

Uplatněná certifikovaná metodika

Metodika 28/14

# Metodika detekce *Fusarium oxysporum* pomocí druhově – specifické PCR

*Autoři*

**Mgr. Tereza Sabolová**

**Ing. Bronislava Hortová**

**Mgr. Jana Palicová, Ph. D.**

**Ing. Miroslava Strejčková**

**RNDr. Jan Nedělník, Ph. D.**

Oponenti:

Odborný oponent: doc. RNDr. Jana Řepková, CSc.; Ústav experimentální biologie,  
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita (PřF MU Brno)

Oponent ze státní správy:

**Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu NAZV Q111C016 a byla schválena Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským v Brně, osvědčení č. XXXXXXXX**

**Troubsko**

**2014**

ISBN: 978 – 80 – 88000 – 03 – 07

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

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Praha Ruzyně

## OBSAH

1. Cíl metodiky.....	4
2. Vlastní popis metodiky.....	4
2.1. Úvod.....	4
2.2. Morfologie <i>Fusarium oxysporum</i> a blízkých druhů .....	5
2.2.1. <i>Fusarium oxysporum</i> .....	6
<b>2.2.2. <i>Fusarium solani</i></b> .....	<b>7</b>
<b>2.2.3. <i>Fusarium subglutinans</i></b> .....	<b>8</b>
2.2.4. Morfologické odlišení <i>Fusarium oxysporum</i> od jiných druhů.....	8
2.3. Detekce <i>Fusarium oxysporum</i> molekulárními metodami.....	9
2.3.1. Podstata metody.....	9
2.3.2. Metodika vychází z literatury.....	9
2.3.3. Technické vybavení pro izolaci DNA z mycelia hub a pro její uchování.....	9
2.3.4. Chemikálie potřebné pro izolaci DNA z mycelia hub.....	10
2.3.5. Postup izolace DNA z mycelia hub pomocí kitu DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) .....	10
2.3.6. Polymerázová řetězová reakce .....	12
2.3.6.1. Technické vybavení potřebné pro PCR reakce .....	12
2.3.6.2. Složení reakční směsi pro PCR reakci:.....	13
2.3.6.3. Pracovní postup pro PCR.....	13
2.3.7. Metodika elektroforézy DNA.....	15
2.3.8. Elektroforéza v agarózovém gelu .....	15
2.3.9. Vizualizace PCR produktů po elektroforetické separaci .....	18
2.3.10. Vyhodnocení PCR analýzy.....	18
2.4. Závěr.....	19
3. Srovnání novosti postupů.....	20
4. Popis uplatnění metodiky.....	20
5. Ekonomické aspekty.....	21
6. Seznam použité literatury .....	24
7. Seznam publikací, které předcházely metodice.....	25

## 1. Cíl metodiky

Cílem zpracování této metodiky bylo vypracovat a popsat pracovní postup pro spolehlivou, rychlou a přesnou detekci houbového patogena *Fusarium oxysporum* použitím druhově – specifické PCR a možnosti využití těchto postupů např. pro hodnocení zdravotního stavu rostlin.

V průběhu vypracovávání metodiky byly uvedené postupy využity k zjištění kontaminace rostlinného materiálu trvale travních porostů (mulčované plochy, senáž), vzduchu a půd.

## 2. Vlastní popis metodiky

### 2.1. Úvod

Rod *Fusarium* je celosvětově rozšířeným rodem, vyskytujícím se ve všech klimatických pásmech. Z hlediska zemědělství patří k jedním z nejvýznamnějších, protože mohou způsobovat choroby různých hospodářsky významných rostlin, primárně obilovin.

Zástupci rodu *Fusarium* patří také mezi nejvýznamnější kontaminanty trvale travních porostů (TTP). Poměrně často se vyskytujícím druhem je *Microdochium nivale* (syn. *F. nivale*), který je původcem jednoho z nejrozšířenějších a nejzávažnějších onemocnění trávníků, tzv. sněžné světlorůžové plísňovitosti trav. Škody mohou způsobovat také i další druhy, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. avenaceum*, *F. culmorum* a *F. poae* (Klimeš, 1997; Inch & Gilbert, 2003; Voženílková *et al.*, 2010). Jedná se o významné kontaminanty nejen rostlinného materiálu ale i ovzduší a půdy.

Symptomy způsobené těmito patogeny jsou si navíc velmi podobné. Dosud používané klasické konvenční metody jsou časově náročné a spoléhají na biochemickou a morfologickou identifikaci, izolaci a kultivaci patogena *in vitro* a na charakterizaci na základě patogenity (Yang *et al.*, 2007). Další diagnostické metody, mikroskopické a sérologické, jsou náročné na pracovní sílu. Sérologické metody si navíc vyžadují sledování patogen-specifických protilátek (Tsunehiro *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 2008). Techniky molekulární detekce a identifikace jsou nezávislé na kultivačních nárocích patogena nebo jeho variabilitě; rychlost molekulárních technik významně předčí rychlost standardních mikrobiologických identifikačních testů. To všechno jsou důvody pro používání moderních, rychlých, efektivních, citlivých a specifických molekulárně – biologických metod. Jednou z nich je polymerázová řetězová reakce s použitím specifických primerů. Genetické studie na základě PCR prováděl u rodu *Fusarium* spp. například Chen *et al.* (2008). Pomocí PCR – RFLP a nested PCR identifikoval *F. oxysporum* v rostlinném pletivu bez viditelného symptomatického napadení.

Houby r. *Fusarium* patří mezi fytopatogenní houby, které nelze přehlížet ani při nízkém výskytu. Neměla by být podceňována ani jejich schopnost produkovat nebezpečné mykotoxiny.

V rámci sledování kvality a bezpečnosti krmiva je proto důležité monitorovat výskyt fuzarióz s toxinogenním účinkem. Rod *Fusarium* je bohatým zdrojem široké palety sekundárních metabolitů, trichothečenů, zearalenonů a fumonisinů. V posledních letech vstoupily do pozornosti i mnohé další důležité mykotoxiny, jako jsou moniliformin, enniatiny, beauvericin a fusaproliferin (Sorensen, 2009). *F. oxysporum* produkuje tyto mykotoxiny: moniliformin, fuzarin C, kys. fuzárová, T-2 toxin, sambutoxin, nivalenol nebo wortmanin (Weidenböcker, 2001).

Korektní identifikace patogenů je důležitá např. pro kontrolu zdravotního stavu rostlin, šlechtění na rezistenci. Taktéž následný výzkum chování patogenu musí být založen na správné identifikaci druhu. Včasná, rychlá a přesná diagnostika těchto patogenů v různých vývojových stádiích rostliny je důležitá i z hlediska zabezpečování kvalitních a zdravotně nezávadných potravinářských výrobků a krmiv.

## 2.2. Morfologie *Fusarium oxysporum* a blízkých druhů

Pro druhovou determinaci hub rodu *Fusarium* se používají dva typy živných médií.

Identifikační média pro makroznaky:

PDA (bramborovo-dextrózový agar),

PSA (bramborovo-sacharózový agar)

využívané pro **charakteristiku kolonií** (zbarvení, rychlost růstu)

Identifikační média pro mikroznaky:

SNA (syntetický živný agar) s filtračním papírem

hodnotí se **makrokonidie** (celkový tvar a velikost, tvar apikální a bazální buňky), **mikrokonidie** (tvar, velikost, způsob tvorby v řetězcích nebo ve shlucích), **fialidy** (mono, polyfialidy, délka, větvení u složitějších konidioforů), **chlamydoสปory** (znak sekundárního významu).

**Inkubační teplota:** 25°C

**Osvětlení:** střídání světla a „black light“ (12h/12h)

**Doba kultivace:** 5, 7, 10, 14 dní

### 2.2.1. *Fusarium oxysporum*

Celosvětově rozšířený fytopatogenní druh, často se vyskytuje také jako saprotrof v půdě. Mycelium na PDA (obr. 1a) je flokózní, bílé, fialovorůžové až fialové. Spodní strana je světle až tmavě fialová, u některých izolátů se nevyskytuje žádný pigment agaru. Vytváří konidie dvojího typu. Mikrokonidie (obr. 1b, 1c a 1d) se vytváří na krátkých monofialidách, mají protáhlý elipsoidní nebo válcovitý tvar, mohou být rovné nebo zakřivené, jejich velikost je 5-15 x 2-5 $\mu$ m. Makrokonidie (obr. 1b a 1d) jsou většinou se 3-5 septy, jejich velikost je 25-55 x 2,5-6 $\mu$ m, jsou vřetenovité a mírně zakřivené, vytváří se na krátkých monofialidách buď na vzdušném myceliu nebo v oranžových sporodochiích. Chlamydostry se tvoří terminálně nebo interkalárně (Leslie *et al.* 2006).

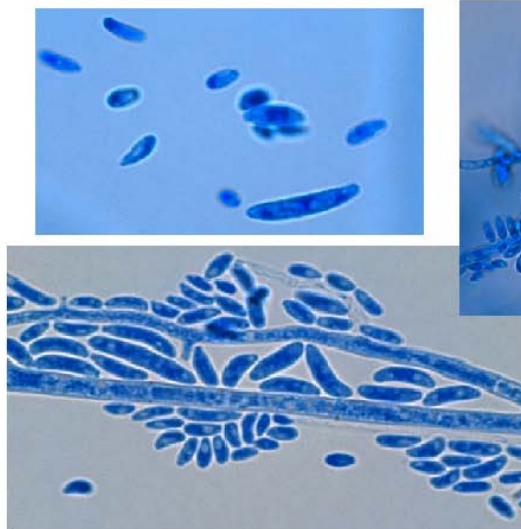
*Fusarium oxysporum* je jedním z ekonomicky nejvýznamnějších druhů rodu *Fusarium*, ale zároveň také druh s vysokou variabilitou. Vyskytuje se především jako půdní saprofyt, byl ale izolován také z obilovin, trav a dalších rostlin, na kterých může působit jako patogen. *F. oxysporum* produkuje tyto mykotoxiny: moniliformin, fuzarin C, kys. fuzárová, T-2 toxin, sambutoxin, nivalenol nebo wortmanin (Weidenbörner, 2001).

#### Obr. 1: *Fusarium oxysporum*

a) kolonie na PDA agaru



b) mikrokonidie a makrokonidie



c) mikrokonidie hromadějící se na špičkách fialid



d) mikrokonidie a makrokonidie nahromaděné podél hýf

### 2.2.2. *Fusarium solani*

Na PDA vytváří rychle rostoucí flokozní mycelium šedobílé barvy (obr. 2a), spodní strana často zelenavá, modrozelená či hnědá (obr. 2b). Vytváří dvojí typ konidií. Mikrokonidie (obr. 2d a 2e) se tvoří na dlouhých vláknitých monofialidách, mají protáhlý tvar, se zaoblenými konci, velikost je 8-16 x 2-4  $\mu\text{m}$ . Makrokonidie (obr. 2c) se tvoří na bohatě větvených konidioforech, jsou vřetenovité a mírně zakřivené, se 3-5 septy, velikost je 27-52  $\mu\text{m}$  x 4,4-6,8  $\mu\text{m}$ . Makrokonidie ze vzdušného mycelia jsou menší. Chlamydoสปory se tvoří interkalárně nebo v řetězcích (Leslie *et al.*, 2006).

*Fusarium solani* je celosvětově rozšířený druh v půdě, má široký hostitelský okruh rostlin i živočichů. U člověka může způsobovat keratitidu. Některé kmeny *F. solani* produkují imunosupresivní látky či různé druhy pigmentů, které hrají důležitou roli v patogenezi (Leslie *et al.* 2006).

**Obr. 2: *Fusarium solani***

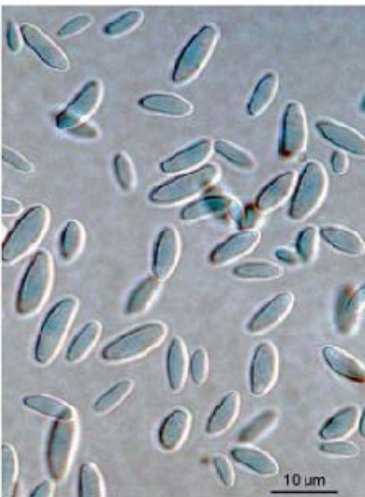
a) kolonie na PDA agaru  
(7 dní, 25°C)



b) kolonie na PDA agaru  
(7 dní, 25°C revers)



e) Fialidy s mikrokonidiemi



c) Makrokonidie

d) Mikrokonidie

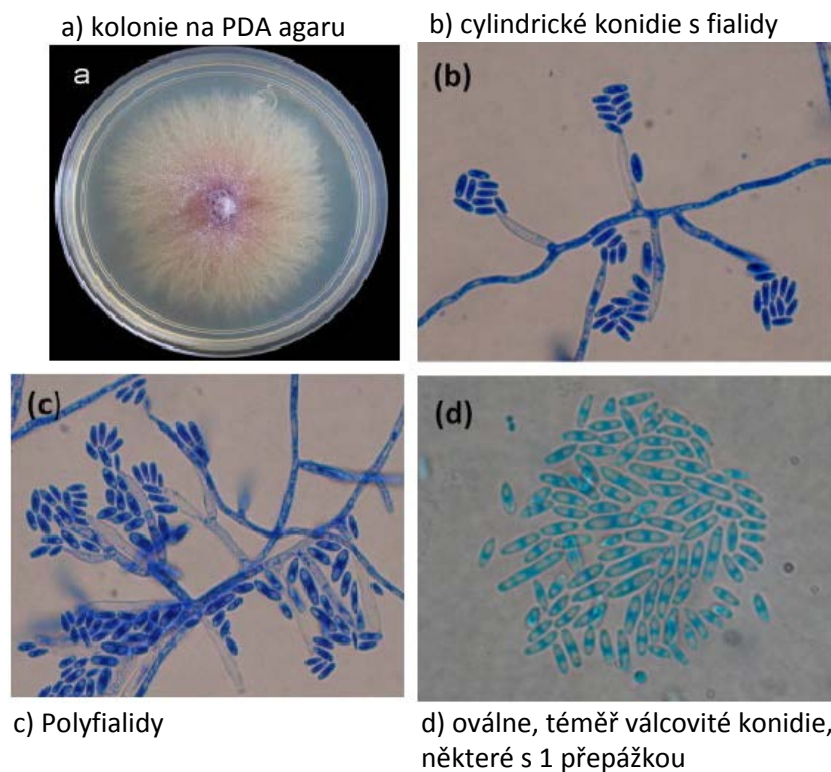
© foto: RNDr. Alena Kubátová, CSc.

### 2.2.3. *Fusarium subglutinans*

Mycelium je na PDA bělavé až šedofialové (obr. 3a). Pigmentace v agaru velmi proměnlivá, šedooranžová, šedofialová, případně až černá. Makrokonidie se 3-5 přehrádkami, velikost je 20-50 x 2-4,5  $\mu\text{m}$ , jsou rovné nebo slabě zakřivené. Mikrokonidie se tvoří na polyfialidách v kulovitých shlucích, mají oválný nebo vřetenovitý tvar, velikost je 10-25  $\mu\text{m}$  x 2,5-4  $\mu\text{m}$  (obr. 3b, 3c a 3d). Chlamydostry se netvoří (Leslie *et al.* 2006).

*Fusarium subglutinans* se vyskytuje spíše v chladnějších oblastech, kde se pěstuje kukuřice, způsobuje hnilobu kukuřice (stalk rot and cob rot of maize) a je to patogen přenosný i osivem. *F. subglutinans* se ale vyskytuje také na travách a jiných rostlinách. Kmeny tohoto druhu mohou produkovat mykotoxiny (fumonisiny) (Leslie *et al.*, 2006).

**Obr. 3: *Fusarium subglutinans***



### 2.2.4. Morfologické odlišení *Fusarium oxysporum* od jiných druhů

Izoláty *F. oxysporum* je velmi obtížné morfologicky odlišit od *F. solani* a *F. subglutinans*. *F. solani* se vyznačuje tvorbou dlouhých monofialid, na kterých se tvoří mikrokonidie. Leslie *et al.* (2006) uvádí jako jeden z důležitých odlišovacích znaků pro rozlišení *F. subglutinans* od *F. oxysporum* tvorbu mikrokonidií z polyfialid a absenci chlamydostry. Polyfialidy je však u některých izolátů *F. subglutinans* obtížné najít a chlamydostry mohou být u izolátů *F. oxysporum* vytvářeny velmi pomalu (až po 20 dnech).



## 2.3. Detekce *Fusarium oxysporum* molekulárními metodami

### 2.3.1. Podstata metody

Detekce patogenu je založena na amplifikaci specifického úseku genomu patogenu. Principem PCR je pomnožení krátkého úseku cílové DNA vymezeného primery, jehož sekvence je specifická pro určitý druh. Použité primery byly navrženy Mishra *et al.* (2003) do ITS oblasti rDNA, generující 340-bp PCR produkt specifický pro *F. oxysporum*. Oblast ITS1-5.8S-ITS2 (ITS region) je součástí ribozomální DNA a představuje jeden z nepoužívanějších molekulárních markerů využívaných při detekci houbových patogenů.

### 2.3.2. Metodika vychází z literatury

- DNeasy Plant Handbook, 10/2012 ([www.qiagen.com](http://www.qiagen.com))
- Mishra P. K., Fox R. T. V., Culham A. (2003): Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic *Fusaria*. *FEMS Microbiology Letters* 218: 329 – 332.

### 2.3.3. Technické vybavení pro izolaci DNA z mycelia hub a pro její uchování

- centrifuga (min. 10 000 otáček/min.) s rotorem na plastové mikrozkušavky o objemu 1,5 / 2 ml
- nádoba na tekutý dusík
- porcelánové třecí misky s tloučky (průměr misek cca 7 cm)
- analytické váhy
- sterilní skalpel nebo špachtle na odebrání mycelia z agaru
- vodní lázeň nebo termoblok
- vortex (mikrotřepačka)
- automatické pipety a kompatibilné špičky
- plastové mikrozkušavky 1,5 ml / 2 ml (Eppendorf) a stojánky na mikrozkušavky

#### 2.3.4. Chemikálie potřebné pro izolaci DNA z mycelia hub

- tekutý dusík
- izolační souprava DNeasy® Plant Mini Kit (kat. číslo 69104, Qiagen, Německo)
- absolutní etanol

#### 2.3.5. Postup izolace DNA z mycelia hub pomocí kitu DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen)

Metoda je založena na principu purifikace DNA pomocí křemičitých mikrokolonek – na první kolonce dochází k zachycení proteinů, polysacharidů, detergentu a dalších nečistot, na druhé kolonce dochází k zachycení DNA a jejímu následnému vymytí elučním roztokem.

##### **Před zahájením samotné izolace je nutno dodržet a připravit:**

- všechny centrifugace provádět při laboratorní teplotě (15° – 25°C)
- vodní lázeň nebo termoblok předehřát na teplotu 65°C
- před prvním použitím izolační soupravy je nutné do roztoků AW1 a AW2 přidat doporučené množství etanolu
- pokud se v pufru AP1 a AW1 vytvoří během skladování sraženiny, musí se ve vodní lázni rozpustit při teplotě 65°C

Použitá matrice: houbové mycelium, které bylo získáno z rostlinného materiálu (mulč) nastřihaného na segmenty o velikosti 2 – 5 mm. Rostlinné segmenty byly následně vyloženy na misky s živným médiem (PDA).

- a) Na analytických váhách navážíme 100 mg mycelia opatrně seškrábaného z agaru. V třecí misce v kapalném dusíku vzorek důkladně rozdrtíme na jemný prášek. Prášek přeneseme sterilní špachtlí do sterilní 2 ml zkumavky. Vzorek nesmí roztát! Ihned pokračujeme následujícím krokem.
- b) K homogenizovanému vzorku přidáme 400 µl pufru AP1 předehřátého na 65°C a 4 µl RNázy A (100 mg/ml). Směs důkladně protřepeme na vortexu a inkubujeme 20 – 30 min. při 65°C. V průběhu inkubace zkumavku 2 –3x promícháme převrácením zkumavek.

- c) Přidáme 130  $\mu$ l pufru P3, promícháme převrácením zkumavek a inkubujeme 5 min. na ledu.
- d) Lyzát centrifugujeme (5min./14 000 rpm).
- e) Lyzát napipetujeme (přelijeme) do QIAshredder Mini spin kolonek (fialová) umístěné ve 2 ml sběrné zkumavce. Centrifugovat (2 min./14 000 rpm).
- f) Vodní fáze prošlou přes kolonku přeneseme do nové mikrozkušavky (nedodávaná) tak, aby nedošlo k narušení usazeniny. Většinou se získá 450  $\mu$ l supernatantu. Je-li ho méně, přepočteme množství roztoků přidávaných v dalších krocích.
- g) Přidáme 1,5x objemu pufru AW1 a promícháme otáčením mikrozkušavky.
- h) Supernatant přeneseme do nových mikrocentrifugačních zkumavek.
- i) Pipetou přeneseme 650  $\mu$ l směsi do DNeasy Mini spin kolonek (bílá) umístěné do 2 ml sběrné zkumavky. Centrifugujeme (1min./8 000 rpm), poté odstraníme přefiltrovanou frakci a do bílé kolonky znova přeneseme zbytek směsi. Centrifugujeme (1min./8 000 rpm). Odstraníme přefiltrovanou frakci i centrifugační zkumavky.
- j) Kolonku se zachycenou DNA umístíme do nové 2 ml sběrné zkumavky a přidáme 500  $\mu$ l promývacího pufru AW2. Centrifugujeme (1min./8 000 rpm) a přefiltrovanou frakci odstraníme.
- k) Přidáme dalších 500  $\mu$ l pufru AW2 do stejné DNeasy kolonky, centrifugujeme (2min./14 000 rpm). Přefiltrovanou frakci odstraníme.
- l) Pro důkladné vysušení DNeasy membrány centrifugujeme (1min./14 000 rpm) ještě jednou bez použití promývacího pufru, aby došlo k úplnému vysušení membrány v kolonce. Přefiltrovanou frakci i centrifugační zkumavky odstraníme.
- m) DNeasy kolonky opatrně vyndáme z centrifugačních zkumavek, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku etanolem obsaženým ve filtrátu a přeneseme do nových 1,5 (2ml) mikrozkušavek. Na střed membrány přidáme 100  $\mu$ l elučního pufru AE.

- n) Necháme inkubovat 5 min. při lab. teplotě (15° - 25°C), poté centrifugujeme (1 min./8 000 rpm)
- o) Vyhodíme bílou kolonku. Fáze prošlá kolonkou obsahuje rozpuštěnou DNA.
- p) Pokud budeme se vzorky pracovat v krátkém časovém horizontu (do 1 týdne), uchováme je při teplotě 4°C. Pokud je časový horizont pro práci s vyizolovanou DNA delší, necháme je zamrazit při – 20°C. DNA skladujeme v mikrozkušavkách 1,5 (2 ml).

Kvalitu a koncentraci vyizolované DNA ověřujeme elektroforeticky v 1% agarózovém gelu. Na parafilm nanese 1 µl nanášecího pufru (LB buffer), přidáme 10 µl vzorku DNA a promícháme pipetou. DNA je vizualizovaná po obarvení ethidium bromidem na UV transiluminátoru. Koncentrace DNA je odhadnuta srovnáním se standardem Lambda DNA/*Hind* III Marker.

## 2.3.6. Polymerázová řetězová reakce

### 2.3.6.1. Technické vybavení potřebné pro PCR reakce

- PCR box – příprava PCR reakcí
- 1,5 ml (2ml) plastové mikrozkušavky (Eppendorf) – příprava premixu
- automatické pipety a k nim kompatibilné špičky
- minicentrifuga
- vortex
- termocykler

Před zahájením přípravy PCR reakce je nutné:

- naředit primery na pracovní koncentraci (10µM)
- všechny roztoky uchovávané v mrazáku důkladně rozmrazit buď v lednici anebo při laboratorní teplotě. Zkušavky promícháváme jejich převrácením a krátkým vortexováním. Nakonec je krátce stočíme na minicentrifuze.

### 2.3.6.2. Složení reakční směsi pro PCR reakci:

- PPP Master Mix ((Purple DNA Polymerasa PCR Master mix, Top - Bio, ČR) dodávaný 2x koncentrovaný: 150 mM Tris – HCl, pH 8,8 (při 25°C), 40 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 μM dATP, 400 μM dCTP, 400 μM dGTP, 400 μM dTTP, 100 U/ml Taq Purple DNA polymerasy, barvivo, stabilizátory, aditiva a barvivo. Nanášecí pufr pro gelovou elektroforézu PCR produktů není nutno dodávat, jelikož barvivo je již ve směsi obsaženo.
- druhově – specifické primery (syntéza firmou East Port Praha s.r.o. podle sekvencí popsaných v uvedené publikaci, Tabulka 1).

Tabulka 1: Specifikace primerů použitých pro molekulární identifikaci *F. oxysporum*

DETEKOVANÝ DRUH	NÁZEV PRIMERŮ	NUKLEOTIDOVÁ SEKVENCE (5' - 3')	DÉLKA AMPLIKONU	CITACE
<i>F. oxysporum</i>	FOF1	ACATACCACTTGTTGCCTCG	340 bp	Mishra et al. (2003)
	FOR1	CGCCAATCAATTTGAGGAACG		

- DNA

### 2.3.6.3. Pracovní postup pro PCR

1. Chemikálie potřebné pro PCR necháme roztát, jemně je promícháme a krátce centrifugujeme.
2. Stanoví se počet reakcí, tj. počet vzorků; kontroly: pozitivní kontrola (DNA získána z čisté kultury *F. oxysporum*) a negativní kontrola, která je určena pro kontrolu reakční směsi (premixu) – místo templátové DNA přidáme odpovídající množství PCR Ultra H<sub>2</sub>O a jedna reakce navíc (jako rezerva pro pipetovací chybu). Pro každý vzorek si připravíme a popíšeme jednu sterilní 0,5 ml PCR zkumavku.
3. Do 1,5 ml zkumavky Eppendorf přidáme v daném pořadí jednotlivé složky reakční směsi (Tabulka 2). Celkový objem reakční směsi vypočítáme, když objem premixu vynásobíme počtem vzorků včetně obou kontrol a jednoho vzorku navíc.

Schéma pipetování – systém PPP Master Mix Top-Bio:

Tabulka 2: Objemy reakční směsi na jednu reakci

SLOŽKA	OBJEM 1 REAKCE (μl)
PCR Ultra H <sub>2</sub> O	9,5
PPP MASTER MIX s MgCl <sub>2</sub>	12,5
PRIMER FOR1	0,5
PRIMER FOF1	0,5
DNA	2
CELKOVÝ OBJEM	25

4. Premix důkladně promícháme po dobu minimálně 10 vteřin (obracením zkumavky, vortexováním).

5. Premix rozdělíme po 23 μl do připravených 0,5 ml PCR zkumavek. Pipetujeme v tomto pořadí: beztemplátová kontrola (místo templátové DNA se použije 2 μl PCR Ultra H<sub>2</sub>O, do každé další zkumavky pak přidáme 2 μl templátové DNA jednotlivých vzorků. Pozitivní kontrola (DNA *F. oxysporum*) se do premixu přidává jako poslední.

6. Zkumavky krátce stočíme v mikrocentrifuze, vložíme do cykleru pro PCR a zahájíme amplifikaci, která probíhá na TC – 512 (Techne) při následujícím časově – teplotním profilu za podmínek uvedených v tabulce 3.

Tabulka 3: Podmínky amplifikace DNA *F. oxysporum* pomocí PCR

TEPLOTA	POČET CYKLŮ	PROCES	ČAS (s)
95°C	1x	POČÁTEČNÍ DENATURACE	180
	36x		
95°C		DENATURACE	30
54°C		HYBRIDIZACE PRIMERŮ	60
72°C		SYNTÉZA DNA ŘETĚZCE	90
72°C	1x	KONEČNÁ ELONGACE	300

PCR produkty se rozdělují na 1,5% agarózovém gelu v 1x TBE pufru. Jako marker se používá 100 bp DNA ladder (NEB) a DNA fragmenty se vizualizují barvením pomocí ethidium bromidu pod UV světlem. Produkty amplifikace se zaznamenávají pomocí Canon Imaging System.

### 2.3.7. Metodika elektroforézy DNA

Standardní metodou, univerzálně používanou k rozdělení makromolekul, je elektroforéza. V elektrickém poli se makromolekuly s nenulovým elektrickým nábojem pohybují k jedné z elektrod v závislosti na své relativní molekulové hmotnosti, celkovém náboji a tvaru. DNA je kyselina obsahující záporně nabitě fosfátové skupiny. V elektrickém poli se pohybují fragmenty DNA od záporné elektrody směrem ke kladné. K dělení fragmentů DNA se užívá nejčastěji agarózový gel uložený horizontálně. Fragmenty o stejné délce se v gelu pohybují stejně rychle a vytvoří proužek. DNA je na gelu vizualizována pomocí specifického barvení ethidium bromidem (EtBr). Tato látka patří mezi interkalační barviva. Váže se uvnitř dvoušroubovice a po ozáření ultrafialovým světlem (UV) oranžově fluoreskuje.

### 2.3.8. Elektroforéza v agarózovém gelu

Chemikálie:

- agaróza (v kvalitě vhodné pro elektroforézu DNA)
- zásobní roztok TBE pufru
- roztok ethidium bromidu
- LB pufr
- DNA marker
- amplikony PCR reakce

Příprava nanášecího pufru – LB (Loading Buffer):

- 0,025 g bromfenolové modři a 4 g sacharózy rozmícháme v 10 ml vody. Pufr rozpipetujeme do 1,5/2 ml zkumavek a uchovááme ho v lednici.

Příprava 0,5 M EDTA

- navážíme 37,22 g EDTA, nasypeme do 250 ml kádinky a přidáme 100 ml dH<sub>2</sub>O. Míchadlem pečlivě zamícháme a upravíme na pH 8,0 pomocí NaOH (cca 4 g). EDTA se rozpouští pouze při pH 8,0. Roztok přelijeme do odměrného válce a doplníme dH<sub>2</sub>O do celkového objemu 200 ml. Roztok nakonec vsterilizujeme v autoklávu 20 minut při 120°C.

#### Příprava zásobního roztoku TBE pufru (10x TBE):

- 108 g Tris báze, 555 g kyseliny borité a 40 ml 0,5 M roztoku EDTA o pH 8,0 doplníme destilovanou vodou do celkového objemu 1 l

#### Příprava pracovního roztoku 1x TBE pufru:

- 100 ml zásobního roztoku 10x TBE pufru zředíme v 900 ml destilované vodě (dH<sub>2</sub>O).

#### Roztok ethidium bromidu – EtBr:

- 0,1 g ethidium bromidu se rozpustí v 10 ml destilované vody. Roztok EtBr uchováváme v tmavé lahvi při 4°C.

#### Velikostní Marker – DNA ladder:

- Lambda DNA/*Hind* III Marker; 100 bp DNA ladder (NEB) – 1 µl markeru, 9 µl vody, 1 µl LB se promíchá a nanese na gel

#### Přístroje:

mikrovltná trouba

sada automatických pipet

jednotka horizontální elektroforézy se zdrojem

#### Příprava 1,5% gelu:

1. Na analytických váhách navážíme 1,5 g agarózy. Naváženou agarózu přesypeme do širokohrdlé Erlenmayerovy baňky a přilijeme 100 ml 1x TBE pufru. Baňku s puforem a agarózou umístíme do mikrovltné trouby, nastavíme čas ohřevu na 3 minuty. Během rozvážení je nutné agarózu několikrát krouživým pohybem promíchat. Dbejte na to, aby var nebyl skrytý a agaróza nevykypěla a nevytekla mimo baňku.
2. Ohřev ukončíme po 1 minutě varu. Baňku vyjmeme z mikrovltné trouby a opatrně její obsah ještě jednou krouživým pohybem promícháme.
3. Baňku postavíme na elektromagnetickou míchačku a vložíme do ní magnetické míchadlo.



4. Během míchání agarózového gelu si připravíme formu na gel s hřebínkem pro vytvoření nanášecích jamek v gelu.
5. Když teplota agarózy v baňce klesne přibližně na 55°C (baňka se dá udržet v ruce), přidáme 2 µl EtBr důkladně promícháme a nalijeme do připravené vaničky, ve které je umístěn hřebínek. Nalévací vanička musí být vyrovnaná do vodorovné polohy. Agarózu je nutné nalévat opatrně a plynule, bez tvorby bublin, případné bubliny je zapotřebí odstranit (špičkou).
6. Agarózový gel necháme 30 – 60 min. ztuhnout.
7. Po ztuhnutí a vychladnutí gelu z něj opatrně vyjmeme hřebínek. V gelu zůstanou jamky pro nanášení vzorků.

#### Elektroforetická separace fragmentů

##### 1. Nanášení vzorků:

Připravený gel vložíme do elektroforetické vany a převrstvíme ho dostatečným množstvím pracovního roztoku 1x koncentrovaného pufru TBE pufru (2 mm nad úroveň gelu).

2. Do první jamky nanese 1 µl délkového standardu 100 bp DNA Ladder (NEB). Pro ověření reakce je nutné používat pozitivní a negativní kontroly. Jako pozitivní kontrolu používáme izolát *Fusarium oxysporum* CCM F-422 z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně. Jako negativní kontrola slouží reakce pouze s vodou. Do dalších jamek nanášíme vždy 10 µl každého vzorku tak, aby byla zastoupena vždy pozitivní a negativní kontrola. Před nanesením do dráhy každý vzorek promícháme několikrát natažením do špičky pipety a nanese pod hladinu elektroforetického pufru do jamek.

3. Po ukončení nanášení vzorků uzavřeme elektroforetickou vanu víkem a nastavíme hodnotu elektrického napětí (pro 1,5% 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.

7. Gel položíme na UV transiluminátor a pod UV světlem ho vyfotíme pomocí fotodokumentačního zařízení.

### 2.3.9. Vizualizace PCR produktů po elektroforetické separaci

Detekce produktů PCR probíhá pomocí jejich obarvení ethidium bromidem a vizualizací 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 amplikonu pro *F. oxysporum* je 340 bp.

### 2.3.10. Vyhodnocení PCR analýzy

Přítomnost patogenu je indikována amplifikací specifického DNA fragmentu typického pro daný patogen. Pomocí *F. oxysporum* specifických primerů FOF1/FOR1 jsou amplifikovány produkty o délce 340bp. Pozitivním výsledkem je fluoreskující proužek vzniklý v očekávané velikosti 340 bp. Délku proužku porovnáme s délkou, která vznikla u pozitivní kontroly a srovnáním s velikostním standardem určíme jejich délky. U negativní kontroly (bez DNA) nesmí vzniknout žádný proužek.

Pozitivní kontrola: vykazuje jasně rozeznatelný pruh gelu v místě, kde se má hledaný proužek v porovnání s velikostním markerem vyskytovat. V našem případě musí pozitivní kontrola obsahovat proužek o velikosti 340 bp (Obrázek 4 ).

V případě nejasného výsledku výše uvedených kontrol nebo výsledku, který se dokonce jeví jako chybný, je nutné daný běh amplifikace opakovat.

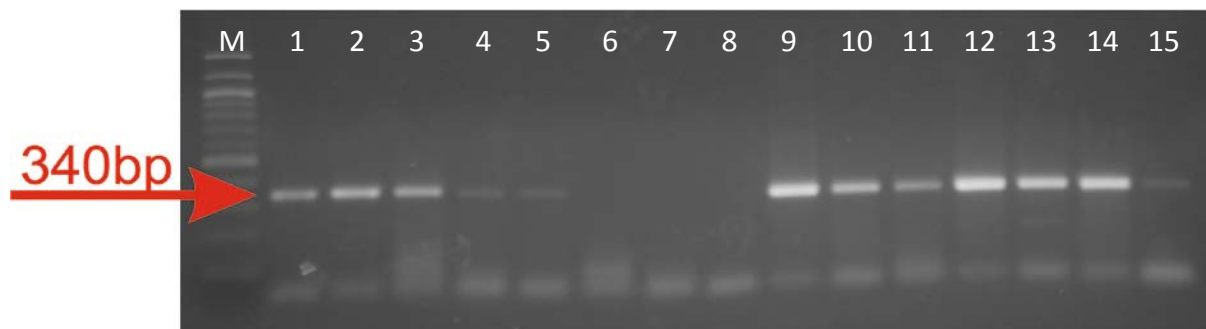
V případě správných výsledků kontrol je možné konstatovat, že:

beztemplátová kontrola nedává žádný pruh kromě pruhu či skvrny odpovídající svou polohou primerům, primer – dimerům apod. v oblasti 20 – 100bp,

vzorky negativní pro daný amplikon jsou vzorky, v jejichž dráhách se nevyskytují pruhy v místech, kde ve srovnání s velikostním standardem a pozitivní kontrolou, má ležet hledaný proužek,

vzorky pozitivní pro daný amplikon jsou vzorky, v jejichž dráhách se vyskytují pruhy v místech, kde ve srovnání s velikostním standardem a pozitivní kontrolou, má ležet hledaný proužek,

vzorky nejasného výsledku pro daný amplikon jsou vzorky, v jejichž dráhách v příslušném místě v porovnání s velikostním markerem a pozitivní kontrolou nelze jednoznačně určit přítomnost pruhu. V takovém případě je hodnocení vzorků ovlivněno zkušeností pracovníka a provádí se vždy v porovnání s pozitivní kontrolou. V případě nejednoznačnosti výsledku je ale lepší zkoušku raději opakovat.



Obr. 4: Gel s amplifikačními produkty z druhově – specifické PCR pro stanovení *F. oxysporum*. 1 – 5 a 10 – 15 pozitivní vzorky; 6 – 7 negativní vzorky; 8 – negativní kontrola (voda); 9 – pozitivní kontrola *F. oxysporum* CCM F-422; M – 100bp DNA Ladder (NEB)

## 2.4. Závěr

Vypracovaná metodika byla zaměřena na molekulární detekci *F. oxysporum* izolovaného z rostlinného materiálu TTP prostřednictvím druhově – specifických primerů. Použité primery byly navrženy Mishra *et al.* (2003) do ITS oblasti rDNA, generující 340-bp PCR produkt specifický pro *F. oxysporum*. Předností PCR metody je přesná druhově – specifická detekce patogenu *F. oxysporum* a jeho odlišení od jiných významných patogenů. Patří sice k poměrně nákladným metodám, co se týče přístrojového vybavení a spotřebního materiálu, ale oproti klasickým mikroskopickým postupům zde dochází k jednoznačné identifikaci patogenu na úrovni DNA.

Základní metodické kroky, které jsou popsány v metodice, lze doporučit pro vyloučení nebo potvrzení možné kontaminace *F. oxysporum*. Prokazatelnou výhodou použití PCR je možnost získání výsledků i v případech, kdy nejsme schopni docílit výsledků pomocí klasických mykologických postupů – omezená tvorba makrokonídií, kontaminace izolátů nežádoucími mikroorganismy (např. bakteriemi, *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp.).

### 3. Srovnání novosti postupů

„Metodika detekce *Fusarium oxysporum* pomocí druhově – specifické PCR“ obsahuje prvně publikované postupy vedoucí ke spolehlivé diagnostice tohoto houbového patogenu. Postupy diagnostiky *F. oxysporum* byly vypracovány na základě dlouhodobého výzkumu zaměřeného na molekulární detekci houbových patogenů se zaměřením na rod *Fusarium*, který byl prováděn v Zemědělském výzkumu, s.r.o. v Troubsku. Kromě původních vědeckých prací publikovaných především v anglickém jazyku, obsahujících dílčí výsledky výzkumu, nebyly kompletní metodické postupy diagnostiky a podrobné návody pro molekulární detekci tohoto závažného houbového patogenu v češtině dosud publikovány.

V předložené metodice jsou optimalizovány postupy molekulární detekce *Fusarium oxysporum* pomocí spolehlivé druhově – specifické metody PCR za účelem rychlé a přesné identifikace ve srovnání s obtížnou a časově náročnou determinací na základě standardních mykologických klíčů.

### 4. Popis uplatnění metodiky

Výsledky analýz jsou uplatnitelné v efektivní kontrole chorob, v kontrole primárních zemědělských produktů vstupujících jako základní surovina do výroby potravin a krmiv. Tato metoda umožňuje monitorovat stav průběhu rostlinné výroby a umožňuje připravit zásahy směřující k ochraně porostů a k zlepšení zdravotních parametrů primárních produktů rostlinné výroby.

Certifikovaná metodika je určena jak pro pracovníky diagnostických laboratoří ÚKZÚZ, tak pro pracoviště zabývající se fytopatologickou problematikou, jako jsou vědecká a výzkumná instituce, šlechtitelské stanice, vzdělávací instituce, dále fytopatologům a pracovníkům rostlinolékařské a zemědělské praxe. Metodiku mohou dále využít pracoviště, které se zabývají šlechtěním jetelů a trav, např. pro kontrolu zdravotního stavu rostlin a ve šlechtění na rezistenci.

Metodika bude uplatněna prostřednictvím firmy „Šlechtění jetelů a trav Hana Jakešová“, se kterou byla uzavřena smlouva o uplatnění metodiky.

## 5. Ekonomické aspekty

Při posuzování vztahu nákladů a očekávaného hospodářského zisku je třeba věnovat pozornost i neekonomickým přínosům, jejichž vyčíslení v penězích je velmi obtížné. Z pohledu ochrany zdraví spotřebitele se hlavním celospolečenským přínosem v současnosti stává zajištění zdravotní nezávadnosti potravin a zemědělských produktů, zvláště pak oblast výroby krmiv a jejich zdravotní a hygienická nezávadnost.

### **Náklady na zavedení metody**

Náklady na zavedení postupů uvedených v metodice závisí na tom, jestli se bude zavádět zcela nový provoz pro molekulární identifikaci houbových patogenů nebo se metodika pouze implementuje do stávajících provozů. V případě, že laboratoř již postupy a základním přístrojovým vybavením pro práci s nukleovými kyselinami již disponuje, jsou náklady na zavedení postupu dané pouze nákupem chemikálií, pokud již nejsou k dispozici.

Náklady (ceny jsou uvedeny bez DPH, nezahrnují režie a vycházejí z aktuálních cen platných pro rok 2014) na zavedení celého provozu pro molekulární identifikaci houbových patogenů jsou následující:

#### Vybavení pro sterilizaci plastů:

stolní autokláv od 58 tis. Kč

**Celkem od 58 tis. Kč**

#### Přístroje pro přípravu a uchování vzorků, pufrů, chemikálií a tekutého dusíka:

analytické váhy od 38 tis. Kč (bez interní kalibrace od 17 tis. Kč)

Dewarova nádoba na tekutý dusík 22,5 tis. Kč

laboratorní předvážky od 6 tis. Kč

stolní pH-metr od 15 tis. Kč

třepačka (vortex) od 4 tis. Kč

magnetická míchačka od 5 tis. Kč

minicentrifuga od 6 tis. Kč

chladnička cca 8 tis. Kč

mraznička do - 20°C od 7 tis. Kč

mikrovltná trouba cca 1,5 tis. Kč

pipety (3 ks) od 10 tis. Kč

**Celkem od 123 tis. Kč (102 tis. Kč)**

#### Vybavení pro izolaci DNA:

termoblok od 12 tis. Kč

automatické pipety (3ks) od 10 tis.

centrifuga od 50 tis. (nechlazená)

**Celkem od 72 tis. Kč**

Přístroje pro separaci nukleových kyselin:

napěťový zdroj od 10 tis. Kč

horizontální elektroforéza od 12 tis. Kč

**Celkem od 22 tis. Kč**

Vybavení pro PCR:

PCR termocykler (96 – jamkový formát) od 120 tis. Kč (gradientový termocykler od 180 tis. Kč)

PCR box (bez stolku) od 40 tis. Kč

samostatná sada automatických pipet (4 ks) od 14 tis. Kč

**Celkem od 174 tis. Kč (234 tis. Kč)**

Přístroje a potřeby pro dokumentaci a vyhodnocení výsledků:

zdroj UV záření (transiluminátor) od 28 tis. Kč

fotodokumentační systém s CCD kamerou od 100 tis. Kč

osobní počítač od 10 tis. Kč

**Celkem od 138 tis. Kč**

Spotřební materiál

Sklo (kádinky, odměrné valce, Erlenmayerovy baňky), třecí misky s tloučkem cca 8 tis. Kč

Plasty cca 5 tis. Kč

Chemikálie cca 35 tis. Kč

Pinzety, nůžky, skalpely cca 3 tis. Kč

**Celkem cca 51 tis. Kč**

**Cena za zavedení celého provozu 617 tis. Kč (698 tis. Kč)**

Z uvedeného přehledu je patrné, že zavedení celého provozu molekulární identifikace houbových patogenů začíná na částce přibližně 617 tis. Kč, která je odvozena od nákladů za vybavení laboratoře přístroji pro práci s materiálem v podmínkách molekulární laboratoři.

### **Ekonomický přínos pro uživatele**

Ekonomická efektivnost využití dané metodiky se projeví zejména při potřebě hodnotit nebo třídit větší soubory vzorků, např. ve šlechtění, při hodnocení zdravotního stavu rostlin, apod. Předpokládané ekonomické a další přínosy jsou obsaženy v možnosti provádět poměrně rychlé screeningové třídění a výběr zdravotně nezávadných materiálů (např. genotypů, odrůd, atd.) Ekonomický přínos spočívá i v úspoře nákladů na provádění molekulárních analýz velkého počtu vzorků, které oproti použití techniky a finančně náročnějších molekulárních metod (např. real-time PCR) představují u 1 vzorku úsporu cca 20 až 25,-Kč (v závislosti na plánovaném rozsahu analýz vzorku). Musíme ale brát do úvahy, že pořízení nejlevnějšího real-time PCR cykleru, dostupného na českém trhu, se pohybuje od 299 tis. Kč bez DPH, přičemž cena PCR cykleru je cca 120 tis. Kč. Pokud je nutné využít službu jiných institucí, které dané přístrojové vybavení vlastní, je odhadovaná úspora nižší o odpočet odpisů na dané zařízení. Se stoupajícím počtem vzorků bude cena za stanovení houbového patogenu 1 vzorku významně klesat a tím bude ekonomický přínos pro uživatele výraznější.

Dalšími přínosy předkládané metodiky je rozšíření spektra technik a metodických postupů používaných v biotechnologické laboratoři, rozšíření portfolia technik a služeb prováděných v laboratoři, metodická a v neposlední řadě i vzdělávací funkce.

Uvedená metoda je dobře aplikovatelná pro rutinní využití, přičemž analýza od přijetí vzorků do laboratoře, přes extrakci DNA až po samotné stanovení přítomnosti patogenu trvá jenom 2 - 3 dny. Zkrácení doby tak umožní nejen eliminovat chyby, které vznikají při identifikaci patogenu pomocí kultivačních a následně mikroskopických metod, ale umožní i zvýšit výkon laboratoře a tím i její příjem a produktivitu práce.

## 6. Seznam použité literatury

DNeasy Plant Handbook, 10/2012 (www.qiagen.com)

CHEN W., LI H., WEN J. Z. (2008): Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumarinum* by PCR-RFLP and nested – PCR. *Microbiology Tongbao* 35(2): 209 – 214.

INCH S., GILBERT J. (2003): The incidence of *Fusarium* species recovered from inflorescences of wild grasses in southern Manitoba. *Canadian Journal of Plant Pathology* 25: 379 – 383.

KLIMEŠ F. (1997): Lukařství a pastvinářství – Ekologie travních porostů. JU ZF České Budějovice: 140.

LESLIE J. F., SUMMERELL B. A. (2006): The *Fusarium* laboratory manual, Ames, 388 p.

MISHRA P. K., FOX R. T. V., CULHAM A. (2003): Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic *Fusaria*. *FEMS Microbiology Letters* 218: 329 – 332.

SORENSEN J. L. (2009): Preharvest fungi and their mycotoxins in maize. Ph. D. Thesis. Lyngby: Center for Microbial Biotechnology, 2009. ISBN: 978-87-91494-68-0.

TSUNEHIRO K., YUICHIRO S., KATSUHIKO F., HIROSUKE O. (1989): Novel enzyme immunoassays for specific detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* and for general detection of various *Fusarium* species. *Phytopathology* 79(2): 162 – 165.

VOŽENÍLKOVÁ B., KLIMEŠ F., KOBES M., SUCHÝ K., KVĚT J. (2010): Influence of mowing on phytopathological aspects of mountain meadows dynamics. *Ekológia* 29: 290 – 293.

WEIDENBÖRNER M. (2001): *Encyclopedia of Food Mycotoxins*. Giessen, Springer, 2001, 294 p. ISBN: 3-540-67556-6.

WANG Y. K., SHI Y. X., LI B. J., CHEN H. M. (2008): Studies on identification and expeditious detection of cucumber *Fusarium* wilt. *China Vegetables* 11: 18 – 22.

YANG X. H., LU G. Z., ZHAO Z. H., LIU L. L., YAO X. M. (2007): Isolation and identification of *Fusarium* species from cucumber wilt diseased plants in vegetable greenhouses in northeastern China. *Journal of Shenyang Agricultural University* 38(3): 308 – 311.

Použité internetové zdroje:

Obr. 1a *F. oxysporum* – kolonie na PDA agaru (© foto: Alessandro Grandini, 2012; <https://www.flickr.com/photos/sruilk/with/6869086557>)

Obr. 1b, 1c a 1d *F. oxysporum* – mikroskopické fotky (© foto: Yuri, 2012; <http://thunderhouse4-yuri.blogspot.cz/2012/06/fusarium-oxysporum.html>)

Obr. 3 *F. subglutinans* – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3885953/>



## 7. Seznam publikací, které předcházely metodice

(všechny s dedikací na projekt)

### 2014

SABOLOVÁ T.: Využití druhově – specifické PCR při identifikaci druhu *Fusarium oxysporum* vyskytujícího se na trvalých travních porostech. *Úroda* 12, 2014, vědecká příloha, s. 271 – 274. ISSN 0139-6013.

HORTOVÁ B., PALICOVÁ J., STREJČKOVÁ M., NEDĚLNÍK J., BOTH Z.: Jsou mulčované travní porosty potenciálním zdrojem alergenů? *Úroda* 12, 2014, vědecká příloha, s. 247 – 249. ISSN 0139-6013.

PALICOVÁ J., HORTOVÁ B., STREJČKOVÁ M., NEDĚLNÍK J.: Problematika rodu *Fusarium* na trvalých travních porostech. *Rostlinolékař* 2, 2014, s. 18 – 20.

NEDĚLNÍK J., STREJČKOVÁ M., CHOLASTOVÁ T., BOTH Z., PALICOVÁ J., HORTOVÁ B.: Feeding, mycological, and toxicological quality of haylage. *Grassland Science in Europe 19 – EGF at 50: the Future of European Grasslands*, 2014, p. 606 – 609.

NEDĚLNÍK J., PALICOVÁ J., HORTOVÁ B., STREJČKOVÁ M.: Issues regarding the genus *Fusarium* in permanent grassland. *Grassland Science in Europe 19 – EGF at 50: the Future of European Grasslands*, 2014, p. 421 – 423.

ŘEPKOVÁ J., NEDĚLNÍK J., KRTKOVÁ V., SCHULZOVÁ V., NOVOTNÁ H., HAJŠLOVÁ J., JAKEŠOVÁ H.: „Phytoestrogen content in clover (*Trifolium* spp.) and in grass stands depending on treatment and storage.“ *Grassland Science in Europe 19 – EGF at 50: the Future of European Grasslands*, 2014, p. 495 – 497.

### 2013

CHOLASTOVÁ T., HORTOVÁ B., PALICOVÁ J.: Zhodnocení spektra hub rodu *Fusarium* na trvalých travních porostech s využitím druhově – specifické PCR. *Úroda* 12, 2013, vědecká příloha, s. 50 – 55. ISSN 0139-6013.

HORTOVÁ B., PALICOVÁ J., STREJČKOVÁ M., CHOLASTOVÁ T., NEDĚLNÍK J.: Vliv intenzity mulčování na množství mikroskopických hub ve vzduchu. *Úroda* 12, 2013, vědecká příloha, s. 46 – 49. ISSN 0139-6013.

KRTKOVÁ V., SCHULZOVÁ V., NOVOTNÁ H., HAJŠLOVÁ J. (2013): Monitoring fytoestrogenů v travních porostech v závislosti na ošetření a skladování, XLIII. symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin, Skalský Dvůr u Bystřice nad Pernštejnem, 27.-29.5.2013, str. 92-95, ISBN 978-80-7080-866-5.

CHOLASTOVÁ T., HUSLOVÁ M. (2013): Sledování houbových patogenů r. *Fusarium* vyskytujících se na mulčovaných plochách a v objemných krmivech s využitím druhově – specifické PCR. *Mykologické listy*, Praha, no. 125, s. 44, ISSN 1213 – 5887.

NEDĚLNÍK J., STREJČKOVÁ M. (2013): Kontaminace objemných krmiv houbovými patogeny. *Mykologické listy*, Praha, no. 125, s. 25, ISSN 1213 – 5887.

HORTOVÁ B., PALICOVÁ J., STREJČKOVÁ M., CHOLASTOVÁ T., NEDĚLNÍK J. (2013): Mykobiota na mulčovaných plochách. *Mykologické listy*, Praha, no. 125, s. 22, ISSN 1213 – 5887.

## 2012

ŘEPKOVÁ J., SIMANDLOVÁ J., JAKEŠOVÁ H., NEDĚLNÍK J., SOLDÁNOVÁ M., HAJŠLOVÁ J., SCHULZOVÁ V.: Vztah rodičovských genomů u mezidruhových hybridů *Trifolium pratense* x *Trifolium medium*. Úroda 12, 2012, vědecká příloha, s. 50 – 55. ISSN 0139-6013.

CHOLASTOVÁ T., HUJSLOVÁ M.: Využití PCR metody při identifikaci houbových patogenů rodu *Fusarium* vyskytujících se na trvalých travních porostech. Úroda 12, 2012, vědecká příloha, s. 179 – 182. ISSN 0139-6013.

## Dedikace

„Metodika detekce *Fusarium oxysporum* pomocí druhově – specifické PCR “ byla vypracována díky finanční podpoře MZe ČR v rámci řešení výzkumného projektu NAZV **QI111C016** „Navrhnout nové postupy údržby trvalých travních porostů v LFA minimalizací hygienických rizik spojených s výskytem alergenních mikroorganismů především z rodu *Fusarium*“.

Poděkování:

Autoři děkují Ladě Štěpánkové a Zdeňce Vávrové (Zemědělský výzkum, s.r.o. Troubsko) za výbornou technickou pomoc a RNDr. Aleně Kubátové, CSc. za poskytnutí fotografií *Fusarium solani*.

## Seznam autorů s vyjádřením podílu práce:

Mgr. Tereza Sabolová (55 %)

Ing. Bronislava Hortová (15 %)

Mgr. Jana Palicová, Ph. D. (15 %)

Ing. Miroslava Strejčková (10 %)

RNDr. Jan Nedělník, Ph. D. (5 %)

Vydavatel: Zemědělský výzkum, spol. s r.o. Troubsko, Zahradní 400/ 1, Troubsko, 664 41

Tisk: XX

Grafická úprava:

Fotografie:

Vydání: první (12/2014)

Náklad: 300 výtisků

Počet stran:

Tato publikace neprošla jazykovou úpravou.