

JAROSLAV SALAVA, DAVID NOVOTNÝ  
A IVANA POLIŠENSKÁ

**DETEKCE *FUSARIUM LANGSETHIAE*  
MOLEKULÁRNÍMI METODAMI**

**METODIKA PRO PRAXI**



Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

2010

Metodika vznikla za finanční podpory Ministerstva zemědělství České republiky a je výstupem projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum QH81060 “Stanovení příčin a možnosti omezení nových rizik spojených s výskytem fuzáriových mykotoxinů”.

Metodika je určena pro praxi. O uplatnění metodiky byla 20. 12. 2010 podle ustanovení § 269 zákona 513/1991 Sb., obchodního zákoníku uzavřena smlouva s firmou AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby s.r.o.

Oponenti: Doc. Ing. Michal Tomšovský, Ph.D., Mendelova univerzita v Brně  
Lesnická a dřevařská fakulta, Brno  
Mgr. Hana Orságová, Státní rostlinolékařská správa, Odbor diagnostiky, Olomouc

Metodika byla schválena Ministerstvem zemědělství ČR – odborem rostlinných komodit pod č.j. 1/38204-2010.

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2010  
ISBN 978-80-7427-062-8

## OBSAH

<b>Obsah</b> .....	<b>3</b>
<b>Abstrakty</b> .....	<b>4</b>
<b>I) Cíl metodiky</b> .....	<b>4</b>
<b>II) Vlastní popis metodiky</b> .....	<b>4</b>
Úvod.....	4
Morfologie a fyziologie <i>Fusarium langsethiae</i> a blízkých druhů.....	5
<i>Fusarium langsethiae</i> .....	5
<i>Fusarium poae</i> .....	7
<i>Fusarium sporotrichioides</i> .....	8
<i>Fusarium kyushuense</i> .....	10
<i>Fusarium tricinctum</i> .....	10
Morfologické a fyziologické odlišení <i>Fusarium langsethiae</i> od jiných druhů.....	11
Detekce <i>Fusarium langsethiae</i> molekulárními metodami.....	11
Princip diagnostiky.....	11
Metodika vychází z literatury.....	11
Vybavení laboratoře a chemikálie.....	11
Izolace celkové DNA z rostlinných pletiv.....	14
Polymerázová řetězová reakce.....	15
Analýza produktů PCR, Elektroforéza.....	16
Výsledek.....	18
Závěr.....	18
<b>III) Srovnání „novosti postupů“ oproti původní metodice, případně jejich.....</b>	<b>19</b>
<b>zdůvodnění, pokud se bude jednat o novou neznámou metodiku</b>	
<b>IV) Popis uplatnění metodiky, pro koho je určena, jakým způsobem .....</b>	<b>19</b>
<b>bude uplatněna</b>	
<b>V) Ekonomické aspekty.....</b>	<b>19</b>
<b>VI) Seznam použité literatury .....</b>	<b>20</b>
<b>VII) Seznam publikací, které předcházely metodice a byly publikovány .....</b>	<b>21</b>
<b>(pokud existují)případně výstupy z určité znalosti, jestliže se jedná o originální práci.</b>	

## **ABSTRAKT: Detekce *Fusarium langsethiae* molekulárními metodami**

*Fusarium langsethiae* je dosud přehlížený mykotoxinogenní druh, vyskytující se na obilovinách. Tato houba byla dosud řidce zaznamenávána pomocí klasických kultivačních mykologicko-mikrobiologických metod, protože se vyznačuje pomalejším růstem než jiné druhy hub na agarových živných médiích při teplotě 20-25°C, při které je inkubován největší počet vzorků. Metodika dává přesný pracovní postup pro detekci houby *Fusarium langsethiae* v pletivech obilovin pomocí molekulárních metod. Metodika je založena na využití polymerázové řetězové reakce (PCR) s druhově specifickými primery.

## **ABSTRACT: Detection of *Fusarium langsethiae* by molecular methods**

*Fusarium langsethiae* is to date neglected mycotoxicogenic species occurring in cereals. Till now this fungus has been recorded by means of conventional cultivation mycological methods infrequently, because it is characterized by slower growth, than other fungal species, on agar nutrient media at temperature 20-25°C, when the most of samples is cultivated. The protocol provides a precision assay for detection of the fungus *F. langsethiae* in cereal tissues using molecular methods. The procedure is based on the use of polymerase chain reaction (PCR) with species-specific primers.

## **I) CÍL METODIKY**

Cílem metodiky je poskytnout přesný pracovní postup pro detekci druhu *Fusarium langsethiae* v zrnech obilovin pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR).

## **II) VLASTNÍ POPIS METODIKY**

### **Úvod**

Houby anamorfního rodu *Fusarium* (teleomorfní rody *Gibberella*, *Albonectria* a *Haematonectria*, čeleď Nectriaceae, řád Hypocreales Sordariomycetidae, Sordariomycetes, Ascomycota) patří z hlediska zemědělství k nejvýznamnějším, protože mohou způsobovat choroby různých hospodářsky významných rostlin, na prvním místě obilovin, ale také produkovat mykotoxiny, které snižují kvalitu nebo dokonce znehodnocují některé zemědělské produkty. Nejvýznamnější chorobou obilovin způsobenou druhy z rodu *Fusarium* je fuzarióza klasu (angl. *Fusarium* head blight = head scab = *Fusarium* ear blight = ear scab), jejíž vyvolání je spojováno s nejméně 17 druhy z tohoto rodu. Nejčastěji jsou zaznamenávány druhy *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae* a *Microdochium nivale* var. *nivale* a var. *majus* (Kirk *et al.* 2008, Desjardins 2006, Parry *et al.* 1995, Leonard et Bushnell 2003). Dnes je jich známo okolo 160 druhů a stále jsou rozpoznávány další druhy (Kirk *et al.* 2008, Leslie *et* Summerell 2006). Toto je případ druhu *Fusarium langsethiae* Torp *et* Nirenberg, který byl popsán v roce 2004 (Torp *et* Nirenberg 2004). Tento druh je blízký zástupcům ze sekce *Sporotrichiella* a to druhům *F. poae*, *F. sporotrichioides* a *F. kyushuense*, tedy druhům které vytvářejí jednobuněčné hyalinní kulovité nebo skoro kulovité konidie. Jednobuněčné konidie podobné tvořeným těmito druhy vytváří také druh *F. tricinctum*, který je také do této skupiny řazen (Torp 2004, Torp *et* Nirenberg 2004).

Přesná detekce jednotlivých původců fuzarióz klasu a zejména stanovení toxinogenních kmenů je nutná jak pro pochopení faktorů podílejících se na rozvoji onemocnění a akumulaci toxinů, tak z hlediska ochrany rostlin a zdraví konzumentů. Mykologické určení jednotlivých druhů je dosti obtížné a relativně časově náročné, proto došlo v poslední době k rozvoji metod

založených na polymerázové řetězové reakci (PCR). V současné době jsou známy druhově specifické primery pro mnoho druhů rodu *Fusarium*.

#### **MORFOLOGIE A FYZIOLOGIE *FUSARIUM LANGSETHIAE* A BLÍZKÝCH DRUHŮ**

Pro druhové rozlišení druhů z rodu *Fusarium* jsou nejvíce používány znaky zjištěné na bramborovo–dextrósovém agaru (PDA, angl. potato dextrose agar), bramborovo-sacharózovém agaru (PSA, angl. potato sacharose agar), syntetickém nízko-živinovém agaru (SNA, angl. synthetic low-nutrient agar) a vodním agaru s filtračním papírem (angl. water agar with filter paper). Kultivace probíhá při 25°C. Po čtyřech dnech růstu ve tmě je hodnocena velikost vyrostlých kolonií a po 7 nebo 10 dnech jsou hodnoceny makromorfologické znaky kolonií. Mikromorfologické znaky jsou hodnoceny u kolonií na SNA mediu nebo vodním agaru s filtračním papírem inkubovaných při střídání bílého a black light světla (12 h/12 h) po 7 nebo 10 (příp. 14) dnech (Leslie *et* Summerell 2006).

#### ***Fusarium langsethiae* Torp and Nirenberg**

Kolonie na PDA práškovitého vzhledu (dříve označováno jako práškovité *F. poae*), 15-26 mm velké (po 4 dnech), žlutavě bílé, bílé, růžově bílé, světle červené až sytě červené. Revers žlutavě bílý, bezbarvý, růžově bílý, světle červený až sytě červený. Konidiogenní buňky převážně monofialidické, výjimečně polyfialické nebo polyblastické, hyalinní, cylindrické nebo lahvicovité, někdy zahnuté, 9-15  $\mu\text{m}$   $\times$  3-5  $\mu\text{m}$  velké. Konidie hyalinní, jednobuněčné, výjimečně dvoubuněčné, kulovité nebo skoro kulovité zužující se k jedné straně, 6-10  $\times$  5-8,4  $\mu\text{m}$ . Chlamydospory se netvoří (Torp *et* Nirenberg 2004).

Tento druh i druhy *F. poae*, *F. sporotrichioides* a *F. kyushuense* mají optimum růstu při teplotách 25-28°C. Při těchto teplotách i při teplotě 20°C roste druh *F. langsethiae* zhruba 2-krát pomaleji než jiné druhy. Zhruba stejně rychle rostou všechny čtyři druhy při 10°C. I při teplotě 15 °C je rozdíl v růstové rychlosti mezi *F. langsethiae* a dalšími třemi zmíněnými druhy okolo 20% (Torp *et* Nirenberg 2004).

*F. langsethiae* produkuje trichotheceny diacetoxyscirpenol, T-2 toxin, HT-2 toxin, neosolaniol, příbuzné deriváty T-2TR, T-2TE, culmoriny, enniatin B. Méně častěji produkuje scirpentriol, 15-monoacetoxyscirpenol, enninatin B<sub>1</sub> a A<sub>1</sub> a vzácně beauvericin. Neprodukuje nivalenol, fusarenon-X a fusarin C a jeho deriváty (Thrane *et al.* 2004).

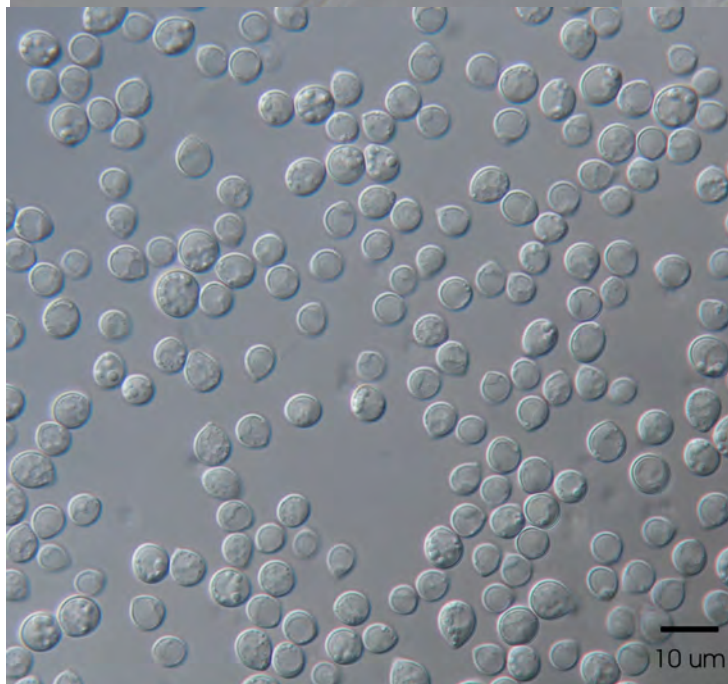
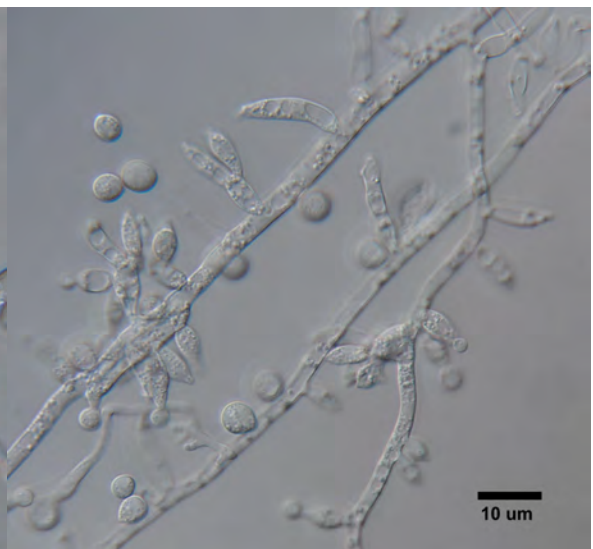
Druh *F. langsethiae* byl dosud zjištěn v Norsku, Dánsku, Rakousku, Holandsku, Anglii, Slovensku i České republice. Co se týče hostitelských rostlin, byl dosud zaznamenán na pšenici, ječmeni a ovsu (Torp *et* Nirenberg 2004).

Evidentně se jedná o druh přehlížený avšak tento druh se vyskytuje s daleko větší četností než je dosud známo. Příčinou přehlížení tohoto druhu je jednak to, že byl popsán až v roce 2004 a také, že vytváří pomalu rostoucí kolonie, které mohou být snadno přerostlé jinými, rychleji rostoucími druhy a to nejen z rodu *Fusarium*. Pro zjištění jeho přítomnosti je vhodné inkubovat vzorky zrn obilí při teplotě 10 °C, kdy je výrazně snížena i rychlost růstu jiných druhů hub. Protože patří k významným producentů mykotoxinů, je třeba detekovat tento druh pomocí jiných než mykologicko-mikrobiologických kultivačních metod nebo inkubací na agarových živných médiích provádět při teplotě 10-15°C. Detekce pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) se specifickými primery je jedním z nejvhodnějších způsobů zjištění přítomnosti tohoto druhu v obilovinách, protože je to metoda rychlá v porovnání s klasickými kultivačními mykologicko-mikrobiologickými metodami, a technicky a finančně méně náročná v porovnání s použitím některých jiných novějších molekulárních metod.

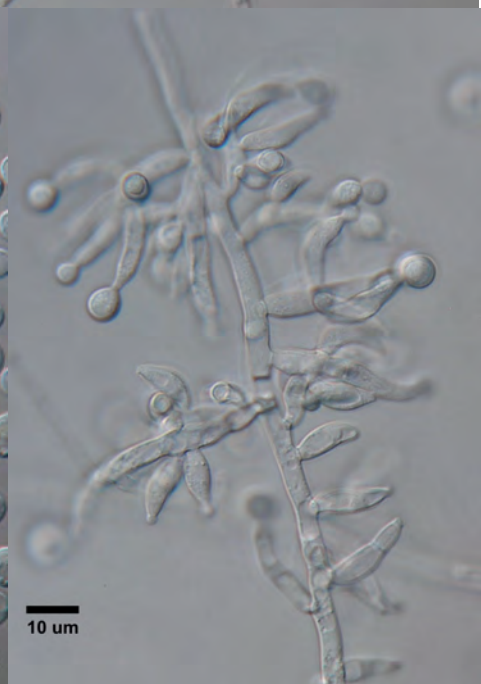
Obrázek č. 1: *Fusarium langsethiae* - fialidy a konidie



Obrázek č. 2: *Fusarium langsethiae* - fialidy a konidie

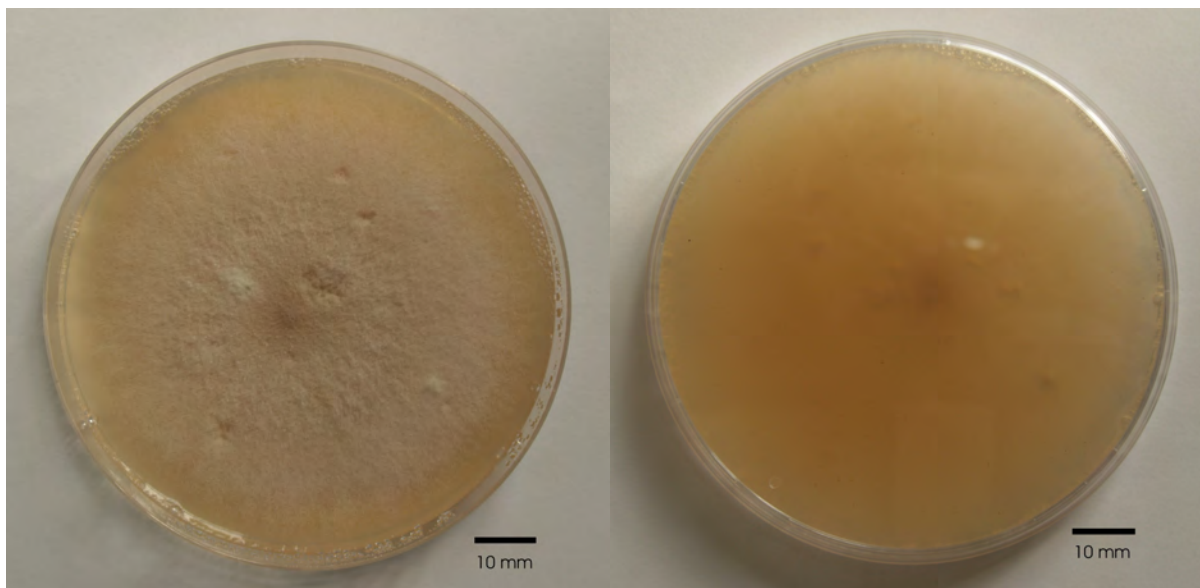


Obrázek č. 3: *Fusarium langsethiae* - konidie



Obrázek č. 4: *Fusarium langsethiae* - fialidy a konidie





Obrázek č. 5: *Fusarium langsethiae* - líc kolonie na bramborovo-dextrósovém agaru

Obrázek č. 6: *Fusarium langsethiae* - rub kolonie na bramborovo-dextrósovém agaru

### ***Fusarium poae* (Peck) Wollenw.**

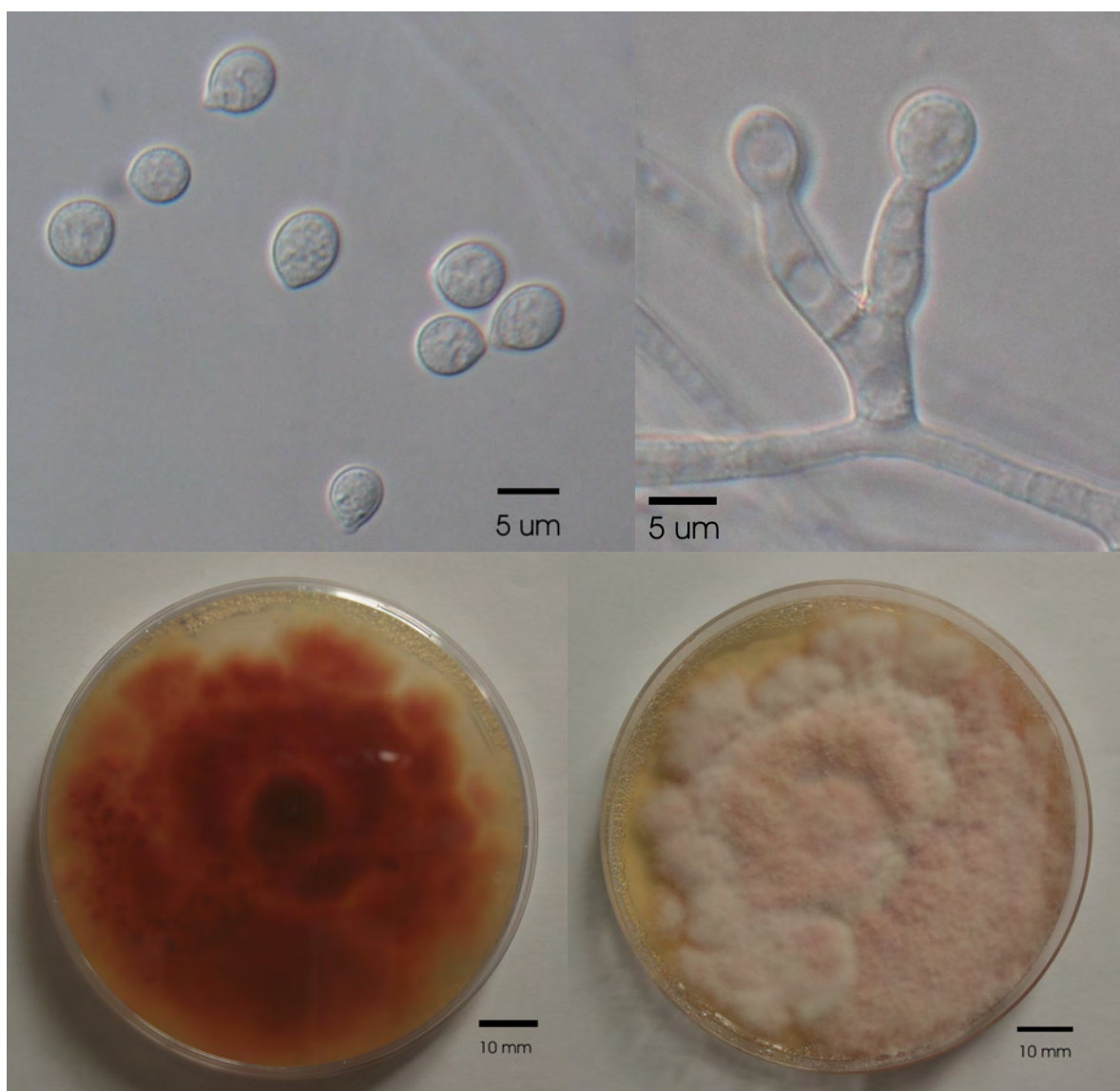
Kolonie na PDA flokózní až ochmýřené, 36-48 mm velké (po 4 dnech), bílé, růžovobílé až růžové. Revers žlutavý nebo načervenalý. Konidiogenní buňky převážně monofialidické, hyalinní, cylindrické, někdy zahnuté, 6-18  $\mu\text{m}$   $\times$  3  $\mu\text{m}$  velké, tvoří se jednotlivě nebo nahloučeně na konidioforech. Konidie hyalinní, jednobuněčné (vzácně dvoubuněčné), kulovité, skoro kulovité, hruškovité, 6-10  $\times$  5,5-7,5  $\mu\text{m}$  velké. Makrokonidie řídce, 3-4-buněčné, hyalinní, slabě zakřivené, 18-38  $\times$  3,8-7,0  $\mu\text{m}$  vznikají na vzdušném myceliu. Chlamyospory se netvoří (Leslie *et* Summerell 2006, Domsch *et al.* 2007, Samson *et al.* 2004, Torp *et* Nirenberg 2004).

Tento druh se vyskytuje často na bylinách a travinách včetně obilovin zejména v mírném pásmu. Je znám i z půdy. Byl izolován nejen v Evropě ale i Severní Americe. Je znám jako druh, vyskytující se v souvislosti chorobou *Fusarium* head blight. V České republice velmi hojně zaznamenáván na různých obilovinách (Leslie *et* Summerell 2006, Domsch *et al.* 2007, Samson *et al.* 2004).

*F. poae* produkuje tyto mykotoxiny: nivalenol, fusarenon-X, diacetoxyscirpenol, 15-monoacetoxyscirpenol, scirpentriol, aurofusarin a fusarin C. V některých případech produkuje culmoriny, beauvericin, enniatiny B, B<sub>1</sub> a A<sub>1</sub> a vzácně byla zjištěna produkce T-2 toxinu, HT-2 toxinu a T-2TE toxinu. Neprodukuje T-2TR toxin (Thrane *et al.* 2004).

Obrázek č. 7: *Fusarium poae* - konidie

Obrázek č. 8: *Fusarium poae* - fialidy se vznikajícími konidiemi



Obrázek č. 9: *Fusarium poae* – rub kolonie na bramborovo-dextrósovém agaru

Obrázek č. 10: *Fusarium poae* - líc kolonie na bramborovo-dextrósovém agaru

### ***Fusarium sporotrichioides* Sherb.**

Kolonie na PDA flokózní až ochmýřené, 41-48 mm velké (po 4 dnech), zpočátku bílé nebo světle červené, později tmavě červené, nachové nebo hnědavé. Revers červený nebo žlutý až hnědavý. Konidiofory větvené, Konidiogenní buňky polyfialické, hyalinní,  $5-18 \times 3,5-5 \mu\text{m}$  velké. Konidie hyalinní, dvou typů. Mikrokonidie jednobuněčné, skoro kulovité ( $5-6 \times 7 \mu\text{m}$ ), hruškovité nebo vřetenovité,  $6-11 \times 3-4 \mu\text{m}$  velké. Makrokonidie 4-6 -buněčné, hyalinní,  $21-47 \times 3,6-5,3 \mu\text{m}$  vznikají na vzdušném myceliu nebo ve sporochiích. Chlamydostry četné, interkalární, kulovité, hnědavé, hladkostěnné,  $7-15 \mu\text{m}$  (Leslie *et* Summerell 2006, Domsch *et al.* 2007, Samson *et al.* 2004, Torp *et* Nirenberg 2004).

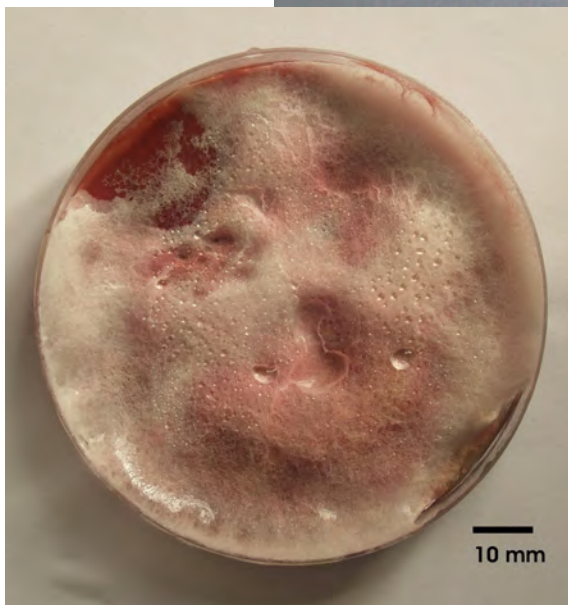
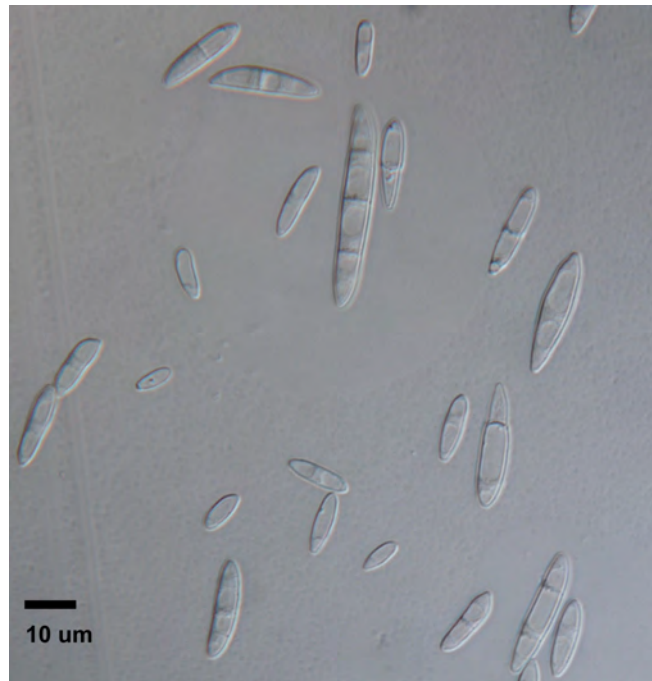
Tento druh je rozšířen v mírném pásmu a tropickém pásmu. Dosud byl izolován nejen v Evropě (včetně České republiky), ale i Severní Americe, Indii, Blízkém Východu, Austrálii a západní Africe. Nejčastěji je zaznamenáván v semenech obilovin. Je znám jako druh vyskytující se



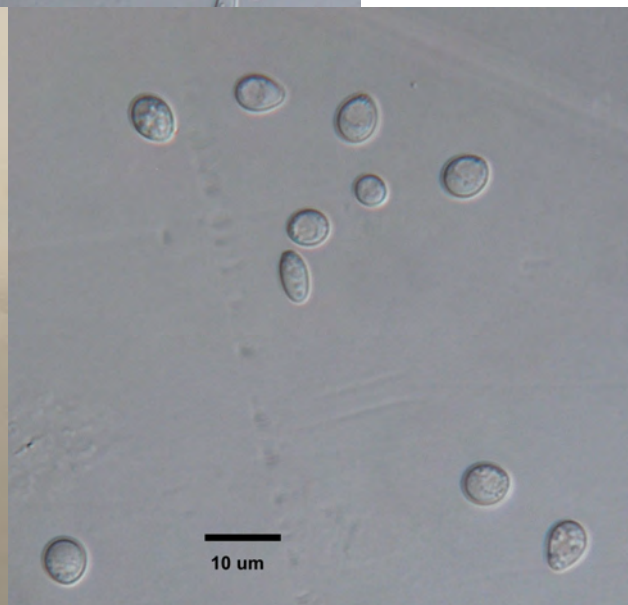
v souvislosti chorobou *Fusarium head blight* (Leslie et Summerell 2006, Domsch *et al.* 2007, Samson *et al.* 2004).

U *F. sporotrichioides* byla zjištěna produkce mykotoxinů T-2 toxin, HT-2 toxin, T-2TR toxin, T-2TE toxin, neosolaniol, 15-MAS, enniatin B, beauvericin. Méně častěji produkuje scirpentriol, enniatin B<sub>1</sub> a A<sub>1</sub> a vzácně aurofusarin, culmoriny, fusarin C a chrysogin. Nebyla zjištěna produkce nivalenolu a fusarenonu-X (Thrane *et al.* 2004).

Obrázek č. 11: *Fusarium sporotrichioides* - téměř vřetenovité mikrokonidie a makrokonidie



Obrázek č. 12: *Fusarium sporotrichioides*: - líc kolonie na bramborovo-dextrósovém agaru



Obrázek č. 13: *Fusarium sporotrichioides* - téměř kulovité až hruškovité mikrokonidie.

### ***Fusarium kyushuense* O'Donnell & T. Aoki**

Kolonie na PDA flokózní, okolo 36 mm velké (po 4 dnech), žlutavě bílé, bílé, růžově bílé, světle červené až červené. Revers bílý, růžově bílý, světle červený až sytě červený. Konidiogenní buňky hyalinní, na vzdušném myceliu převážně holoblastické, některé fialidické, některé sympodiálně proliferující, do 50  $\mu\text{m} \times 2,5\text{-}4,5 \mu\text{m}$ . Sporodochiální konidiogenní buňky monofialidické, některé sympodiálně proliferující. Konidie ze vzdušného mycelia hyalinní, 1-4 (-6) - buněčné, téměř kulovité, elipsoidní až kyjovité, některé obvejčité, případně vřetenovité až srpovité, 4-38  $\times 2,2\text{-}4,7 \mu\text{m}$ . Chlamydospory se netvoří. Makrokonidie (konidie ze sporodochií) (2-) 4-6 (-8) buněčné, srpovité až vřetenovité 28-61  $\times 2,7\text{-}4,8 \mu\text{m}$  (Aoki *et* O'Donnell K 1998). Tento druh je znám pouze z Japonska (Torp *et* Nirenberg 2004), v České republice nebyl dosud zaznamenán.

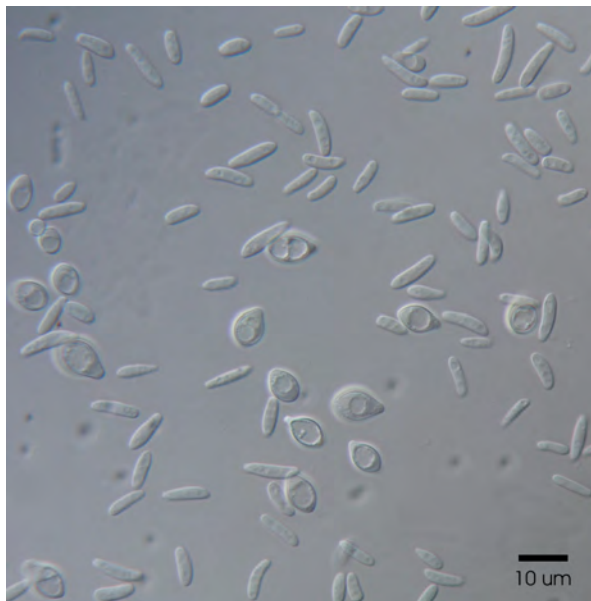
Dosud byla u kmenů *F. kyushuense* zjištěna produkce následujících mykotoxinů: T-2 toxin, nivalenol, 4-acetylnivalenol a další trichotheceny obsahující 8-keto skupinu (Desjardins 2006).

### ***Fusarium tricinctum* (Corda) Sacc.**

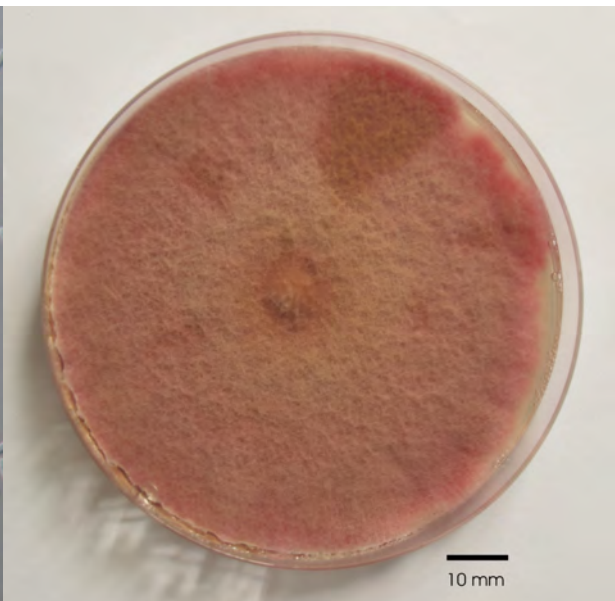
Kolonie na PDA flokózní, 32-55 mm velké (po 4 dnech), červené, vínové až nachové. Revers červený až vínový. Konidiogenní buňky monofialidické, hyalinní, cylindrické, 10-30  $\mu\text{m} \times 2\text{-}3 \mu\text{m}$  velké vznikají samostatně nebo ve shluku na konidioforu. Konidie hyalinní, dvou typů. Mikrokonidie jednobuněčné, výjimečně dvoubuněčné, vřetenovité, elipsoidní citronkovité nebo hruškovité, 8-11  $\times (2,0\text{-}) 4,5\text{-}8,0 \mu\text{m}$  velké. Makrokonidie 4-6 -buněčné, 24-50  $\times 3,2\text{-}4,5 \mu\text{m}$  vznikají ve sporodochiích. Chlamydospory se tvoří vzácně (Leslie *et* Summerell 2006, Domsch *et al.* 2007, Samson *et al.* 2004).

Tento druh je rozšířen v mírném a tropickém pásmu. Dosud byl izolován nejen v Evropě (včetně České republiky), ale i Severní Americe, Indii, Austrálii a východní Africe. Je znám jako druh minoritně se vyskytující v souvislosti chorobou *Fusarium* head blight (Leslie *et* Summerell 2006, Domsch *et al.* 2007, Samson *et al.* 2004).

Dosud byla u kmenů *F. tricinctum* zjištěna produkce těchto mykotoxinů: acuminatum, butenolide, chlamydosporol, různé enniatiny, fusarin C a moniliformin. Nebyla zaznamenána produkce beauvericinu nebo trichothecenů (Desjardins 2006).



Obrázek č. 14: *Fusarium tricinctum* - vřetenovité a citronkovité mikrokonidie



Obrázek č. 15: *Fusarium tricinctum* - líc kolonie na bramborovo-dextrósovém agaru

### **Morfologické a fyziologické odlišení *Fusarium langsethiae* od jiných druhů**

*F. langsethiae* je nejvíce podobné druhům *F. poae* a *F. sporotrichioides*. Druh *F. tricinctum* se vyznačuje výrazně citrónkovitými až hruškovitými mikrokonidii (obr. č. 14). *F. langsethiae* má mikrokonidie kulovité až skoro kulovité (obr. č. 1). V tomto znaku je podobný druhům *F. poae* a *F. sporotrichioides*. U druhu *F. sporotrichioides* se mikrokonidie tvoří na polyfialidách nebo polyblastických buňkách, výjimečně na monofialidách. U druhu *F. langsethiae* se mikrokonidie tvoří na monofialidách a zcela výjimečně polyfialidách. Mikrokonidie druhu *F. poae* se tvoří na monofialidách (obr. č. 8), tak jak tomu je u *F. langsethiae*. Druhy *F. langsethiae* a *F. poae* se odlišují v charakteru a rychlosti růstu kolonií. *F. langsethiae* má výrazně práškovité kolonie a druh *F. poae* má kolonie flokózní až ochmýřené. Kolonie *F. langsethiae* při teplotě 25°C rostou rychlostí 3,7-6,5 mm za den, zatímco kolonie *F. poae* při té samé teplotě rostou rychlostí 9,0-12,0 mm za den. Velmi podobnou rychlost růstu kolonií vykazují i kmeny *F. sporotrichioides*, které rostou rychlostí 10,3-12,0 mm za den a *F. kyushuense*, které je dosud známo pouze z Japonska a které roste rychlostí okolo 10 mm za den. *F. kyushuense* na rozdíl od *F. sporotrichioides* nevytváří chlamydozpy.

### **DETEKCE *FUSARIUM LANGSETHIAE* MOLEKULÁRNÍMI METODAMI**

#### **PRINCIP DIAGNOSTIKY**

*Fusarium langsethiae* je detekováno v zrnech obilnin. Ze zrn obilnin je izolována celková DNA obsahující DNA *F. langsethiae*. Fragmenty DNA specifické pro *F. langsethiae* jsou namnoženy pomocí PCR. Produkty PCR jsou detekovány agarózovou elektroforézou a barvením ethidium bromidem.

#### **METODIKA VYCHÁZÍ Z LITERATURY**

DNeasy Plant Handbook, 07/2006 ([www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)); Don *et al.*, 1991, Nucleic Acid Research, 19 (14): 4008; Parry a Nicholson, 1996, Plant Pathology, 45: 383-391; Wilson *et al.*, 2004, FEMS Microbiology Letters, 233: 69-76

#### **VYBAVENÍ LABORATOŘE A CHEMIKÁLIE**

#### **Přístroje**

Centrifuga na zkumavky Eppendorf (1,5/2,0 ml, 20 000 g)

Mikrocentrifuga (PCR zkumavky)

Výrobník ledové tříště

pH metr

Váhy (0,0001 g)

Nádoba na tekutý dusík

Vodní lázeň nebo teplotní blok

Cykler pro PCR

UV transiluminátor

Chladnička (+ 4°C)

Mraznička (- 20°C) (případně hlubokomrazicí box - 80°C)

Automatické mikropipety 0,5 - 10 µl, 2 - 20 µl, 20 - 200 µl a 200 - 1000 µl

**Dvě samostatné sady mikropipet: jedna pro izolaci DNA a pro pipetování produktů PCR, druhá pro pipetování reakčních směsí a pro pipetování vzorků DNA**

Horizontální elektroforéza + zdroj elektrického proudu

Elektromagnetická vyhřívaná míchačka

Mikrovlnná trouba  
Vortex (mikrotřepačka)  
Fotodokumentační zařízení  
Autokláv

## **Materiál**

Třecí misky a tloučky (průměr misek cca 7 cm)  
Tekutý dusík  
1,5 ml a 2,0 ml mikrozkušavky Eppendorf  
PCR zkumavky (podle typu cykleru pro PCR)  
Váženky  
Magnetická míchadla  
Špičky k mikropipetám + krabičky (sterilní, prosté RNáz)  
Špičky s filtrem k mikropipetám (sterilní, prosté RNáz)  
Laboratorní sklo (kádinky, odměrné válce, Erlenmayerovy baňky, autoklávovatelné reagenční láhve s uzávěrem)  
Jednorázové laboratorní rukavice  
Permanentní popisovač na plast

## **Chemikálie a roztoky**

dH<sub>2</sub>O (destilovaná voda)  
sdH<sub>2</sub>O (sterilní destilovaná voda, např. voda pro molekulární biologii, kat. č. W4502, Sigma-Aldrich, Inc., St. Luis, MO, USA)  
DNeasy Plant Mini Kit (kat. č. 69104, QIAGEN, Hilden, SRN)  
Absolutní ethanol (např. kat. č. UN1170, Analytika, s.r.o., Praha, Česká republika) (Nepoužívat denaturovaný ethanol.)  
Teplotně stabilní DNA polymeráza včetně pufru a MgCl<sub>2</sub> (např. kat. č. M1241, Promega, Madison, WI, USA)  
Směs dNTP (např. kat. č. U1420, Promega, Madison, WI, USA)  
Primery (syntetizované oligonukleotidy) (např. od Sigma-Genosys Ltd., Pampisford, Cambridgeshire, UK):

<b>Cílový druh</b>	<b>Název primeru</b>	<b>Sekvence primeru (5' - 3')</b>	<b>Délka amplikonu</b>
<i>Fusarium</i>	Flang F3	CAAAGTTCAGGGCGAAAAC	310 bp
<i>langsethiae</i>	Lanspo R1	TACAAGAAGACGTGGCGATAT	

Agaróza pro elektroforézu DNA (např. kat. č. 50000, Cambrex, Charles City, IA, USA)  
TRIS (např. kat. č. 37190, Serva, Heidelberg, SRN)  
EDTA (např. kat. č. E5134, Sigma-Aldrich, Inc., St. Luis, MO, USA)  
Ledová kyselina octová (např. p.a., PENTA, Chrudim, Česká republika)  
Hydroxid sodný (např. kat. č. 0583, Amresco, Solon, Ohio, USA)  
Ethidium bromid (např. kat. č. E1510, Sigma-Aldrich, Inc., St. Luis, MO, USA)  
Ficoll 400 (např. kat. č. 17-0400-02, Pharmacia, Uppsala, Švédsko)  
Orange G (např. kat. č. O-3756, Sigma-Aldrich, Inc., St. Luis, MO, USA)  
Xylene cyanol (např. kat. č. 95600, Fluka, Buchs, Švýcarsko)  
EtBr destaining bags (např. kat. č. 5459.25, Genesee Scientific Corporation, CA, USA)  
Savo (Bochemie, a.s., Bohumín, Česká republika)

70%-ní ethanol (denaturovaný)

EDTA (0,5 M, 200 ml)

EDTA                    37,22 g  
sdH<sub>2</sub>O                 doplnit do 200 ml  
Upravit pH na 8,0 pomocí NaOH (cca 4 g).

TAE pufr (50x, 150 ml)

TRIS                         36,3 g  
Ledová kyselina octová     8,6 ml  
EDTA (0,5 M)               15 ml  
Doplnit sdH<sub>2</sub>O do 150 ml.

Ethidium bromid

Zásobní roztok:       10 mg/ml dH<sub>2</sub>O  
Pracovní roztok:       0,5 µg/ml dH<sub>2</sub>O

Ethidium bromid je látka, která se váže na šroubovici nukleových kyselin, kde pak pod UV-lampou (312 nm) intenzívně růžově fluoreskuje.

**Ethidium bromid je silný mutagen, proto se veškeré manipulace s ním provádějí v jednorázových rukavicích v digestoři.** Agarózové gely, vyšetřovací rukavice a plasty kontaminované ethidium bromidem se skladují odděleně v silných PE pytlích a likvidaci provádějí speciální firmy zabezpečující likvidaci nebezpečného odpadu. Roztoky a pufrы dekontaminujeme přímo v laboratoři pomocí specifických adsorpčních kolon nebo sáčků.

Barva pro nanášení vzorků (produktů PCR) do gelů

0,1% xylencyánová modř a 0,2% oranž G ve 20% Ficollu 400, nebo např. Blue/Orange Loading Dye, 6x (kat. č. G1881, Promega, Madison, WI, USA)

Ficoll Loading Dye (FLD) 10x

Ficoll 400                 2 g  
0,5 M EDTA (pH 8,0)     1,25 ml  
Xylene cyanol FF (0,1%) 10 mg  
Orange G (0,2%)         20 mg  
doplnit sdH<sub>2</sub>O do 10 ml

Standard molekulové hmotnosti pro elektroforézu

např. GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (kat. č. SM0241, Fermentas Life Sciences, Litva),  
Lambda DNA/*Hind*III Marker (kat. č. SM0101, Fermentas Life Sciences, Litva)



### Pracovní roztok:

100 µl	GeneRuler™ 100bp DNA Ladder nebo Lambda DNA/ <i>Hind</i> III Marker
100 µl	6x Loading Dye Solution
400 µl	sdH <sub>2</sub> O

### **IZOLACE CELKOVÉ DNA Z ROSTLINNÝCH PLETIV POMOCÍ DNEASY PLANT MINI KIT**

Důležitá upozornění před začátkem izolace:

- Všechny centrifugace provádíme při pokojové teplotě (15-25°C).
  - Je-li to nezbytné rozpustíme sraženiny v pufrch AP1 a koncentrátu AP3/E.
  - Přidáme ethanol do pufrů AW a AP3/E.
  - Předehřejeme vodní lázeň nebo teplotní blok na 65°C.
1. Na analytických vahách odvážíme 25 mg rostlinného materiálu. V misce v kapalném dusíku důkladně vzorek rozdrtíme tloučkem. Prášek přeneseme špachtlí do sterilní 2 ml zkumavky. Nedovolíme, aby pletiva roztála. Ihned pokračujeme krokem 2.
  2. K homogenátu přidáme 400 µl pufru AP1 a 4 µl RNázy A. Směs důkladně promícháme na vortexu a inkubujeme 1 hodinu při 65°C. V průběhu inkubace směs 3-4 krát promícháme převrácením zkumavek. Lyzát centrifugujeme 5 minut při 14 000 otáčkách. Supernatant přeneseme pipetou do nové 2 ml zkumavky.
  3. K lyzátu přidáme 130 µl pufru AP2, promícháme převrácením zkumavek a inkubujeme 5 minut na ledu. Lyzát centrifugujeme 5 minut při 14 000 otáčkách. Supernatant přeneseme pipetou do nové 2 ml zkumavky.
  4. Lyzát přeneseme pipetou do kolonky QIAshredder (fialová) umístěné ve 2 ml jímací zkumavce. Centrifugujeme 2 minuty při 14 000 otáčkách.
  5. Vodnou fázi prošlou přes kolonku přeneseme do nové zkumavky, tak abychom neporušili usazeninu. Přidáme 675 µl pufru AP3 a směs jemně promícháme pipetou. Fialovou kolonku s usazeninou vyhodíme.
  6. Pipetou přeneseme 650 µl směsi do bílé kolonky DNeasy Mini Spin Column umístěné v 2 ml jímací zkumavce. Centrifugujeme po dobu 1 minuty při 10 000 otáčkách. Vylijeme obsah jímací zkumavky a do bílé kolonky přeneseme zbytek směsi. Centrifugujeme kolonku po dobu 1 minuty při stejných otáčkách.
  7. Kolonku se zachycenou DNA umístíme do nové 2 ml jímací zkumavky a přidáme 500 µl promývacího pufru AW. Centrifugujeme po dobu 1 minuty při 10 000 otáčkách. Vylijeme fázi prošlou kolonkou.
  8. Přidáme dalších 500 µl promývacího pufru AW. Centrifugujeme po dobu 2 minut při 14 000 otáčkách.
  9. Kolonku se zachycenou DNA přeneseme do nových 1,5 ml zkumavek. Přímo na membránu kolonky přidáme pipetou 100 µl předehřátého pufru AE. Pět minut inkubujeme při pokojové teplotě. Centrifugujeme po dobu 1 minuty při 10 000 otáčkách. Vyhodíme bílou kolonku. Fáze prošlá kolonkou obsahuje rozpuštěnou DNA.

Kvalitu a koncentraci izolované DNA ověřujeme elektroforézou v 1% agarózovém gelu. K 10 µl vzorku DNA přidáme 1 µl nanášecího pufru a směs nanese na gel. Celková DNA je vizualizovaná po obarvení ethidium bromidem (viz. Vizualizace produktů PCR po

elektroforetické separaci) na UV transiluminátoru. Koncentrace DNA je odhadnuta srovnáním se standardem Lambda DNA/*Hind*III Marker.

## POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE PRO AMPLIFIKACI SPECIFICKÝCH SEKVENCÍ *FUSARIUM LANGETHIAE*

### Příprava pracovního prostoru

Pracovní plochy otřeme čerstvě připraveným 20% roztokem Sava a 70% ethanolem. Je užitečné vystavit pracovní plochy germicidnímu záření UV lampy po dobu minimálně 15 minut.

### Příprava chemikálií

Všechny roztoky uchovávané v mrazáku musíme předem rozmrazit buď (a) při laboratorní teplotě, v tomto případě musíme ukončit rozmrazování ihned po rozpuštění posledního tuhého kusu, nebo (b) v lednici/na ledu. Obsah zkumavek promícháváme jejím převrácením a krátkým vortexováním. Nakonec všechny chemikálie krátce stočíme na mikrocentrifuze.

Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 1.

Tabulka 1: Složení reakční směsi

Chemikálie	Výsledná koncentrace	μl/1 reakci
sdH <sub>2</sub> O		20,14
10x PCR pufr (10x)	1x	2,50
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5 mM	1,50
Primer Flang F3 (50 μM)	0,1 μM	0,05
Primer Lanspo R1 (50 μM)	0,1 μM	0,05
Směs dNTP (25 mM)	0,1 mM	0,10
DNA polymeráza (5U/ μl)	0,8 U/reakce	0,16
Celkový objem reakce		24,50

### Pracovní postup

1. Chemikálie potřebné pro PCR necháme roztát, jemně je promícháme a krátce centrifugujeme. Chemikálie uchovááme na ledu při teplotě 1-4°C.
2. Pro každý vzorek si připravíme a popíšeme jednu sterilní 0,5 ml PCR zkumavku. Jedna zkumavka je určená pro kontrolu reakční směsi (premixu) - místo templátové DNA přidáme odpovídající množství sdH<sub>2</sub>O a jedna zkumavka je určená pro pozitivní kontrolu (DNA z čisté kultury *F. langsethiae*).
3. Do 1,5 ml zkumavky Eppendorf přidáme v daném pořadí jednotlivé složky reakční směsi (Tabulka 1). Celkový objem reakční směsi vypočítáme podle vzorce  $V = V_i \times (n + 1)$ , kde  $V_i$  je objem premixu pro 1 reakci,  $n$  je počet všech vzorků včetně obou kontrol a jednoho vzorku navíc kvůli chybě pipetování.
4. Premix důkladně promícháme po dobu minimálně 10 vteřin (obracení zkumavky, vortexování).
5. Premix rozdělíme po 24,5 μl do připravených 0,5 ml PCR zkumavek. Nejprve přidáme do kontroly premixu 0,5 μl sdH<sub>2</sub>O, do každé další zkumavky pak přidáme 0,5 μl templátové DNA jednotlivých vzorků. Pozitivní kontrola (DNA *F. langsethiae*) se do premixu přidává jako poslední.

6. Zkumavky krátce stočíme v mikrocentrifuze. Vzorky vložíme do cykleru pro PCR a zahájíme amplifikaci za podmínek uvedených v tabulce 2.

Tabulka 2: Podmínky amplifikace DNA *F. langsethiae* pomocí PCR

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
Denaturace	95	30	5
Nasedání primerů	66	20	
Prodlužování primerů	72	45	
Denaturace	95	30	5
Nasedání primerů	64	20	
Prodlužování primerů	72	45	
Denaturace	95	30	25
Nasedání primerů	62	20	
Prodlužování primerů	72	45	
Závěrečné prodlužování primerů	72	300	1

### ANALÝZA PRODUKTŮ PCR

Kontrolu produktů PCR provádíme pomocí jejich elektroforetického rozdělení v agarózovém gelu, obarvení ethidium bromidem a vizualizace na UV transiluminátoru. Fragmenty DNA se elektroforeticky dělí na základě svých nábojů a molekulární hmotnosti. Délka elektroforetické separace je závislá na požadované délce migrace, protékajícím proudem, použitým elektroforetickým pufrům a na koncentraci agarózy v gelu. Ethidium bromid se naváže do DNA a při excitaci UV zářením vyzařuje oranžové fluorescenční světlo. Pro kontrolu velikosti dělených produktů PCR používáme délkový standard DNA.

### Příprava agarózového gelu

Zásobní roztok 50x TAE pufru naředíme sdH<sub>2</sub>O v poměru 1:50. Takto naředěný pufr uchováváme maximálně 14 dnů. Podle počtu vzorků navážíme agarózu. Objemy pufru a navážky agarózy jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3: Složení agarózového gelu podle množství vzorků

TAE pufr (1x) [ml]	Koncentrace gelu	Agaróza [g]	Počet vzorků
30	2%	0,6	1-20
70	2%	1,4	více než 20

### Pracovní postup

1. Ve váženec navážíme na analytických vahách potřebné množství agarózy. Naváženou agarózu přesypeme do Erlenmayerovy baňky a přilijeme potřebný objem 1x TAE pufru.

2. Baňku s pufrem a agarózou umístíme do mikrovlnné trouby, nastavíme stupeň ohřevu (střední pro 70 ml gelu, nejnižší pro 30 ml gelu) a čas (2-3 minuty). V průběhu zahřívání agarózu několikrát krouživým pohybem promícháme. Dbáme na to, aby var nebyl skrytý a agaróza nevykypěla a nevytekla mimo baňku.
3. Ohřev ukončíme po 1 minutě varu. Baňku vyjmeme z mikrovlnné trouby a opatrně její obsah ještě jednou promícháme krouživým pohybem.
4. Baňku postavíme na elektromagnetickou míchačku v digestoři a vložíme do ní magnetické míchadlo.
5. Během míchání agarózového gelu si připravíme formu na gel s hřebínkem pro vytvoření nanášecích jamek v gelu.
6. Když teplota agarózy v baňce klesne přibližně na 60°C (baňku lze udržet v ruce), vyjmeme pomocí magnetické hůlky magnetické míchadlo z baňky a ještě horkou tekutou agarózu nalijeme do formy na gel a necháme vychladnout. Přibližně za 30 až 45 minut dojde ke ztuhnutí gelu. Dbáme na to, aby po nalití do formy nezůstaly v agaróze bublinky vzduchu.
7. Po ztuhnutí a vychladnutí gelu z něj opatrně vyjmeme hřebínek. V gelu zůstanou jamky pro nanášení vzorků.

## **Elektroforetická separace fragmentů DNA**

### Pracovní postup

1. Do každé mikrozkušavky přidáme po proběhlé PCR 2,8  $\mu$ l nanášecího puftru, nejprve do kontroly premixu, poté do vzorků a nakonec do pozitivní kontroly.
2. Připravený elektroforetický gel vložíme do elektroforetické vany a převrstvíme ho 1 x TAE pufrem (přibližně 2-3 mm).
3. Do první dráhy nanese 1,5  $\mu$ l délkového standardu GeneRuler™ 100bp DNA Ladder. Do dalších drah nanášíme vždy 10  $\mu$ l každého vzorku v pořadí od kontroly premixu po pozitivní kontrolu. Před nanesením do jamky každý vzorek promícháme 5x natažením do špičky pipety.
4. Po ukončení nanášení vzorků uzavřeme elektroforetickou vanu víkem a nastavíme hodnotu elektrického napětí (pro 2% gel 60 V).
5. Elektroforéza probíhá 60 až 90 minut.
6. Po rozdělení vzorků vypneme zdroj a odpojíme elektroforézu od elektrického proudu. Gel vyjmeme i s formou z vany a opatrně ponoříme do roztoku ethidium bromidu (0,5  $\mu$ g/ml). Gel necháme barvit 5 minut.
7. Obarvený gel si prohlédneme na UV transiluminátoru a dáme ho na 30 minut odbarvovat do destilované vody. Potom gel vyfotíme fotodokumentačním zařízením.

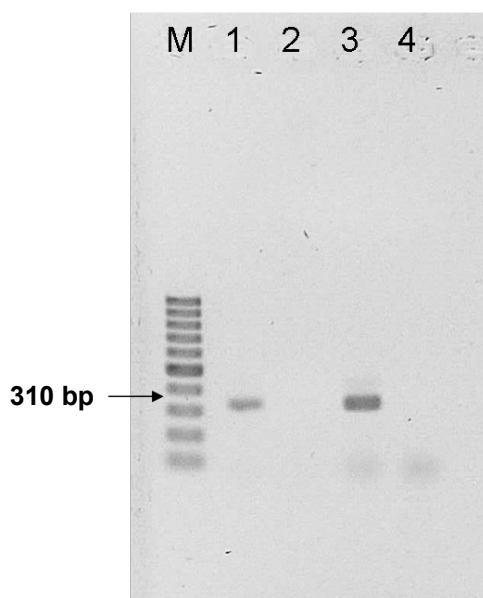
### **Vizualizace produktů PCR po elektroforetické separaci**

Detekce produktů PCR po elektroforetické separaci probíhá pomocí jejich obarvení ethidium bromidem a vizualizace UV zářením. Hledaný produkt vidíme v UV světle v podobě svítícího proužku. Délku proužku určíme srovnáním jeho pozice s pozicí fragmentů DNA délkového standardu. Délka PCR ampliconu *F. langsethiae* je 310 bp.

## VÝSLEDEK

Pozitivním výsledkem je fluoreskující proužek (“band“) odpovídající velikosti 310 bp. Proužky porovnáme s velikostním standardem a pozitivní kontrolou. Negativní kontrola (voda) nesmí obsahovat žádný proužek. Pozitivní kontrola musí obsahovat proužek 310 bp (obr. č. 16). Jestliže tomu tak není, **test opakujeme**.

Obrázek č. 16: Ukázka výsledků detekce *Fusarium langsethiae* pomocí PCR s primery Flang 3F a Lanspo 1R. Dráhy: 1-pozitivní vzorek, 2-negativní vzorek, 3-pozitivní kontrola, 4-negativní kontrola a M-velikostní standard GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Fermentas Life Sciences, Litva).



## Závěr

Metoda detekce a identifikace *Fusarium langsethiae* založená na polymerázové řetězové reakci s druhově specifickými primery v zrnech obilovin se ukázala jako spolehlivou a vhodnou metodou pro zjištění přítomnosti uvedeného mykotoxinnogenního druhu. Nevýhodou této metody je její větší finanční a přístrojová náročnost.

## III) SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“ OPROTI PŮVODNÍ METODICE, PŘÍPADNĚ JEJICH ZDŮVODNĚNÍ, POKUD SE BUDE JEDNAT O NOVOU NEZNÁMOU METODIKU (§ 2, ODS. 1, PÍSM. A, BOD 2 ZÁKONA Č. 130/2002 SB.)

V metodice je nově zavedena kombinace detekce a identifikace *Fusarium langsethiae* pomocí PCR s druhově specifickými primery s rychlou izolací celkové DNA ze zrn ovsa pomocí kitu DNeasy Plant Mini Kit od firmy Qiagen. Metoda izolace DNA byla modifikována s cílem zlepšit opakovatelnost a spolehlivost detekce *F. langsethiae*. Modifikace spočívá v prodloužení inkubace vzorků v extrakčním pufru a zařazení dalších centrifugací.



#### **IV) POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY, PRO KOHO JE URČENA, JAKÝM ZPŮSOBEM BUDE UPLATNĚNA.**

Metodika slouží pro:

- stanovení přítomnosti/nepřítomnosti druhu *Fusarium langsethiae* v zrnech a dalších částech rostlin obilovin při nákupu a prodeji obilovin v rámci České republiky
- stanovení přítomnosti/nepřítomnosti druhu *Fusarium langsethiae* v zrnech a dalších částech rostlin obilovin při jejich dovozu a vývozu z České republiky

Metodiku mohou využívat všechny laboratoře, které mají vybavení pro práci s PCR markery. Jsou to jak nestátní laboratoře tak orgány státní správy (např. SRS, ÚKZÚZ, SZPI).

#### **V) EKONOMICKÉ ASPEKTY**

Předpokládané ekonomické přínosy zavedení Metodiky spočívají jednak v úsporách při náhradě pracné a ne zcela spolehlivé klasické metody identifikace tohoto patogena na základě morfologie (cca 50 tis.Kč) při analýze 100 vzorků), další přínosy, plynoucí z redukce výskytu toxických produktů tohoto druhu *Fusarium*, jsou v nižším zatížení zdraví lidí a hospodářských zvířat mykotoxiny v potravním řetězci.

*F. langsethiae* je považováno za jednu z hlavních příčin kontaminace ovsů trichothecenovými mykotoxiny typu A, T-2 a HT-2 toxiny. Tyto toxiny, pro které zatím není stanoven limit, jsou mnohem toxičtější, než např. v současnosti legislativně limitovaný deoxynivalenol (DON).

V nařízení Komise (ES) č. 1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách se uvádí, že přítomnost T-2 a HT-2 toxinů může představovat ohrožení pro veřejné zdraví a že prvořadým úkolem je shromáždit větší množství údajů o výskytu a provést další šetření/výzkum zaměřený na faktory podílející se na přítomnosti T-2 a HT-2 toxinu v obilovinách a výrobcích z obilovin, zejména v ovsu a výrobcích z ovsu.

Uplatnění spolehlivého diagnostického nástroje, jakým metodika pro molekulární detekci *F. langsethiae* je, umožní mj. kvalifikovaně hodnotit riziko kontaminace ovsu pěstovaného v podmínkách ČR T-2 a HT-2 toxiny. O zavedení limitů pro tyto toxiny není dosud rozhodnuto. Implementace limitu pro další nežádoucí látku do legislativy přináší značné náklady, zejména v podobě povinných analýz. Ty jsou, v případě T-2 a HT-2 toxinů, které prakticky lze spolehlivě detekovat pouze metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí, značné. Na druhou stranu, nezavedení limitu v případě, že riziko častého výskytu *F. langsethiae* v ČR a následně vyšší kontaminace ovsu pěstovaného v ČR je reálné, by znamenalo negativní dopad na zdraví lidí i zvířat. Navíc určitá část ovsu by nemohla být využívána pro lidskou výživu, pokud by nesplnila příslušný limit a jejím uplatněním pouze jako krmné produkce by pěstitelé vznikla ztráta.

Přínos metodiky je ve snížení negativních zdravotních účinků na zdraví lidí a hospodářských zvířat, zejména koní, pro které je využíváno jak celé ovesné zrno, tak zejména ovesné slupky a otruby, ve kterých je obsah trichothecenových mykotoxinů ještě vyšší, než v celém zrne. Negativní zdravotní účinky trichothecenů typu A, ke kterým kromě T-2 a HT-2 toxinů patří např. diacetoxyscirpenol, neosolaniol a další příbuzné deriváty jsou mnohem závažnější, než u dosu limitovaného deoxynivalenolu.

*Fusarium langsethiae* je druh, který se velmi obtížně detekuje pomocí klasických morfologicko-kultivačních metod v obilovinách, protože je pomalu rostoucí a slabý v

kompetici s jinými druhy hub. Z toho důvodu je pro zjištění jeho přítomnosti inkubovat velké množství vzorků, což přináší náklady na termostaty a spotřební materiál (Petriho misky, agar). Tento druh je velmi podobný druhům *Fusarium poae*, *F. sporotrichioides*, *F. kyushuense* a *F. tricinctum* a klasická identifikace založená na morfologických znacích vyžaduje velmi erudované mykology, kteří mají velkou zkušenost s rodem *Fusarium*. Takovýchto pracovníků je v České republice jednak nedostatek, jednak náklady na jejich vyškolení jsou vysoké, protože vyžaduje zabývat se touto problematikou mnoha let. Detekce *F. langsethiae* pomocí PCR se specifických primerů, tak jak je navržena v této metodice, je rychlejší a dává spolehlivější výsledky a jsou schopni ji provádět méně kvalifikovaní pracovníci. Na jeden vzorek je potřeba v případě použití PCR se specifickými primery okolo 35 minut práce pracovníka s bakalářským stupněm vzdělání, což převedeno na koruny dělá 87 Kč. V případě identifikace na základě morfologie (a nutné izolace ze vzorku) je potřeba okolo 2,7 hodiny erudovaného vysokoškolského pracovníka (úroveň Mgr. s vědeckou hodností PhD. nebo CSc.) což převedeno na koruny dělá 635 Kč. Přímé materiálové náklady identifikaci 1 vzorku na v případě použití PCR se specifickými primery činí 170 Kč a v případě identifikace na základě morfologie (a nutné izolace ze vzorku) přímé materiálové náklady činí 72 Kč. Na PCR se specifickými primery je potřeba sice více přístrojů za vyšší cenu než při identifikaci na základě morfologie, ale jsou využívány výrazně kratší dobu. Výsledně při porovnání jsou náklady na materiál a mzdy na 1 vzorek jsou u PCR se specifickými primery celkem okolo 257 Kč a identifikace na základě morfologie (a nutné izolace ze vzorku) jsou celkem okolo 707 Kč. Je zřejmé, že náklady na detekci pomocí PCR se specifickými primery jsou více než 2,5 nižší. Ekonomický přínos se projeví zejména při opětovném opakování na různých pracovištích. Při analýze 100 vzorků dojde k úspoře okolo 50 tis. Kč.

## VI) SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Aoki T. et O'Donnell K. (1998): *Fusarium kyushuense* sp. nov. from Japan. Mycoscience, 39: 1-6.
- Desjardins A. E. (2006): *Fusarium* mycotoxins Chemistry, Genetics and Biology. St. Paul, 260 p.
- Domsch K. H. Gams W. et Anderson T. H. (2007): Compendium of soil fungi. Second edition, Eching, 672 p.
- Don R.H., Cox P.T., Wainwright B.J., Baker K., Mattick J.S. (1991): 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. Nucleic Acids Research, 19 (14): 4008.
- DNeasy Plant Handbook, 07/2006 (www.qiagen.com)
- Kirk P. M., Cannon P. F., Minter D. W. et Stalpers J. A. (eds.) (2008): Ainsworth & Bisby'S Dictionary of the fungi. 10th edition, Wallingford, 771 p.
- Leslie J. F. et Summerell B. A. (2006): The *Fusarium* laboratory manual, Ames, 388 p.
- Leonard K. J. et Bushnell W. R (eds.) (2003): *Fusarium* head blight of wheat and barley. St. Paul, 512 p.
- Parry D.W., Jenkinson P., McLeod L. (1995): *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals - a review. Plant Pathology, 44: 207-238.
- Parry D.W. et Nicholson P. (1996): Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. Plant Pathology, 45: 383-391.
- Samson R. A., Hoekstra E. S. et Frisvad J. C. (2004): Introduction to food- and airborne fungi, Utrecht, 389 p.

- Thrane U., Adlerb A., Clasenc P.-E., Galvanod F., Langseth W., Lew H., Logrieco A., Nielsen K. F. et Alberto Ritieni (2004): Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium sporotrichioides*. *International Journal of Food Microbiology*, 95 (3): 257-266.
- Torp M. (2004): The European Sporotrichiella project: a polyphasic approach to the biology of a new *Fusarium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 95 (3): 241-245.
- Torp M. et Nirenberg H.I. (2004): *Fusarium langsethiae* sp. nov. on cereals in Europe. *International Journal of Food Microbiology*, 95 (3): 247-256.
- Wilson A., Simpson D., Chander E., Jennings, P. Nicholson P. (2004): Development of PCR assays for the detection and differentiation of *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 233: 69-76.

#### **VII) SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE**

- Nedělník J., Moravcová H., Hajšlová J., Lancová K., Váňová M., Salava J. (2007): *Fusarium* spp. in wheat grain in the Czech Republic analysed by PCR method. *Plant Protection Science*, 43 (4): 135-137.
- Polišenská I., Hajšlová J., Váňová M., Salava J., Jirsa O., Šliková S., Matušinský P. (2008): *Fusarium* pathogens occurrence and mycotoxin content in wheat. *Cereal Research Communications* 36, suppl. B (Proceedings of the "3rd International Symposium on *Fusarium* Head Blight", 1-5 September 2008, Szeged, Hungary), pp. 521-524.
- Polišenská I., Salava J., Tvarůžek L., Wolf G., Weinert J., Matušinský P., 2008: *Fusarium* pathogens on cereals and occurrence of their toxins in the Czech Republic. *Journal of Plant Pathology*, 90 (2, Supplement): S2.324.
- Polišenská I., Váňová M., Klem K., Hajšlová J., Salava J., Wolf G., Weinert J., Nedomová L., (2008): Risk factors of the occurrence of *Fusarium* mycotoxins in wheat. In: *Book of Proceedings of the "4th International Congress on Flour-Bread 2007"*, October 24-27, 2007, Opatija, Croatia, pp. 277-283.
- Salava J., Hájková M., Sommerová P. (1997): Characterization of *Fusarium* spp. using RAPD markers. *Plant Protection Science*, 33 (2): 143-149.
- Salava J., Navrátil O. (2000): Detection of *Fusarium culmorum* by PCR. In: *Sborník referátů z XV. České a Slovenské konference o ochraně rostlin*, Brno, 12.-14. září 2000, pp. 187-188.

Autoři: Dr. Ing. Jaroslav Salava, RNDr. David Novotný, Ph.D.  
a RNDr. Ivana Polišenská, Ph.D.  
Název: Detekce *Fusarium langsethiae* molekulárními metodami  
Vydal: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, 161 06  
Praha 6 - Ruzyně ve Výzkumném ústavu zemědělské techniky, v.v.i.,  
Drnovská 507, 161 06 Praha 6 - Ruzyně  
Sazba a tisk: Výzkumný ústav zemědělské techniky, v.v.i., Drnovská 507,  
161 06 Praha 6 - Ruzyně  
Náklad: 20 ks  
Metodika je veřejně přístupná na adrese [www.vurv.cz](http://www.vurv.cz).  
Vyšlo v roce 2010.  
Vydáno bez jazykové úpravy.

Kontakt na autora: [salava@vurv.cz](mailto:salava@vurv.cz)

Autoři titulních fotografií: Dr. Ing. Jaroslav Salava  
RNDr. David Novotný Ph.D.

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2010  
ISBN: 978-80-7427-062-8