994) a rbcl 1379R (Pryer *et al.*, 2001). Dále byly jako negativní kontroly křížově použity izoláty patogenů, kteří se mohou na řepce také vyskytovat. Kromě těch, jichž se týká tato metodika, to byly *Alternaria brassicae*, *A. brassicicola* a *Botrytis cinerea*. U *H. parasitica* byly jako další negativní kontroly použity izoláty *Peronospora arborescens* a *P. destructor*. Jako pozitivní kontroly sloužily izoláty *S. sclerotiorum*, *L. maculans*, *L. biglobosa*, *V. longisporum* a *V. dahliae* z holandské sbírky mikroorganismů (CBS) a izolát *V. dahliae* z české sbírky mikroorganismů (CCF). Testování funkčnosti metod probíhalo minimálně na desítkách až stovkách vzorků jednotlivých patogenů nasbíraných v ČR.

a) Determinace původce nádorovitosti kořenů brukvovitých (*Plasmodiophora brassicae*) v pletivu rostlin a v půdě

K izolaci DNA ze vzorku lze použít postup uvedený v kapitole 3. 2. 1. odstavec a), b), c). Pro detekci a determinaci patogena lze použít tyto primery (Cao *et al.*, 2007; obr. 5):

Primer	Sekvence primeru 5'→3'	Délka produktu
TC2F	AAACAACGAGTCAGCTTGAATGCTAGTGTG	519 bp
TC2R	CTTTAGTTGTGTTTCGGCTAGGATGGTTCG	

Složení reakční směsi (25 µl):

látka (zásobní koncentrace)	objem (finální koncentrace)
ddH ₂ O.....	18,7/18,55 µl
pufr pro DreamTaq polymerázu (10 ×) (Thermo Scientific)	2,5 µl (1×)
MgCl ₂ (25 mM) (Thermo Scientific).....	2 µl (2 mM)
dNTP (25mM/10 mM) (Thermo Scientific).....	0,1/0,25 µl (0,1 mM)
primer mix (10µM) (Sigma-Aldrich)	0,5 µl (0,2 µM každého)
DreamTaq polymeráza (5U/µl) (Thermo Scientific)	0,2 µl (1 U)
templátová DNA	1 µl (cca 10–100 ng)

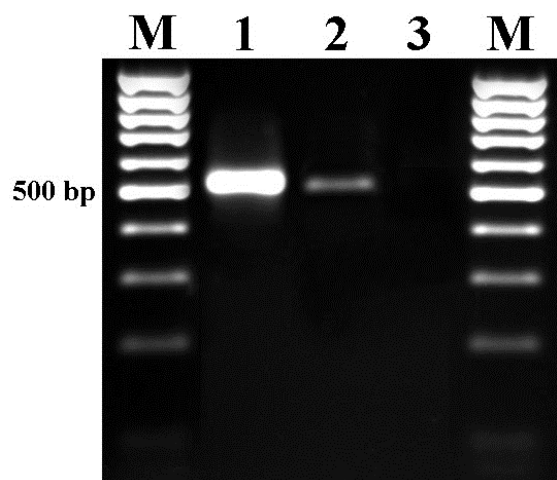
Amplifikační program:

(DNA Engine Peltier Thermal Cycler PTC-200, Biorad)

počáteční denaturace 94 °C, 2 min

35 cyklů { denaturace 94 °C, 45 s
annealing 65 °C, 45 s
polymerace 72 °C, 45 s

konečná polymerace 72 °C, 7 min



M - molekulární marker (MassRuler™ DNA Ladder Low Range, Thermo Scientific)
1 - rostlina infikovaná *P. brassicae*
2 - půda kontaminovaná *P. brassicae*
3 - negativní kontrola

Obr. 5. Elektroforetická separace PCR produktů po amplifikaci s primery TC2F/TC2R.

b) Determinace původce plísně brukvovitých (*Hyaloperonospora parasitica*) v pletivu rostlin

K izolaci DNA ze vzorku lze použít postup uvedený v kapitole 3. 2. 1. odstavec a) a b).

Pro detekci a determinaci patogena lze použít tyto primery (Singh, nepublikováno; obr. 6):

Primer	Sekvence primeru 5'→3'	NCBI přístup	Délka produktu
HPFP1	ATGCCCTTAGATGTTCTGGGC	AY210985.1	632 bp
HPRP1	GCGTTCTTCATCGATGTGCG		
HPFP2	AGATGTTCTGGGCCGCAC	AY210985.1	451 bp
HPRP2	AGCCTCCAGCCAAAATGACT		
HPFP3	TGCGCATCGTGATAGGGATA	AY210985.1	527 bp
HPRP3	ATGTGCGAGCCTAGACATCC		

Složení reakční směsi (25 µl):

látka (zásobní koncentrace)	objem (finální koncentrace)
ddH ₂ O.....	17,2 µl
pufr pro <i>Taq</i> polymerázu (10 ×) (Thermo Scientific)	2,5 µl (1×)
MgCl ₂ (25 mM) (Thermo Scientific).....	2,5 µl (2,5 mM)
dNTP (25mM) (Thermo Scientific)	0,3 µl (0,3 mM každého)
primer mix (10 µM) (Sigma-Aldrich)	1 µl (0,4 µM každého)
<i>Taq</i> polymeráza (5U/µl) (Thermo Scientific)	0,5 µl (2,5 U)
templátová DNA	1 µl (cca 10–100 ng)

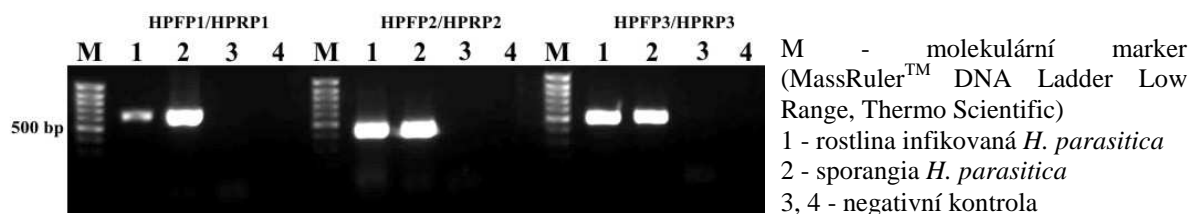
Amplifikační program pro všechny dvojice primerů:

(DNA Engine Peltier Thermal Cycler PTC-200, Biorad)

počáteční denaturace 95 °C, 5 min

35 cyklů { denaturace 95 °C, 1 min
annealing 65 °C, 30 s
polymerace 72 °C, 30 s

konečná polymerace 72 °C, 10 min



Obr. 6. Elektroforetická separace PCR produktů po amplifikaci s primery HPFP1/HPRP1, HPFP2/HPRP2 a HPFP3/HPRP3.

c) Determinace původců fomového černání stonků řepky (*Leptosphaeria maculans* a *L. biglobosa*) v pletivu rostlin

K izolaci DNA ze vzorku lze použít postup uvedený v kapitole 3. 2. 1. odstavec a) a b).
Pro detekci a determinaci patogenů lze použít primery HV17S/HV26C, WV17S/WV58C (Mahuku *et al.*, 1996; obr. 7) nebo LmacR, LbigF/LmacR (Liu *et al.*, 2006; obr. 8):

Primer	Sekvence primeru 5'→3'	Druh patogena	Délka produktu
HV17S ^a	CCCATTTTCAAAGCACTGCC	<i>L. maculans</i>	cca 370 bp
HV26C ^a	GAGTCCCAAGTGGAAACAAACA		
WV17S ^a	CCCTTCTATCAGAGGATTGG	<i>L. biglobosa</i>	cca 230 bp
WV58C ^a	GCTGCGTTCTTCATCGATGC		
LmacF ^b	CTTGCCCACCAATTGGATCCCCTA	<i>L. maculans</i>	331 bp
LmacR ^b	GCAAAATGTGCTGCGCTCCAGG		
LbigF ^b	ATCAGGGGATTGGTGTGACAGATTGA	<i>L. biglobosa</i>	444 bp
LmacR ^b	GCAAAATGTGCTGCGCTCCAGG		

^a PCR ^b Multiplex PCR

Poznámka: Pro determinaci patogenů rodu *Leptosphaeria* jsme testovali i primery publikované v článku Taylor *et al.*, 1993 a primery a metodiku PCR-RFLP publikované v článku Balesdent *et al.*, 1998. Z důvodu získání nespecifických výsledků a nemožnosti tak od sebe odlišit oba druhy patogenů použití těchto primerů nedoporučujeme.

Složení reakční směsi (25 µl):

<i>látka (zásobní koncentrace)</i>	<i>objem (finální koncentrace)</i>
ddH ₂ O.....	18,15/17,775 µl
pufr pro <i>Taq</i> polymerázu (10 ×) (Thermo Scientific)	2,5 µl (1×)
MgCl ₂ (25 mM) (Thermo Scientific)	2,5 µl (2,5 mM)
dNTP (25 mM/10 mM) (Thermo Scientific).....	0,25/0,625 µl (0,25 mM každého)
primer mix (25 µM) (Sigma-Aldrich)	0,4 µl (0,25 µM HV17S/HV26C; 0,25 µM WV17S/WV58C; 0,25 µM LmacF, LbigF/0,5 µM LmacR)
<i>Taq</i> polymeráza (5 U/µl) (Thermo Scientific)	0,2 µl (1 U)
templátová DNA	1 µl (cca 10–100 ng)

Amplifikační program pro primery HV17S/HV26C a WV17S/WV58C:

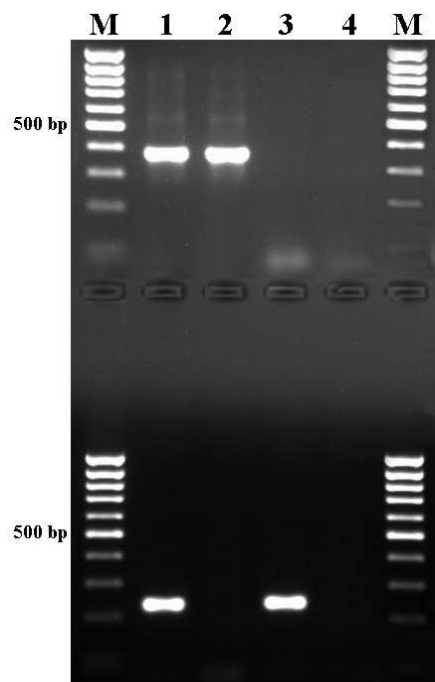
(DNA Engine Peltier Thermal Cycler PTC-200, Biorad)

počáteční denaturace	95 °C, 2 min
35 cyklů {	denaturace 94 °C, 1 min
	annealing 55 °C, 30 s
	polymerace 72 °C, 1 min
konečná polymerace	72 °C, 4 min

Amplifikační program pro primery LmacF, LbigF/LmacR – multiplex PCR:

(DNA Engine Peltier Thermal Cycler PTC-200, Biorad)

počáteční denaturace	95 °C, 2 min
30 cyklů	denaturace 95 °C, 15 s
	annealing 70 °C, 30 s
	polymerace 72 °C, 1 min
konečná polymerace	72 °C, 10 min



M - molekulární marker (MassRuler™ DNA Ladder Low Range, Thermo Scientific)

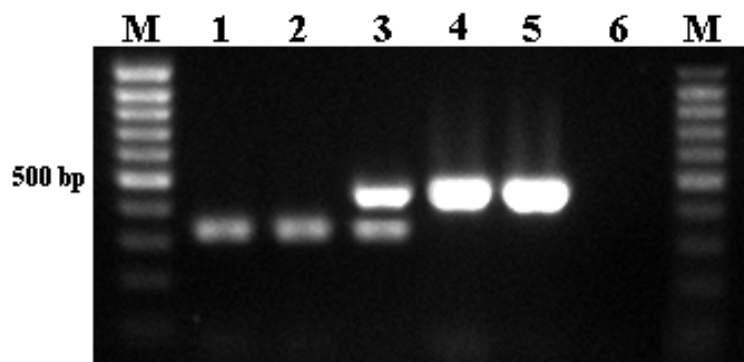
1 - rostlina infikovaná *L. maculans* a *L. biglobosa*

2 - rostlina infikovaná *L. maculans*

3 - rostlina infikovaná *L. biglobosa*

4 - negativní kontrola

Obr. 7. Elektroforetická separace PCR produktů po amplifikaci s primery HV17S/HV26C, WV17S/WV58C.



M - molekulární marker (MassRuler™ DNA Ladder Low Range, Thermo Scientific)

1 - rostlina infikovaná *L. maculans*

2 - rostlina infikovaná *L. maculans*

3 - rostlina infikovaná *L. maculans* a *L. biglobosa*

4 - rostlina infikovaná *L. biglobosa*

5 - rostlina infikovaná *L. biglobosa*

6 - negativní kontrola

Obr. 8. Elektroforetická separace PCR produktů po amplifikaci s primery LmacF/LbigF/LmacR.

d) Determinace původců verticiliového vadnutí řepky (*Verticillium* spp.) v pletivu rostlin

K izolaci DNA ze vzorku lze použít postup uvedený v kapitole 3. 2. 1. odstavec a) a b). Pro detekci a determinaci patogenů do rodu lze použít primery DB19/DB22 (Carder *et al.*, 1994; obr. 9) a VDS1/VDS2 (Li *et al.*, 1999; obr. 10) a do druhu primery Vlf/VLr (Steventon *et al.*, 2002; obr. 11) a D1f/AlfD1r, A1f/A1r a Df/Dr (Inderbitzin *et al.*, 2013; obr. 12):

Primer	Sekvence primeru 5'→3'	Druh patogena	Délka produktu
DB19 ^a	CGGTGACATAATACTGAGAG	<i>V. dahliae</i> /	cca 530 bp
DB22 ^a	GACGATGCGGATTGAACGAA	<i>V. longisporum</i>	
VDS1 ^a	CACATTCAGTTCAGGAGACGGA	<i>V. dahliae</i> /	567 bp
VDS2 ^a	CCGAAATACTCCAGTAGAAGG	<i>V. longisporum</i>	
Vlf ^a	TCTCCTCTCTACGAGAACGA	<i>V. longisporum</i>	340 bp
Vlr ^a	CACTTTCTAAGTATCCTTCCTAT		
D1f ^b	CCCCGGCCTTGGTCTGAT	<i>V. longisporum</i>	1020 bp
AlfD1r ^b	TGCCGGCATCGACCTTGG		
A1f ^b	AAGTGGAGCCCCGTATCTTGAAT	<i>V. longisporum</i>	310 bp
A1r ^b	CAACTGGCAACAGGGCTTGAAT		
Df ^b	CCGGTCCATCAGTCTCTCTG	<i>V. dahliae</i>	490 bp
Dr ^b	CTGTTGCCGCTTCACTCG		

^a PCR ^b Multiplex PCR

Poznámky: Druh *V. longisporum* je tvořen nejméně třemi skupinami, které vznikly díky hybridizaci dvou neznámých druhů a dvou linií *V. dahliae*. Z tohoto důvodu musí být do multiplex PCR zahrnuty všechny dvojice primerů – D1f/AlfD1r, A1f/A1r a Df/Dr. Výsledkem amplifikace s těmito primery pak mohou být tři varianty výsledků u *V. longisporum* viditelných na elektroforeogramu: fragment o velikosti 310 bp, dva fragmenty o velikosti 310 a 1020 bp a dva fragmenty o velikosti 490 a 1020 bp.

Pro detekci patogenů rodu *Verticillium* v pletivu rostlin byly v rámci metody ELISA použity také protilátky (Loewe a Bioreba), specifické proti *Verticillium* spp. Výsledky metody ELISA v případě použití obou protilátek odpovídaly výsledkům získaným molekulárními metodami.

Složení reakční směsi (25 µl) pro primery DB19/DB22, VDS1/VDS2, Vlf/VLr:

látka (zásobní koncentrace)

objem (finální koncentrace)

ddH₂O..... 18,15/17,775 µl

pufr pro *Taq* polymerázu (10 ×) (Thermo Scientific) 2,5 µl (1×)

MgCl₂ (25 mM) (Thermo Scientific) 2,5 µl (2,5 mM)

dNTP (25mM/10 mM) (Thermo Scientific)..... 0,25/0,625 µl (0,25 mM každého)

primer mix (25µM) (Sigma-Aldrich) 0,4 µl (0,4 µM každého)

Taq polymeráza (5U/µl) (Thermo Scientific) 0,2 µl (1 U)

templátová DNA 1 µl (cca 10–100 ng)

Složení reakční směsi (25 µl) pro primery D1f/AlfD1r/A1f/A1r/Df/Dr:

<i>látko (zásobní koncentrace)</i>	<i>objem (finální koncentrace)</i>
ddH ₂ O.....	16,05/15,675 µl
pufr pro <i>Taq</i> polymerázu (10 ×) (Thermo Scientific)	2,5 µl (1×)
MgCl ₂ (25 mM) (Thermo Scientific).....	2,5 µl (2,5 mM)
dNTP (25mM/10 mM) (Thermo Scientific).....	0,25/0,625 µl (0,25 mM každého)
primer mix (25µM) (Sigma-Aldrich)	2,5 µl (0,5 µM D1f, AlfD1r, A1f, A1r/0,25 µM Df, Dr)
<i>Taq</i> polymeráza (5U/µl) (Thermo Scientific)	0,2 µl (1 U)
templátová DNA	1 µl (cca 10–100 ng)

Amplifikační program pro primery DB19/DB22 a VDS1/VDS2:

(DNA Engine® Peltier Thermal Cycler - PTC-200, Biorad)

počáteční denaturace	95 °C, 5 min
30 cyklů {	denaturace 94 °C, 1 min
	annealing 58 °C, 30 s
	polymerace 72 °C, 1 min
konečná polymerace	72 °C, 4 min

Amplifikační program pro primery Vlf/Vl:

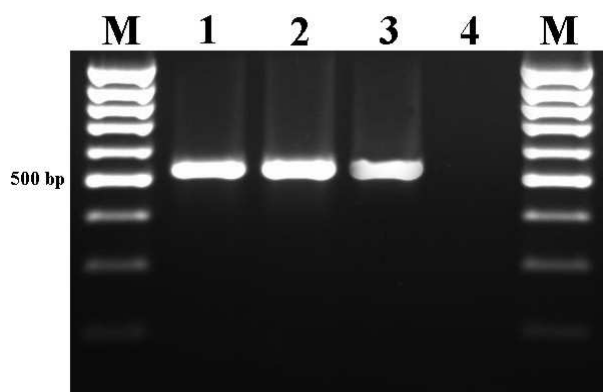
(DNA Engine® Peltier Thermal Cycler - PTC-200, Biorad)

počáteční denaturace	94 °C, 2 min
30 cyklů {	denaturace 94 °C, 1 min
	annealing 48 °C, 1 min
	polymerace 72 °C, 1 min
konečná polymerace	72 °C, 10 min

Amplifikační program pro primery D1f/AlfD1r/A1f/A1r/Df/Dr:

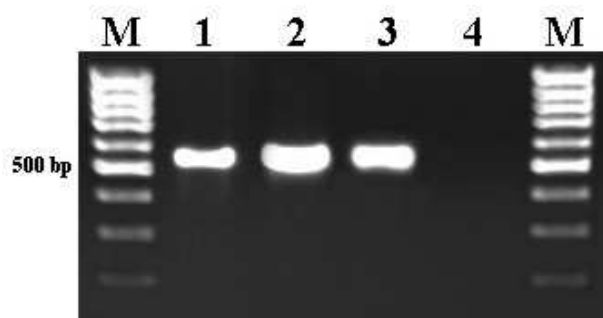
(DNA Engine® Peltier Thermal Cycler - PTC-200, Biorad)

počáteční denaturace	94 °C, 2 min
35 cyklů {	denaturace 94 °C, 10 s
	annealing 64 °C, 15 s
	polymerace 72 °C, 1 min
konečná polymerace	72 °C, 7 min



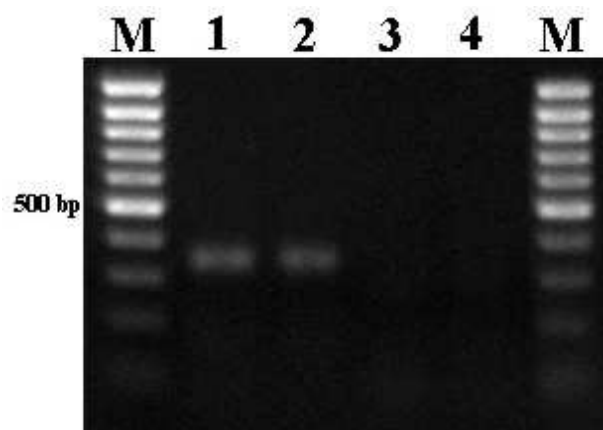
M - molekulární marker (MassRuler™ DNA Ladder Low Range, Thermo Scientific)
 1 - rostlina infikovaná *V. longisporum*
 2 - rostlina infikovaná *V. longisporum*
 3 - rostlina infikovaná *V. dahliae*
 4 - negativní kontrola

Obr. 9. Elektroforetická separace PCR produktů po amplifikaci s primery DB19/DB22.



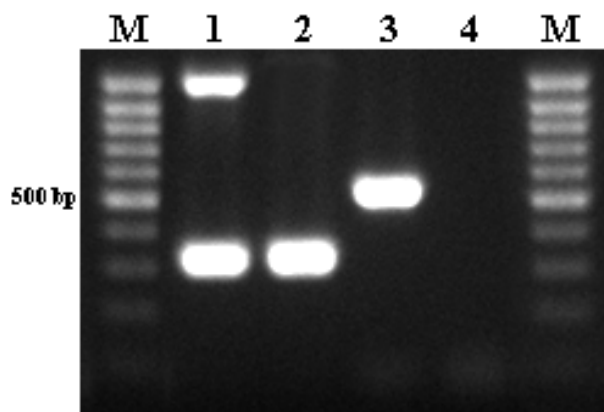
M - molekulární marker (MassRuler™ DNA Ladder Low Range, Thermo Scientific)
 1 - rostlina infikovaná *V. longisporum*
 2 - izolát *V. longisporum*
 3 - izolát *V. dahliae*
 4 - negativní kontrola

Obr. 10. Elektroforetická separace PCR produktů po amplifikaci s primery VDS1/VDS2.



M - molekulární marker (MassRuler™ DNA Ladder Low Range, Thermo Scientific)
 1 - rostlina infikovaná *V. longisporum*
 2 - izolát *V. longisporum*
 3 - izolát *V. dahliae*
 4 - negativní kontrola

Obr. 11. Elektroforetická separace PCR produktů po amplifikaci s primery Vlf/VLr.



M - molekulární marker (MassRuler™ DNA Ladder Low Range, Thermo Scientific)
 1 - rostlina infikovaná *V. longisporum*
 2 - izolát *V. longisporum*
 3 - izolát *V. dahliae*
 4 - negativní kontrola

Obr. 12. Elektroforetická separace PCR produktů po amplifikaci s primery D1f/AlfD1r/A1f/Alr/Df/Dr.

e) Determinace původce bílé hniloby řepky (*Sclerotinia sclerotiorum*) v pletivu rostlin

K izolaci DNA ze vzorku lze použít postup uvedený v kapitole 3. 2. 1. odstavec a) a b).

Pro detekci a determinaci patogena lze použít tyto primery (Freeman *et al.*, 2002; obr. 13):

Primer	Sekvence primeru 5'→3'	Délka produktu
SSFWD	GCTGCTCTTCGGGGCCTTGTATGC	278 bp
SSREV	TGACATGGACTCAATACCAAGCTG	

Složení reakční směsi (25 µl):

látka (zásobní koncentrace)

objem (finální koncentrace)

ddH ₂ O.....	18,15/17,775 µl
pufř pro <i>Taq</i> polymerázu (10 ×) (Thermo Scientific)	2,5 µl (1×)
MgCl ₂ (25 mM) (Thermo Scientific)	2,5 µl (2,5 mM)
dNTP (25mM/10 mM) (Thermo Scientific).....	0,25/0,625 µl (0,25 mM každého)
primer mix (25µM) (Sigma-Aldrich)	0,4 µl (0,4 µM každého)
<i>Taq</i> polymeráza (5U/1µl) (Thermo Scientific)	0,2 µl (1 U)
templátová DNA	1 µl (cca 10–100 ng)

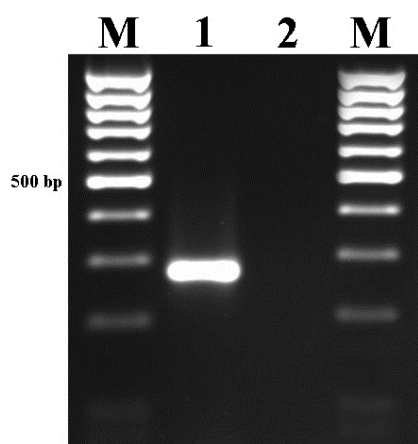
Amplifikační program – Touchdown-PCR:

(DNA Engine® Peltier Thermal Cycler - PTC-200, Biorad)

počáteční denaturace 95 °C, 5 min

30 cyklů {
denaturace 94 °C, 30 s
annealing 1 min
teplota klesá každé 2 cykly o 1 °C ze 72 °C na 64 °C, poslední
teplota nasedání primerů 65 °C je nastavena na 16 cyklů
polymerace 72 °C, 1 min

konečná polymerace 72 °C, 4 min



M - molekulární marker (MassRuler™ DNA Ladder Low Range, Thermo Scientific)

1 - rostlina infikovaná *S. sclerotiorum*

2 - negativní kontrola

Obr. 13. Elektroforetická separace PCR produktů po amplifikaci s primery SSFWD/SSREV.

3. 2. 3. Elektroforetická separace a vizualizace amplifikovaných úseků DNA

Amplifikované úseky DNA bývají rozdělovány elektroforetickou separační metodou, která je založena na odlišné pohyblivosti v tomto případě záporně nabitých molekul DNA ve stejnosměrném elektrickém poli. Nejčastěji používaným nosičem je agarózový gel, jehož koncentrace (hustota sítě polymerních molekul) ovlivňuje prostupnost různě velkých fragmentů DNA. Pro fragmenty o velikosti od 100–1000 bp běžně postačuje 1% agarózový gel. Množství připravovaného gelu závisí na počtu vzorků, zvolené velikosti vaničky a použitém hřebínku. Pro vizualizaci separovaných úseků DNA lze použít interkalární barvivo ethidium bromid a UV transiluminátor. Ethidium bromid je možné aplikovat přímo do gelu nebo do barvicího roztoku. V každém případě je nutné dbát zvýšené opatrnosti při manipulaci s touto látkou, neboť patří mezi látky s mutagenními vlastnostmi a v laboratoři vyhradit místo pro práci s ním a materiál jím kontaminovaný (gel, rukavice atd.) likvidovat jako nebezpečný odpad.

Příprava 1–1,5% agarózového gelu pro horizontální elektroforézu (MultiSUB Choice, Cleaver)

- smíchat v Erlenmayerově baňce příslušnou navážku agarózy v příslušném objemu TBE pufru (89 mM Tris base, 89 mM kyselina boritá, 2 mM EDTA, pH 8.3) odpovídající velikosti elektroforetické vaničky,
- zahřát směs v mikrovlnné troubě do úplného rozvaření agarózy,
- přidat ethidium bromid (finální koncentrace 0,5 µg/ml) do ochlazeného gelu (50–55 °C), důkladně promíchat,
- rozlít gel do elektroforetické vaničky opatřené těsnícími gumami a vložit hřebínky,
- po ztuhnutí gelu odstranit hřebínky a těsnící gumičky a umístit vaničku do elektroforetické soupravy obsahující TBE pufr,

Nanášení PCR produktů

- PCR produkty smíchat s nanášecí barvou (6 × Orange Loading Dye, Thermo Scientific) v poměru 5:1,
- nanést PCR produkty a hmotnostní standard (MassRuler™ DNA Ladder Low Range (Thermo Scientific) do jamek v gelu,
- spustit elektroforetický zdroj (elektrické napětí 5–8 V/cm),

Vizualizace DNA fragmentů

- DNA fragmenty lze vizualizovat pomocí UV transiluminátoru a porovnat jejich velikost s hmotnostním standardem; výsledný elektroforeogram lze zdokumentovat vhodným automatickým dokumentačním a analytickým systémem.

3. 2. 4. Detekce *Plasmodiophora brassicae* pomocí qPCR

K izolaci DNA ze vzorku lze použít postup uvedený v kapitole 3. 2. 1. odstavec a), b), c).
Použitelné primery (Rennie *et al.*, 2011; obr. 14, 15, 16):

Primer	Sekvence primeru 5'→3'
DC1F	CCTAGCGCTGCATCCCATAT
DC1R	CGGCTAGGATTCGAAAA

Složení reakční směsi (10 µl):

látka (zásobní koncentrace) *objem (finální koncentrace)*

SYBR Select Master mix (Life Technologies) 5 µl (2×)
primer mix (50 µM) 2,5 µl (12,5 µM)
templátová DNA 2,5 µl (cca 100 ng)

Amplifikační program:

(CFX96 Touch™ cycler, CFX Manager™ software, Biorad)

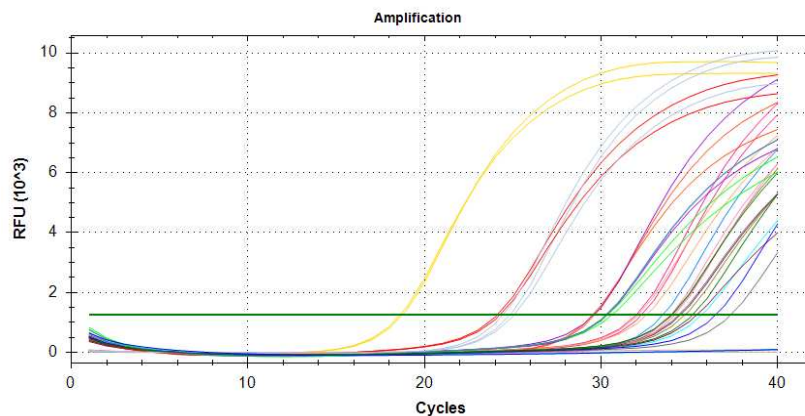
počáteční denaturace 95 °C, 2 min

35 cyklů { denaturace 95 °C, 15 s
annealing + polymerace 60 °C, 60 s

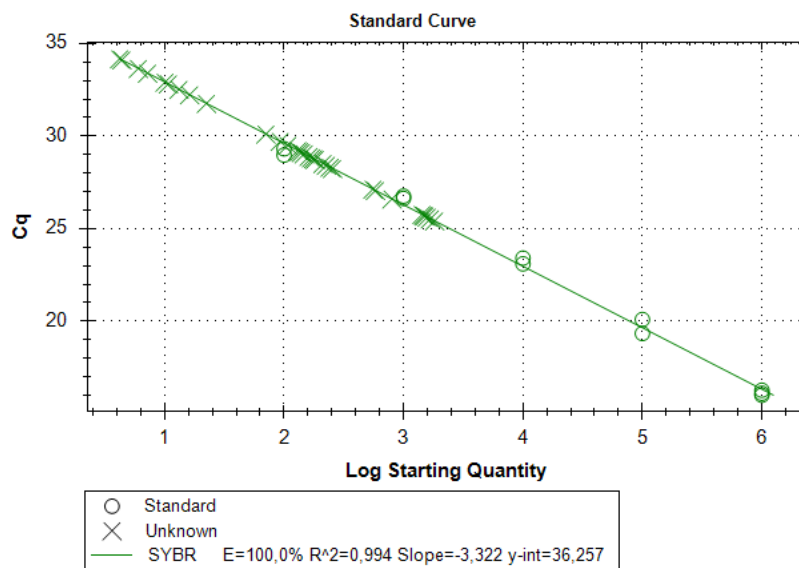
Příprava kalibrační křivky, modifikace podle Cao *et al.* (2007)

- rozmixovat 100 g kořenových nádorů v 500 ml ddH₂O a scedit přes kovové síto (Ø ok 450 µm),
- homogenát centrifugovat ve výkyvném rotoru při 4000 × g 10 min, supernatant vylít,
- pelety rozpustit v 500 ml ddH₂O a opakovat předchozí krok,
- pelety rozpustit ve 100 ml 50% sacharózy a centrifugovat 10 min při 2000 × g,
- separovat suspenzi obsahující spory a naředit ji 1:6 ddH₂O,
- centrifugovat 10 min při 4000 × g,
- spory kvantifikovat pomocí hemocytometru (podle Neubauera) a upravit koncentraci na 1x10⁸ spor/ml,
- izolovat DNA dle postupů uvedených v kapitole 3. 2. 1. odstavec a) a b) a připravit ředící řadu koncentrací odpovídajících 1 × 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10² a 10¹ spor/ml.

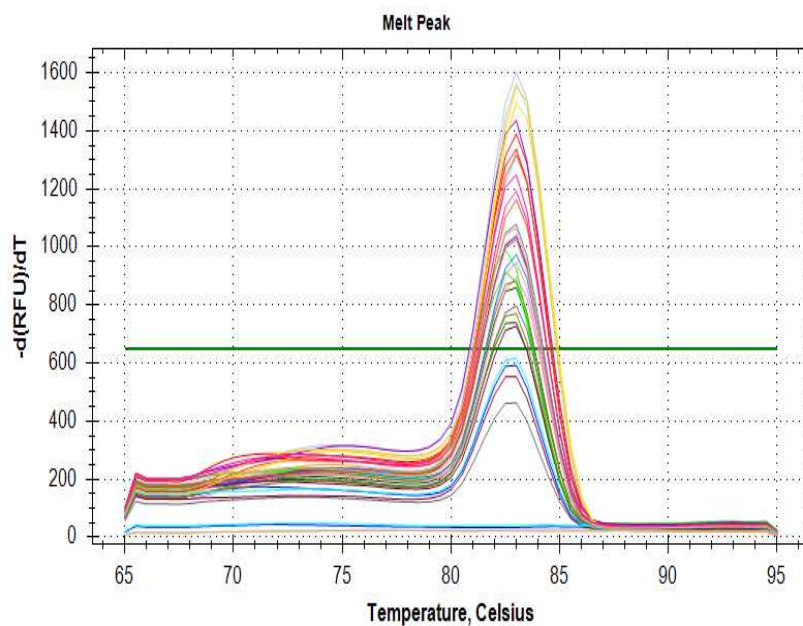
Poznámka: Použití této metody je omezeno její citlivostí. Detekční limit metody je 1000 spor na gram půdy.



Obr. 14. Příklad výsledků qPCR.



Obr. 16. Křivky tání produktů jako kontrola speciřičnosti reakce.



Obr. 15. Porovnání hodnot vzorků se standardy.

4. Srovnání novosti postupů

Pokud se vůbec v praxi dělá, je determinace původců chorob řepky dosud prováděna především na základě symptomů na rostlinách, což může být značně nepřesné. Jak už bylo řečeno v úvodu, kulturační a následující mikroskopické diagnostické metody nemusejí být vždy přesné a jejich nevýhodou je i relativní zdlouhavost. Pro některé patogeny (obligátní) nemohou být vůbec použity, nebo jen s obtížemi (*Plasmodiophora brassicae*, *Hyaloperonospora parasitica*). Monitoring půdních patogenů, jakým je opět např. *Plasmodiophora brassicae*, bylo až donedávna možné provádět pouze biotestem s použitím lapacích rostlin některých druhů z čeledi brukvovitých. Tento způsob může být poměrně přesný, ale současně je i velmi zdlouhavý. Molekulární diagnostické metody mají řadu výhod. Jejich postup je univerzální, tj. velmi podobný u všech patogenů, ať už jde o viry, bakterie, houby či další patogeny. Vycvičený personál má tedy se zavedením postupu determinace nového patogena menší problémy než při determinaci mikroskopické. Dalšími výhodami jsou velká citlivost a rychlost. Pomocí výběru vhodných primerů můžeme také do určité míry regulovat specifičnost determinace od detekce určitých jednotlivých mutací až po obecnou specifičnost na rody nebo dokonce i vyšší taxony.

Jednotná metodika shrnující moderní diagnostické metody pro determinaci patogenů řepky v rostlinách a půdě nebyla zatím u nás vydána. Z tohoto hlediska lze tuto metodiku považovat za novou.

5. Popis uplatnění metodiky

Metodika je primárně určena pro specializované laboratoře, které se zabývají diagnostikou patogenů rostlin, ať už pro účely dalšího výzkumu nebo pro praxi. Prostřednictvím prakticky zaměřených laboratoří budou výsledky metodiky využívat i jednotliví pěstitelé řepky či Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin. Dalšími uživateli mohou být univerzity a případně střední školy, které mohou popsané diagnostické postupy zařadit do svých cvičení v předmětech zabývajících se chorobami rostlin a diagnostikou jejich původců.

Metodika bude volně dostupná v tištěné podobě, ale především také na webových stránkách České zemědělské univerzity v Praze (www.czu.cz).

6. Ekonomické aspekty

1) Náklady na zavedení metodiky

Pro laboratoř etablovanou v použití molekulárních metod nepředstavuje převzetí popsaných postupů žádné vícenáklady (investice), protože se zde využívá běžného zařízení, kterým je laboratoř už vybavena (automatické pipety, váhy, chlazené centrifugy, lednice a mrazáky, elektroforéza, termocyklery). Veškeré náklady na zavedení metodiky zde budou směřovat pouze na spotřební materiál. O molekulárních metodách se obvykle tvrdí, že jsou drahé, což může být do určité míry pravda o použitých chemikáliích, které je třeba nakoupit. Nicméně tato tvrzení obvykle zanedbávají náklady na pracovní sílu, a zde je třeba zdůraznit nižší časovou náročnost na provedení jedné analýzy než třeba při kultivaci. Celková

produktivita u molekulárních metod roste do určité míry s rostoucím počtem vzorků daleko rychleji než u kultivace. Přesná čísla však je nemožné uvést, protože vše závisí i na konkrétním vybavení laboratoře. Časově a pracovně náročnou etapou je především extrakce nukleových kyselin, kterou lze vyřešit pomocí extrakčního automatu.

Pokud by se jednalo o laboratoř, která se teprve chce vybavit, je třeba počítat s náklady dosahujícími obvykle minimálně stovek tisíc s možným přesahem až přes milion Kč v závislosti na požadované úrovni vybavení, která by měla vyplývat z předpokládaného počtu analýz. Například jen výše uvedený přístroj na extrakci nukleových kyselin vychází na několik set tisíc Kč.

2) Přínosy zavedení metodiky

Ekonomické přínosy zavedení této metodiky lze najít na několika úrovních:

a) u diagnostické laboratoře:

- zvýšení produktivity práce ve srovnání s klasickými diagnostickými metodami (viz výše),
- snížení materiálových nákladů na adaptaci molekulárních metod v porovnání se zaváděním vlastního postupu s jeho odzkoušením, i když je většinou nutné zvolenou metodu vyzkoušet a ověřit v podmínkách dané laboratoře. Tuto úsporu lze u klasické PCR odhadovat řádově na 5–10 tis. Kč na každého patogena. Kromě toho, že se ušetří samotné reagenty, laboratoř např. nemusí kupovat referenční izoláty patogenů ze sbírek jako pozitivní a negativní kontroly pro optimalizaci a validaci metody (1 izolát z holandské sbírky mikroorganismů například stojí okolo 100 Euro). U qPCR (kvantitativní PCR) budou tyto úspory ještě daleko vyšší, odhadem okolo 15 tis. Kč na patogena.
- snížení spotřeby pracovního času personálu laboratoře na adaptaci nového postupu. Tuto úsporu lze odhadovat v poměrně širokém rozmezí několika pracovních člověkodnů (hledání a porovnávání postupů popsanych v literatuře, výběr vhodných primerů a jejich testování *in silico*, optimalizace koncentrací jednotlivých složek reakcí a teplot atd.). U qPCR je optimalizace reakcí časově ještě daleko náročnější. Finančně lze tuto úsporu odhadnout na 10–20 tis. Kč na patogena.

b) u koncových uživatelů výsledků diagnostické činnosti (pěstitelů):

- diagnostika v reálném čase umožní operativnější rozhodování o použití/nepoužití fungicidu, ovšem odhad přínosu je obtížný. Pokud by se na tomto základě ušetřilo pouze jedno ošetření na 5 % plochy řepky, při ceně cca 1000 Kč/ha (fungicid + ošetření) by v ČR ročně šlo o 20 mil. Kč.
- předběžné otestování pozemku na výskyt *P. brassicae* umožní operativnější rozhodování o použití rezistentní/náchylné odrůdy. Přínosy v tomto případě vzniknou buď na straně ušetřených nákladů na osivo rezistentní odrůdy a vyššího výnosu tam, kde rezistentní odrůda není potřeba, nebo v opačném případě na straně vyšších výnosů při jejím odůvodněném nasazení. Úspora na osivu může činit cca 200–400 Kč/ha (rozdíl v ceně mezi náchylnými a rezistentními odrůdami) a vyšší výnos náchylných odrůd na nezamořeném pozemku může reprezentovat cca 5–10 tis. Kč, zatímco zisk při vhodném nasazení rezistentní odrůdy na

zamořeném pozemku se může pohybovat okolo 10–15 tis. Kč/ha. Tyto odhady jsou založeny na výsledcích našich poloprovozních odrůdových pokusů na zamořených a nezamořených pozemcích (Řičařová, Kazda 2015; Řičařová a kol., 2015). Je však třeba zdůraznit, že takovéto rozhodování je nutné jen u ohrožených pozemků (např. v podnicích, které už problémy s nádorovitostí mají), jejichž zamořenost není dosud známa. Pravděpodobně velmi nepřesně lze plochu těchto pozemků odhadnout na cca 14 tis. ha (140 podniků (údaj dle monitoringu SPZO) x 10 ha). Zvýšení zisků při správném nasazení odrůd se tedy může pohybovat v řádech desítek milionů Kč.

7. Seznam související literatury

Anonym 2014. Soupis ploch osevů [online]. Český statistický úřad. 11. 7. 2014 [cit. 2014-10-18]. Dostupné z <<https://www.czso.cz/csu/czso/soupis-ploch-osevu-2014-aktclm38mi>>.

Bernardová, M. 2015. Plíseň zelná *Peronospora parasitica*. Agrotip, 2015(10), 6–7.

Carder, J. H., Morton, A., Tabrett, A. M., Barbara, D. J. 1994. Detection and differentiation by PCR of sub-specific groups within two *Verticillium* species causing vascular wilts in herbaceous hosts. In: Schots, A., Dewey, F. M., Oliver, R., eds. Modern Assays for Plant Pathogenic Fungi: Identification, Detection and Quantification. Proceedings of COST-88 Meeting, Oxford, 1993. Wallingford, UK: CAB International, 91–97.

Cao, T., Tewari, J. P., Strelkov, S. E. 2007. Molecular detection of *Plasmodiophora brassicae*, causal agent of clubroot of crucifers, in plant and soil. Plant Disease, 91, 80–87.

Čermák, V., Gaar, V. 2013. Hád'átko řepné (*Heterodera schachtii*) – vzorkování, detekce a identifikace. Listy cukrovarnické a řepařské, 129(9–10), 275–282.

Freeman, J., Ward, E., Calderon, C., McCartney, A. 2002. A polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum*. European Journal of Plant Pathology, 108(9), 877–886.

Inderbitzin, P., Davis, R. M., Bostock, R. M., Subbarao, K. V. 2013. Identification and differentiation of *Verticillium* species and *V. longisporum* lineages by simplex and multiplex PCR assays. PloS One, 8(6), e65990.

Kazda, J. Ryšánek, P. 2011: Virové choroby řepky v České republice. Úroda, 59(1), 24–26.

Kazda, J., Baranyk, P., Herda, G., Nerad, D., Škeřík, J., Volf, M. 2008. Metodika integrované ochrany řepky. SPZO, 82 s.

Li, K. N., Rouse, D. I., Eyestone, E. J., German, T. L. 1999. The generation of specific DNA primers using random amplified polymorphic DNA and its application to *Verticillium dahliae*. Mycological Research, 103, 1361–1368.

Liu, S. Y., Liu, Z., Fitt, B. D., Evans, N., Foster, S. J., Huang, Y. J., Latunde-Dada, A. O., Lucas, J. A. 2006. Resistance to *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in *Brassica napus* (oilseed rape) induced by *L. biglobosa* and chemical defence activators in field and controlled environments. Plant Pathology, 55(3), 401–412.

- Mahuku, G. S., Hall, R., Goodwin, P. H. 1996. Co-infection and induction of systemic acquired resistance by weakly and highly virulent isolates of *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 49, 61–72.
- Marek, M., Zouhar, M., Douda, O., Maňasová, M., Ryšánek, P. 2014: Exploitation of FTA cartridges for the sampling, long-term storage, and DNA-based analyses of plant-parasitic nematodes. *Phytopathology*, 104, 306–312.
- Plachká, E. 2015. Význam plísně brukvovitých v pěstování řepky olejky v ČR. *Agrotip*, 2015(10), 8–10.
- Plachká, E., Odstrčilová, L. 2007. Houbové choroby řepky olejky v roce 2006/2007 a fungicidní ošetření. *Sborník 21.–22. 11. 2007 Hluk. Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin, SPZO s.r.o.*, s. 317–321.
- Plachká, E., Poslušná, J. 2014. Zdravotní stav řepky olejky ozimé na Opavsku a Šumpersku v sezóně 2013/2014. In: *Sborník referátů 31. Vyhodnocovací seminář Systém výroby řepky a Systém výroby slunečnice, HLUK, 19.–20. 11. 2014, SPZO s.r.o., Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin, Praha. s. 140–148.*
- Prokinová, E. 2001: Odběr a doprava rostlinného materiálu pro fytopatologickou laboratoř. *Česká fytopatologická společnost*, 24 s.
- Pryer, K. M., Smith, A. R., Hunt, J. S., & Dubuisson, J. Y. 2001. rbcL data reveal two monophyletic groups of filmy ferns (Filicopsida: Hymenophyllaceae). *American Journal of Botany*, 88(6), 1118–1130.
- Rennie, D. C., Manolii, V. P., Cao, T., Hwang, S. F., Howard, R. J., Strelkov, S. E. 2011. Direct evidence of surface infestation of seeds and tubers by *Plasmodiophora brassicae* and quantification of spore loads. *Plant Pathology*, 60(5), 811–819.
- Řičařová, V., Kazda, J. 2015. Poloprovozní pokusy s odrůdami ozimé řepky rezistentními k *Plasmodiophora brassicae* v Hrádku nad Nisou. *Výsledky pokusů SPZO, Hluk 25.–26. 11. 2015*, 84–88.
- Řičařová, V., Kazda, J., Baranyk P. 2015. Poloprovozní pokusy s odrůdami ozimé řepky rezistentními k *Plasmodiophora brassicae* (Wor.) – původci nádorovitosti kořenů brukvovitých. *Sborník z konference „Prosperující olejniny“, ČZU 10.–11. 12. 2015*, 77–81.
- Říha, K. 2015. Výskyt chorob řepky ozimé v sezóně 2014 až 2015. *Sborník 32. vyhodnocovacího semináře Systém výroby řepky, Hluk 25.–26. 11. 2015*, 62–72.
- Steventon, L. A., Fahleson, J., Hu, Q., Dixelius, C. 2002. Identification of the causal agent of Verticillium wilt of winter oilseed rape in Sweden, *V. longisporum*. *Mycological Research*, 106(5), 570–578.
- Wolf, P. G., Soltis, P. S., & Soltis, D. E. 1994. Phylogenetic relationships of dennstaedtioid ferns: evidence from rbcL sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*, 3(4), 383–392.

8. Seznam publikací, které předcházely metodice

Mazáková, J. 2008: Detekce a determinace patogenů *Sclerotinia sclerotiorum* a *Verticillium* sp. v rostlinném pletivu řepky olejky pomocí molekulárně biologických metod. Závěrečná zpráva interního grantu, ČZU v Praze, 10 s.

Ryšánek, P., Mazáková, J., Řičařová, V. 2015: Laboratorní diagnostika hlavních patogenů řepky. Rostlinolékař, 26(6), 35–37.

Ryšánek, P., Mazáková, J., Zouhar, M., Jaňourová, B., Plachká, E. 2009: Monitoring *Leptosphaeria maculans* a *Leptosphaeria biglobosa*, původců fomové hniloby – rakoviny stonku řepky, na území České republiky v letech 2007 a 2008. XVIII. Česká a slovenská konference o ochraně rostlin, MZLU v Brně, 2.–4. září 2009. Sborník abstraktů: 114.

Ryšánek, P., Urban, J., Mazáková, J., Zouhar, M., Plachká, E., Poslušná, J., Pokorný, R., Spitzer, T. 2010. Monitoring výskytu *Leptosphaeria maculans* a *L. biglobosa* na území České republiky. Úroda 58, 12, vědecká příloha, 343–346.

Řičařová, V. 2015. *Plasmodiophora brassicae* Wor. na ozimé řepce. Práce ke státní doktorské zkoušce. ČZU v Praze, 61 s.

Řičařová, V., Kazda, J. 2015. Poloprovozní pokusy s odrůdami ozimé řepky rezistentními k *Plasmodiophora brassicae* v Hrádku nad Nisou. Výsledky pokusů SPZO, Hluk 25.–26. 11. 2015, 84–88.

Řičařová, V., Kazda, J., Baranyk P. 2015. Poloprovozní pokusy s odrůdami ozimé řepky rezistentními k *Plasmodiophora brassicae* (Wor.) – původci nádorovitosti kořenů brukvovitých. Sborník z konference „Prosperující olejniny“, ČZU 10.–11. 12. 2015, 77–81.

Řičařová, V., Singh, S. K., Kazda, J., Zouhar, M., Prokinová, E., Grimová, L., Ryšánek, P. 2014. Studies of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) on oilseed rape in the Czech Republic. Integrated Control in Oilseed Crops IOBC - WPRS Bulletin, 104, 161–168.

Singh, K., Zouhar, M., Mazakova, J., Rysanek, P. 2014. Genome wide identification of the immunophilin gene family in *Leptosphaeria maculans*: a causal agent of blackleg disease in oilseed rape (*Brassica napus*). OMICS: a Journal of Integrative Biology, 18(10), 645–657.

Urban, J., Mazáková, J., Zouhar, M., Ryšánek, P., Beranová, L. 2012. Monitoring of phoma leaf spot pathogens on winter oilseed rape in selected areas of the Czech Republic. Sborník 19. slovenské a české konference o ochraně rostlin, Nitra, s. 123.