národní
úložiště
šedé
literatury

Metodika identifikace původců fuzarióz klasu pomocí PCR

Sumíková, Taťána; Gabrielová-Slezáková, Ludmila; Žabka, Martin

2009

Dostupný z http://www.nusl.cz/ntk/nusl-123850

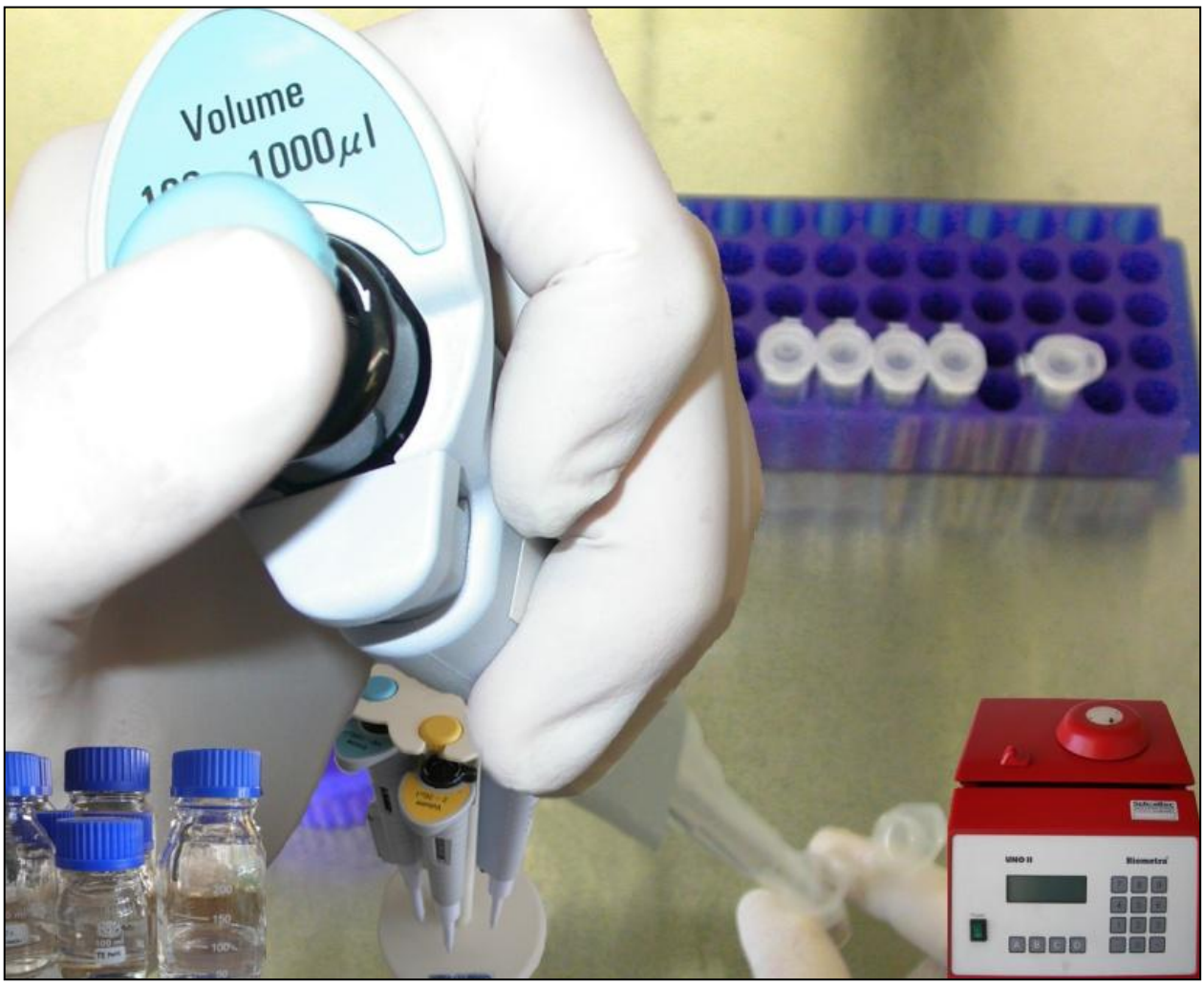
Dílo je chráněno podle autorského zákona č. 121/2000 Sb.

Tento dokument byl stažen z Národního úložiště šedé literatury (NUŠL).

Datum stažení: 26.04.2024

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní nusl.cz .

METODIKA IDENTIFIKACE PŮVODCŮ FUZARIÓZ KLASU POMOCÍ PCR



Taťána Sumíková, Ludmila Gabrielová-Slezáková, Martin Žabka

Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i.

2009

Dedikace
Metodika byla financována z projektu QG50076 a výzkumného záměru 0002700604 MZe České republiky „Udržitelné systémy pěstování zemědělských plodin pro produkci kvalitních a bezpečných potravin, krmiv a surovin“.

Metodika prošla oponentním řízením a získala osvědčení o uznání uplatněné certifikované metodiky vydané Státní rostlinolékařskou správou pod číslem Č.j. SRS 037429/2009 dne 14.12.2009.
O uplatnění metodiky byla uzavřena smlouva s Českou zemědělskou univerzitou v Praze.

Oponenti:
Mgr. Pavel Matušinský, Ph.D., Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž s.r.o.
Mgr. Hana Orságová, Státní rostlinolékařská správa Olomouc

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha, 2009

ISBN: 978-80-7427-036-9

I. Cíl metodiky

Cílem navrhované metodiky je uvedení kompletních protokolů k detekci následujících druhů rodu *Fusarium* – *F. avenaceum, F. culmorum, F. poae, F. graminearum, F. pseudograminearum, F. sporotrichioides* – pomocí multiplex PCR. Sekvence použitých druhově specifických primerů jsou převzaté z literatury a byly vybrány tak, aby bylo možné je vzájemně a libovolně kombinovat, což umožňuje detekci jednoho nebo až všech šesti výše uvedených druhů v jedné PCR reakci. Reakce jsou optimalizovány pro použití v běžné laboratoři molekulární biologie.

V metodice je nově zavedena technika pěstování mikromycet ve formě povrchových kultur na celofánu. Tato technika je speciálně určena pro následnou izolaci DNA z houbového mycelia. Technika pěstování povrchových kultur na celofánu umožňuje optimální manipulaci s napěstovaným myceliem, které se z celofánu snadno odstraní pomocí skalpelu, přičemž nedochází k nežádoucí kontaminaci vzorku agarovým kultivačním médiem nebo nečistotami z přirozeného substrátu (z napadeného vzorku).

II. Vlastní popis metodiky

Úvod

Onemocnění obilnin, označované jako fuzariózy klasu, způsobené komplexem druhů rodu *Fusarium* je rozšířené v celé Evropě (Bottalico et Perrone, 2002). Fuzarióza klasu (Fusarium head blight, scab) se projevuje předčasným odumřením klasů nebo jejich zbělením. Hlavními hostiteli jsou pšenice, ječmen a kukuřice. Toto onemocnění je zvláště významné ve vlhkých oblastech. V takových případech může dojít k význačným ztrátám na výnosech způsobených sterilitou klásků a nedostatečně vyvinutými obilkami. Je známo přinejmenším 17 druhů tohoto rodu, které se podílejí na vzniku fuzarióz, ale mezi nejčastější a nejvýznamnější patří následující druhy: *F. graminearum, F. culmorum, F. avenaceum, F. poae* a *Microdochium nivale* var. *nivale* a var. *majus*. V menší míře se vyskytují další druhy rodu *Fusarium* např. *F. tricinctum, F. equiseti, F. acuminatum, F. sambucinum* a *F. oxysporum* (Ioos et al., 2004). *F. graminearum* je hlavním původcem fuzarióz klasu zejména v teplejších a sušších oblastech, zatímco *F. culmorum* je dominantní v oblastech chladnějších a vlhčích (Parry et al., 1995). Na území České republiky začíná převažovat *F. graminearum* oproti minulým letům, kdy bylo dominantním druhem *F. culmorum* (Chrpová et al. 2004, Ostrý et al. 2004). Poslední studie ukazují zvyšující se zastoupení druhu *F. poae* (Remešová et al. 2006).

Jedná se o fakultativní nespecifické parazity, kteří také mohou infikovat další části rostlin (Parry et al., 1995, Petrowski et al., 2003, Lemmmens et al., 2004). Poškození klasů tedy může být doprovázeno infekcí kořenů, listů nebo následným napadením klíčních rostlin. Nároky těchto patogenů na výživu nejsou specifické, jedná se o všudypřítomné saprofyty. Limitujícím faktorem pro přechod do parazitické fáze je obvykle vlhkost.

Škodlivost fuzarióz spočívá jednak v redukci výnosu, která může dosáhnout až 70%, ale zejména ve schopnosti mnoha původců fuzarióz produkovat mykotoxiny (Bai et Shaner, 1994). Je známo, že fuzáriové mykotoxiny mohou způsobovat vážné zdravotní potíže jak u člověka, tak u hospodářských zvířat. Následně dochází k projevům chronické nebo akutní mykotoxikózy, např. trávicí potíže, poruchy plodnosti (Žabka et Jegorov, 2002). Nejvýznamnější fuzáriové mykotoxiny jsou trichoteceny, zejména deoxynivalenol a nivalenol a zearalenony. Ke tvorbě zdraví škodlivých toxinů v zrnu dochází zejména při infekci druhy *F. graminearum* a *F. culmorum*.

Přesná detekce jednotlivých původců fuzarióz klasu a zejména stanovení toxinogenních kmenů je nezbytná jak pro pochopení faktorů podílejících se na rozvoji onemocnění a akumulaci toxinů, tak z hlediska ochrany rostlin i zdraví konzumentů.

Mykologické určení jednotlivých druhů je dosti obtížné a relativně časově náročné, proto došlo v poslední době k rozvoji metod založených na PCR reakci. V současnosti jsou známy druhově specifické primery pro mnoho druhů rodu *Fusarium* např. pro *F. avenaceum* (Doohan et al., 1998, Turner et al., 1998), *F. culmorum* a *F. graminearum* (Nicholson et al.,1998), *F. poae* (Parry et Nicholson, 1996), *F. pseudograminearum* (Aoki et O´Donnell, 1999) a *F. sporotrichioides* (Demeke et al., 2004).

Efektivnější metodou je použití tzv. multiplex PCR tj. PCR reakce, která díky přítomnosti několika primerových párů umožňuje detekci více druhů současně. Rutinně je možné detekovat současně 2 – 14 lokusů. Nutností ovšem je zajistit, aby se amplifikované produkty dostatečně lišily ve svých délkách a bylo je tak možno bez problémů rozlišit na agarózovém gelu. Neméně důležitým předpokladem k úspěšnému použití multiplex PCR je pečlivá optimalizace reakčních podmínek, zejména zajištění vhodné annealingové teploty a koncentrace jednotlivých primerů. Problémem mohou být také nespecifické produkty, které se amplifikují společně s požadovanými fragmenty a mohou zkreslovat výsledek reakce. Nicméně při vhodné optimalizaci dochází ke znatelné úspoře času i materiálu.

Podstata metodiky

Metodika popisuje inovativní přístup pro rychlou a efektivní detekci následujících patogenních druhů rodu *Fusarium*: *F. avenaceum, F. culmorum, F. poae, F. graminearum, F. pseudograminearum* a *F. sporotrichioides.* Jedná se o spojení nového přístupu PCR detekce a nové techniky pěstování mikromycet, speciálně určené pro následnou izolaci houbové DNA.

Napadené klasy nebo zrna se omyjí ponořením do 3-5% roztoku NaClO na 2-3 minuty. Tím je vzorek zbaven povrchových nečistot a sekundárních kontaminací, které by mohly být problematické při dalším zpracování vzorků a samotné detekci. Takto připravené vzorky se posléze promyjí ve sterilní destilované vodě za účelem získání suspenze spór či myceliárních fragmentů. Takto získaná suspenze se následně jednoduše rozetře po povrchu připraveného celofánu překrývajícího agarovou živnou půdu na Petriho misce.

Pomocí skalpelu se narostlé mycelium odebere do plastových 2ml mikrozkumavek (3× každý vzorek), které se vloží do tekutého dusíku, aby došlo k okamžitému zmražení. Vzorky se uchovávají v hlubokomrazícím boxu při teplotě -80°C.

DNA se z buněk houbového mycelia extrahuje mechanickým rozrušením pletiv a následnou separací od ostatních složek, zejména od proteinů, polysacharidů a barviv. Působením cetrimoniumbromidu (CTAB) dochází za přítomnosti chloridu sodného k vytvoření ve vodě rozpustného komplexu CTAB-DNA. Ten se od proteinů a sacharidů oddělí působením směsi chloroformu a isoamylalkoholu a je vyvázán do vodné fáze. DNA se poté z vodné fáze vysráží pomocí absolutního etanolu a zbytky chloridu sodného a CTAB jsou odstraněny 70% roztokem etanolu. Peletky DNA se rozpustí v pufru TE, tj. velmi zředěném roztoku Tris (tris-hydroxymethyl) aminomethan a EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová). Tris upravuje pH roztoku a EDTA působí jako chelační činidlo a vyvazuje Mg^{2+} ionty, a tím inhibuje činnost nukleáz, enzymů štěpících DNA.

Přibližná koncentrace izolované DNA se stanoví pomocí fluorescence pod UV lampou na agarózovém gelu s ethidiumbromidem, který se váže na DNA. Fluorescence vyvolaná UV zářením působícím na vázaný ethidiumbromid je úměrná množství DNA. Míra fluorescence

vzorku DNA se porovnává s fluorescencí fragmentů o známé koncentraci u markeru Lambda DNA/*Hin*dIII.

Principem reakce PCR je amplifikace úseku DNA s párem druhově specifických primerů (forward a revers). Nejprve dochází vlivem vysoké teploty k denaturaci dvoušroubovice DNA, poté se podle principu komplementarity na příslušné sekvence DNA navážou primery. Výsledkem reakce je mnohonásobné zmnožení úseku DNA označeném na obou koncích použitými primery. Produkt PCR reakce se detekuje na agarózovém gelu pod UV lampou po obarvení ethidiumbromidem, který se přidává do gelu při jeho přípravě. V případě multiplex PCR jsou do reakční směsi přidány druhově specifické primery pro více druhů a to umožňuje detekci několika druhů současně.

V případě negativního výsledku PCR pro všechny testované (výše uvedené) druhy, metodika nabízí možnost klasického postupu detekce na základě morfologických znaků včetně doporučené určovací literatury.

Technické vybavení pro mykologickou práci a přípravu vzorků:

- Petriho misky (skleněné, plastové)
- celofánová fólie (kruhové výřezy 9 cm v průměru)
- očkovací mikrobiologické kličky
- kahan
- sterilní očkovací box
- laboratorní sklo (na oplach vzorků a tvorbu suspenze)
- kultivační termostat (optimum 23°C)
- binokulární lupa, světelný mikroskop (Olympus BX 51)

Chemikálie potřebné pro mykologickou práci a přípravu vzorků:

- 3-5% vodný roztok NaClO
- sterilní destilovaná voda
- agarová kultivační a determinační média (Oxoid, Hi-media nebo vlastní výroba podle uvedené literatury):

<u>Bramboro-dextrózový agar - PDA (Booth 1971):</u>

brambory	200g
dextróza	15g
agar	20g
destilovaná voda	1000ml

<u>Ovesný agar - OA (Samson et al. 1996):</u>

ovesné vločky	30g
agar	15g
destilovaná voda	1000ml

<u>Speciální živný agar - SNA (Nirenberg 1976):</u>

KH_2PO_4	1g
KNO_3	1g
$MgSO_4 . 7 H_2O$	0,5g
KCl	0,5g
glukóza	0,2g
sacharóza	0,2g

agar	20g
destilovaná voda	1000ml

Vybavení nutné pro uchování odebraného mycelia a následnou izolaci DNA:

- hlubokomrazící box -80°C
- tekutý dusík
- homogenizátor QIAGEN a karbidové kuličky
- centrifuga s otáčkami min. 11 000 otáček/min. s rotorem na plastové mikrozkumavky o objemu 2ml
- vodní lázeň nebo teplotní blok
- vortex
- vybavení na horizontální elektroforézu
- transluminátor
- fotodokumentační zařízení
- automatické pipety a špičky
- 2 ml plastové mikrozkumavky (Eppendorf)

Roztoky a chemikálie potřebné k izolaci DNA metodou CTAB:

<u>Extrakční pufr</u>:

0,35M sorbitol	35ml 1M roztoku
0,1M Tris (Tris[hydroxymethyl] aminomethan)	10ml 1M roztoku Tris pH8
5mM EDTA	1ml 0,5M roztoku EDTA pH8
H_2O doplnit do	100ml

<u>5% roztok sarkosylu</u>

N-lauroyl-sarcosine (Sigma)	5g
H_2O	100ml

<u>2% CTAB (lyzující pufr)</u>

CTAB (Sigma Aldrich)	2g do 20ml H_2O
0,2 M Tris (Serva)	20ml 1M roztoku pH8
50mM EDTA (Serva)	10ml 0,5M roztoku pH8
2M NaCl (Serva)	40ml 5M roztoku
H_2O doplnit do	100ml

<u>5% CTAB</u>

CTAB (Sigma Aldrich)	5g CTAB do 20ml H_2O
0,2 M Tris (Serva)	20ml 1M roztoku pH8
50mM EDTA (Serva)	10ml 0,5M roztoku pH8
2M NaCl (Serva)	40ml 5M roztoku
H_2O doplnit do	100ml

<u>TE pufr</u>

10mM Tris (Serva)	2,5ml 1M roztoku pH8
1mM EDTA (Serva)	0,5ml 0,5M roztoku pH8
H_2O doplnit do	250ml

<u>0,8% agarózový gel (cca 50 vzorků)</u>

Agaróza (Serva)	0,96g
1×TAE pufr	120ml

Ethidiumbromid 10mg/ml roztok (Sigma-Aldrich) 1µl

1× TAE pufr

TRIS (Serva)	242g do 300ml H_2O
EDTA (Serva)	100ml 0,5M roztoku pH8
ledová CH_3COOH (Sigma-Aldrich)	57,1ml 0,5M roztoku
H_2O doplnit do	1000ml

- 5M NaCl
- Absolutní etanol (Serva) – vymražený na -20°C
- 70% roztok etanolu (Serva)
- Směs chloroform (Serva): izoamylalkohol (Lachema Brno) 24:1
- RNáza
- Velikostní standard λ HindIII (Fermentas), včetně loading buffer

Vybavení a chemikálie potřebné k determinaci druhů rodu *Fusarium* pomocí metody PCR:

- Druhově specifické primery (syntéza firmou Applera podle sekvencí popsaných v uvedených publikacích) viz tabulka 1.
- dNTP (Invitrogen)
- Qiagen polymeráza včetně pufru a $MgCl_2$
- H_2O (Sigma Aldrich)
- Velikostní standard 100bp DNA Ladder (Fermentas), včetně loading buffer
- PCR plastové zkumavky – stripy + víčka nebo PCR destičky + víčka
- Automatické pipety a špičky
- Termocykler (UNO II, Biometra)
- Minicentrifuga
- Vybavení na horizontální elektroforézu
- Transluminátor
- Fotodokumentační zařízení

2% Agarózový gel

Agaróza (Serva)	2,4g
1×TAE pufr	120ml
Ethidiumbromid 10mg/ml roztok (Sigma-Aldrich)	1µl

Tabulka 1.

Druh r. *Fusarium*	Označení primerů	Sekvence primerů (5´- 3´)	Citace
F. avenaceum	Fa	CAA GCA TTG TCG CCA CTC TC GTT TGG CTC TAC CGG GAC TG	Doohan et al. 1998
F. culmorum	FC01	ATG GTG AAC TCG TGG C CCC TTC TTA CGC CAA TCT CG	Nicholson et al. 1998
F graminearum	Fg16	CTC CGG ATA TGT TGC GTC AA GGT AGG TAT CCG ACA TGG CAA	Nicholson et al. 1998
F. poae	FP82	CAA GCA AAC AGG CTC TTC ACC TGT TCC ACC TCA GTG ACA GGT T	Parry et Nicholson 1996
F. sporotrichioides	AF330109C	AAA AGC CCA AAT TGC TGA TG TGG CAT GTT CAT TGT CAC CT	Demeke et al. 2004
F. pseudograminearum	FP1	CGG GGT AGT TTC ACA TTT CYG GAG AAT GTG ATG ASG ACA ATA	Aoki et O´Donnell 1999

Postup

1. Očištění a příprava vzorku

Napadené vzorky se nejprve povrchově očistí ponořením do 3-5% roztoku NaClO. V tomto roztoku se vzorek mírně promíchává po dobu 2-3 minut. Poté se vzorek vyjme a opláchne ve sterilní destilované vodě pro odstranění zbytků roztoku. Tento krok slouží k odstranění povrchových nečistot.

2. Příprava inokulační suspenze patogena (nebo směsi patogenů)

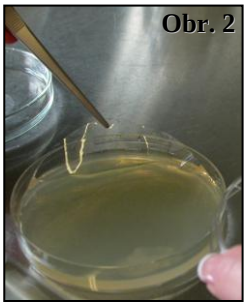
Omytý vzorek se vloží do sterilní zkumavky, sterilní plastové mikrozkumavky nebo sterilní baňky (dle rozměrů vzorku) se sterilní destilovanou vodou. Celkový objem sterilní destilované vody je závislý na konkrétním vzorku, jeho velikosti a stupni napadení. Pro přípravu očkovací suspenze z malých vzorků (napadené zrno v mikrozkumavce, zkumavce) je optimální použití vortexu. Na větší vzorky (napadené klasy v baňce) je vhodné použít laboratorní třepačku. Vzorek se 1-3 minuty vortexuje (dle stupně napadení). V případě třepání větších vzorků v baňkách na třepačce se doporučuje třepat 10-20 minut (dle stupně napadení).

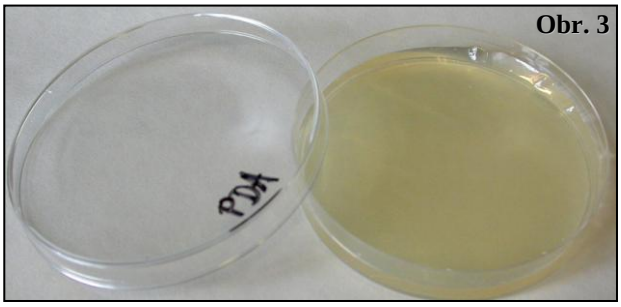
3. Příprava sterilního celofánu

Kruhové celofánové výseče (9 cm, dle velikosti Petriho misky) je nejlépe samostatně umístit do skleněných Petriho misek. Pro lepší sterilizaci a pozdější manipulaci při kladení na povrch agaru se celofán zalije nejlépe pomocí střičky destilovanou vodou a to tak, aby došlo k celkovému pokrytí celofánové výseče. Skleněné misky s celofánem se následně vloží to autoklávu. Sterilní celofán se připraví sterilizací v autoklávu při teplotě 120°C po dobu 20 minut. Po sterilizaci a vychladnutí je celofán připraven pro aplikaci na povrch agaru.

4. Příprava Petriho misek s celofánovou fólií

Petriho misky se po nalití kultivačního média (PDA) nechají pozvolna vychladnout. Na povrch ztuhlého kultivačního média se ve sterilních podmínkách (sterilní očkovna, očkovací box) položí vysterilizované kruhové výseče celofánové folie pomocí sterilní pinzety. Po přilnutí celofánu na povrch kultivačního media je miska připravena na následnou inokulaci.

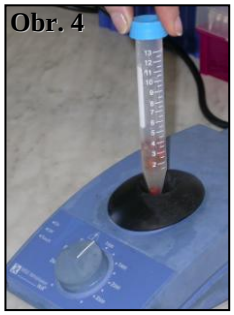


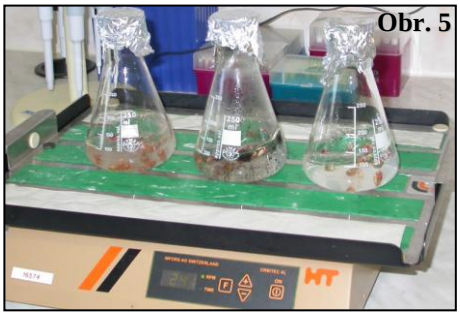


Obr. 1: Petriho miska s vysterilizovaným celofánem
Obr. 2: Vložení celofánové folie na PDA mediu
Obr. 3: Petriho miska s kultivačním médiem a celofánovou fólií připravená k inokulaci

5. Inokulace Petriho misek a kultivace

Získaná inokulační suspenze ze vzorku se rozetře očkovací kličkou po povrchu připravených Petriho misek s PDA překrytým celofánovou folií a vloží do termostatu. Kultivace probíhá po dobu 4 – 7 dní při teplotě 23°C. Optimální objem rozetřené suspenze se pohybuje v rozmezí 50-100µl na povrch Petriho misky.

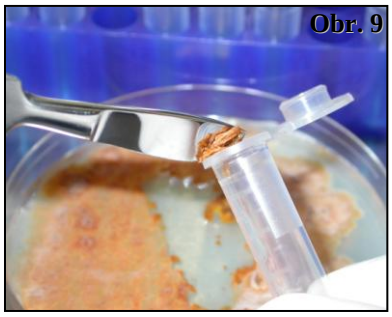




Obr. 4: Příprava očkovací suspenze z malého vzorku
Obr. 5: Příprava očkovací suspenze z větších vzorků
Obr. 6: Inokulace suspenze na celofánový povrch
Obr. 7: Naočkovaný celofán po 7 dnech kultivace

6. Získání mycelia pro extrakci DNA

Narostlé mycelium na celofánové folii se seškrábne pomocí sterilního skalpelu nebo sterilní kličky a vloží se do 2ml mikrozkumavky (množství odebíraného mycelia přibližně 1×2 cm, viz obr. 8 – 11). Pokud nenásleduje bezprostřední extrakce DNA, mikrozkumavky s myceliem se vloží do tekutého dusíku a posléze se uchovávají v hlubokomrazícím boxu při teplotě -80°C.



Obr. 8 – 11: Seškrábnutí narostlého mycelia do plastových mikrozkumavek

7. Extrakce DNA

Do 2ml mikrozkumavek s myceliem se přidá 400µl extrakčního pufru (jedná-li se o zamražené vzorky je potřeba postupovat rychle, aby nedošlo k rozmrznutí mycelia). Do každé zkumavky se vloží jedna karbidová kulička a vzorky se nechají třepat v homogenizátoru po dobu 2 minut při frekvenci 30Hz. Poté se vzorky promíchají na vortexu, přidá se k nim 400µl 2% CTAB a 200µl 5% roztoku sarkosylu. Opět se vortexují a nechají inkubovat ve vodní lázni při teplotě 60°C po dobu 30 minut. Poté je směs ochlazena na laboratorní teplotu.

Ke směsi se přidá 1× objem chloroform:isoamylalkohol (v poměru 24:1). Po 10 minutách třepání v ruce jsou vzorky centrifugovány při maximálních otáčkách dalších 10 minut. Vodná fáze se po dokončení centrifugace odebere do nové mikrozkumavky.

Ke vzorkům se přidá 400µl 5M roztoku NaCl a 100µl 5% roztoku CTAB, který musí být předehřátý na 60°C a nechají se inkubovat 10 minut při laboratorní teplotě.

Po inkubaci se opět přidá 1× objem chloroform:isoamylalkohol a po 10 minutách třepání v ruce se vzorky centrifugují při maximálních otáčkách 10 minut. Vodná fáze se odebere a celý krok se ještě jednou zopakuje.

K získanému roztoku se přidá 1ml vymraženého absolutního etanolu a po lehkém promíchání se vzorky inkubují v lednici při 4°C po dobu 10 – 15 minut. Po inkubaci se vzorky centrifugují při maximálních otáčkách po dobu 7 minut. Supernatant se odstraní

a k peletce DNA se přidá 500µl 70% etanolu a takto připravené vzorky jsou inkubovány v lednici alespoň 1 hodinu při teplotě +4°C.

Poté se vzorky opět centrifugují při maximálních otáčkách po dobu 5 minut, supernatant se odstraní a znovu se přidá 500µl 70% etanolu. Opět následuje inkubace 30 – 60 minut při teplotě 4°C.

Po další centrifugaci při maximálních otáčkách po dobu 5 minut je odstraněn supernatant a zbytky etanolu se vysuší pomocí vakuové odparky (dokud peletka DNA neskáče při poklepu na uzavřenou ependorfku). DNA se nechá rozpustit v odpovídajícím množství TE pufru (100 – 200µl) při teplotě +4°C, nejlépe přes noc.

K roztoku DNA se přidá 20µl roztoku RNázy (20mg/ml) a vzorky se inkubují po dobu 10 minut při teplotě 37°C.

Kvalita a koncentrace DNA se ověřuje na 0,8% agarózovém gelu. K 1µl DNA se přidá 8µl H_2O a 2µl loading pufru. Směs se nanese na gel a po 30 – 40 minut elektroforézy je DNA vizualizovaná ethidiumbromidem pod UV lampou. Koncentrace DNA se odhaduje srovnáním s velikostním standardem λ Hind III (6µl). Vzorky se naředí na pracovní koncentraci 50ng/µl.

8. Determinace druhů rodu *Fusarium* na základě DNA markerů pomocí metody PCR

Do PCR zkumavek nebo destiček je napipetována reakční směs. Nejprve se připraví mastermix do zvláštní zkumavky, rozpipetuje se do jednotlivých PCR zkumavek nebo destiček a nakonec se přidá 1µl roztoku DNA o koncentraci 50ng/µl.

Reakční směs – druhově specifická PCR k detekci jednotlivých druhů:

Primer mix – forward a revers primer (5µM)	1,5µl
dNTP (2,5mM)	2µl
pufr Qiagen (10×)	2,5µl
$MgCl_2$ (15mM)	1,5µl
Taq polymeráza Qiagen (5U/1µl)	0,2µl
H_2O	16,3µl
Templátová DNA	1µl
Celkový reakční objem	25µl

Reakční směs – druhově specifická multiplex PCR k detekci dvou - šesti druhů r. *Fusarium* současně:

Primer mix forward a revers primer (5µM) pro každý detekovaný druh	1,5µl* / 1µl**
dNTP (2,5mM)	2µl
pufr Qiagen (10×)	2,5µl
$MgCl_2$ (15mM)	1,5µl
Taq polymeráza Qiagen (5U/1µl)	0,2µl
H_2O	Doplnit do 24µl
Templátová DNA	1µl
Celkový reakční objem	25µl

* množství primerů pro druhy: *F. avenaceum, F. culmorum, F. pseudograminearum, F. sporotrichioides*

** množství primerů pro druhy: *F. poae, F. graminearum*

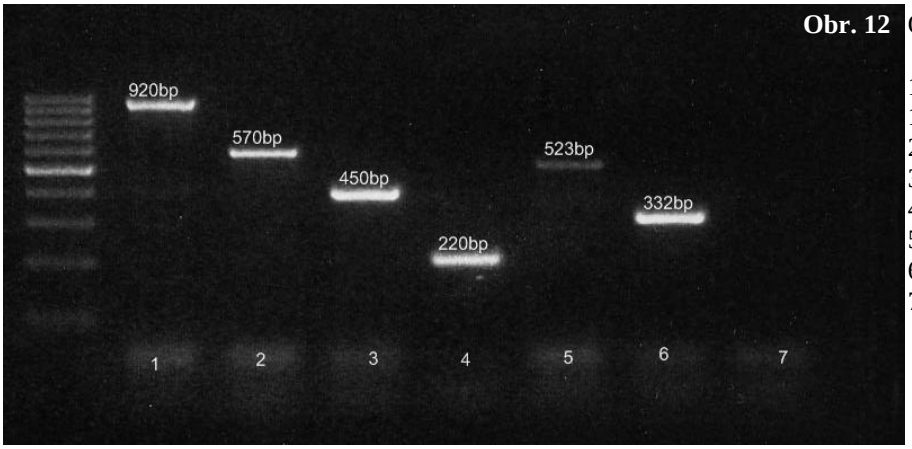
Reakce probíhá v termocykleru v následujících reakčních podmínkách:

1 cyklus: 95°C – 5 min.

35 cyklů:	95°C – 30 s.
	60°C – 30 s.
	72°C – 40 s.
Konečná extense:	72°C – 5 min.
	10°C – 24 h.

Velikost produktů PCR reakce pro jednotlivé druhy rodu *Fusarium* je uvedena na obr. 12. K produktům PCR se přidá 3µl nanášecího pufru (loading buffer) a po promíchání se nanese 12µl směsi na 2% agarózový gel spolu s 6µl délkovým standardem 100bp DNA Ladder (Fermentas). Separace probíhá elektroforézou cca 1,5 hodiny při 50V (delší čas je vhodnější při multiplex PCR, aby došlo k dobrému rozlišení všech produktů). Vizualizace a detekce se provádí pod UV lampou po přidání ethidiumbromidu. Přítomnost produktu amplifikace požadované délky značí příslušnost k testovanému druhu.

Druhová specifita použitých primerů byla vybrána na základě publikovaných výsledků výše uvedených autorů (tab. 1) a jejich spolehlivost a specifita byla ověřena na mykologicky určených druzích rodu *Fusarium*, které lze v našich podmínkách považovat za nejčastější původce fuzarióz klasu pšenice tj. *F. avenaceum, F. acuminatum, F. culmorum, F. graminearum, F. equiseti, F. poae, F. pseudograminearum* a *F. sporotrichioides*.



Obr. 12: Multiplex PCR

100bp DNA ladder,
1 – *F. avenaceum*,
2 – *F. culmorum*,
3 – *F. graminearum*,
4 – *F. poae*,
5 – *F. pseudograminearum*,
6 – *F. sporotrichioides*,
7 – voda

9. Determinace klasickými mykologickými metodami v případě negativního výsledku PCR

V případě negativního výsledku PCR se všemi uvedenými druhově specifickými primery se doporučuje k determinaci použít tradiční mykologické metody pomocí morfologických znaků (viz literatura pro morfologické určování druhů rodu *Fusarium*).

Pro klasickou mykologickou druhovou determinaci fuzárií je vhodné napěstovat houby na ovesném agaru (OA) nebo bramboro-dextrozovém agaru (PDA) pro pozorování makroskopických znaků kolonií a např. na speciálně živném agaru (SNA) pro pozorování mikroskopických znaků. Doporučené kultivační podmínky jsou 24°C a střídání tzv. “black light“ a tmy ve 12 hodinových intervalech.

Z makroskopických znaků se hodnotí růstová rychlost kolonie, zbarvení kolonie a zbarvení spodní strany kolonie. Z mikroskopických znaků se hodnotí tvar a velikost konidií a fialid (monofialidy, polyfialidy). U mikrokonidií je důležitý tvar (kulatý, citronkovitý, oválný, hruškovitý, s papilou), velikost a způsob jejich tvorby – v řetízcích nebo ve shlucích. U makrokonidií je důležitý tvar konidií (vřetenovitý, rovný, silně zakřivený) velikost konidií a tvar apikální a bazální buňky. Dalším znakem je výskyt chlamydospor.

III. Srovnání novosti postupů

Předložená metodika shrnuje kompletní protokoly s publikovanými druhově specifickými primery, umožňující spolehlivou detekci vybraných druhů rodu *Fusarium* v multiplex PCR reakci. Přestože z literatury jsou známy sekvence k detekci mnohých druhů rodu *Fusarium*, problémem některých publikovaných metod může být ne vždy spolehlivé rozlišení jednotlivých druhů nebo nutnost zdlouhavé optimalizace reakce pro podmínky konkrétní laboratoře. Rovněž jsou v literatuře známy multiplex PCR reakce k detekci druhů rodu *Fusarium*, žádná z prací však nepopisuje současnou detekci následujících druhů: *F. avenaceum, F. culmorum, F. poae, F. graminearum, F. pseudograminearum, F. sporotrichioides* – s různými možnostmi vzájemné kombinace druhově specifických primerů, což umožňuje detekci 2 až 6 druhů, podle vlastního výběru.

Metodika dále novým přístupem kultivace hub na celofánech vede k vyšší efektivitě a úspěšnosti detekce. Díky permeabilitě celofánového podkladu může houbové mycelium přirozeně růst a čerpat živiny z živné půdy. Výsledkem je tudíž přirozeně čistě a rychle napěstované mycelium, prakticky bez kontaktu s agarovým živným médiem. Již ve fázi samotné přípravy vzorků, dochází ke zjednodušení manipulace s myceliem. Oproti klasickému způsobu kultivace přímo na agarovém kultivačním médiu odpadá nesnadné a zdlouhavé oddělování houbového mycelia od kultivačního média a především pravděpodobnost kontaminace vzorku živným médiem je při správném dodržení postupu minimální. Houbové mycelium je jednoduchým způsobem lehce oddělitelné od celofánového podkladu a může být přímo přeneseno do mikrozkumavek.

IV. Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika je určená pro studenty České zemědělské univerzity, případně dalších univerzit, zabývajících se studiem mikromycet rodu *Fusarium*. Jsou zde uvedeny podrobné pracovní protokoly umožňující detekci šesti druhů rodu *Fusarium* pomocí multiplex PCR reakce v běžné laboratoři molekulární biologie včetně jejich kultivace.

V. Seznam použité literatury

Aoki T., O´Donnell K. (1999): Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp nov., formerly recognized as the Group 1 population of *F. graminearum*. Mycologia 91: 597-609.

Bai G., Shaner G. (1994): Scab of wheat: Prospect of control. Plant disease 78: 760 – 766.

Bottalico A., Perrone G. (2002): Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. European Journal of Plant Pathology 108: 611-624.

Demeke T., Clear R. M., Patrick S. K., Gaba D. (2005): Species-specific PCR-based assays for the detection of *Fusarium* species and comparison with whole seed agar plate method and trichothecene analysis. International Journal of Food Microbiology 103**:**271-284.

Doohan F. M., Parry D. W., Jenkinson P., Nicholson P. (1998): The use of species-specific PCR-based assays to analyze Fusarium ear blight of wheat. Plant Pathology 47: 197 – 205.

Chrpová J., Šíp V., Sýkorová S., Sychrová E., Matějová E. (2004): Beitrag zur Problematic der Ährenfusariosen bei Getreide. Journal of Applied Botany and Food Quality 78: 153-156.

Ioos R., Belhadj A., Menez M. (2004): Occurrence and distribution of *Microdochium nivale* and *Fusarium* species isolated from barley, durum and soft wheat grains in France from 2000 to 2002. Mycopathologia 158: 351-362.

Lemmens M., Buerstmayr H., Krska R., Schuhmacher R., Grausgruber H., Ruckenbauer P. (2004): The effect of inoculation treatment and long-term application of moisture on Fusarium head blight symptoms and deoxynivalenol contamination in wheat grains. European Journal of Plant Pathology 110: 299-308.

Nicholson P., Simpson D. R., Weston G., Rezanoor H. N., Lees A. K., Parry D. W., Joyce D. (1998): Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assay. Physiological and Molecular Plant Pathology 53, p. 17 – 37.

Ostrý V., Škarková J., Malíř F., Sýkorová S. (2004): Advances on the Occurence of Toxigenic Fungi and Mycotoxins in the Czech Republic, 99. 67 – 81. In: „An Overview on Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Europe“, Logrieco, Antonie, Visconti, Angelo (Eds.) Kluwer 2004, ISBN: 1-4020-2646-3.

Parry D. W., Jenkinson P., Mc. Leod L. (1995): *Fusarium* ear blight (scab) in small-grain cereals - a review. Plant Pathology 44: 207-238.

Parry D. W., Nicholson P. (1996): Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. Plant Pathology 45, p. 383 – 391.

Petrowski J., Kiecana I., Kaczmarek Z. (2003): Natural occurrence and distribution of *Fusarium* toxins in contaminated cultivars. European Journal of Plant Pathology 109: 331-339.

Remešová J., Sumíková T., Sychrová E., Matějová E., Chrpová J., Šíp V. (2006): Toxigenic micromycetes of genus *Fusarium* on wheat isolated in the Czech Republic. In: Sborník abstraktů "XVII. česká a slovenská konference o ochraně rostlin", 12.-14. září 2006, ČZU Praha

Turner A. S., Lees A. K., Rezanoor H. N., Nicholson P. (1998): Refinement of PCR-based detection of *Fusarium avenaceum* and evidence for phenetic relatedness to *Fusarium tricinctum*. Plant Pathology 47: 278 – 288.

Žabka M., Jegorov A. (2002): Comeback of the fungus that gave name to trichothecenes. Chemické listy 96:607 – 610.

Literatura pro morfologické určování druhů rodu *Fusarium*:

Booth, C. (1971): The genus *Fusarium*. – 237 p., Kew.

Brayford, D. (1993): The identification of *Fusarium* species. Egham, 118 p.

Burgess, L. W., Liddell, C. M., Summerell, B. A. (1988): Laboratory manual for *Fusarium* research. Sydney, 156 p.

Domsch, K. H., Gams, W., Anderson, T. H. (1980): Compendium of soil fungi. Vol. 1. – 859 p., London etc.

Gerlach, W., Nirenberg, H. (1982): The genus *Fusarium* – a pictorial atlas. Berlin & Hamburg, 406p.

Leslie, J. F., Summerell, B. A. (2006): The *Fusarium* Laboratory manual. – 388 p., Iowa.

Nirenberg, I. H. (1976): Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium* – Sektion Liseola. – Mitt. Biol. Bundesanst. f. Land- u. Forstw. Berlin–Dahlem 169: 1-117.

Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C., Filtenborg, O. (1996). Introduction to foodborne fungi. Baarn & Delft, 322 p.

Seifert, K. (1996): FusKey – *Fusarium* interactive key. [http://res.agr.ca/brd/fusarium].

VI. Seznam publikací, které předcházely metodice

Remešová J., Sumíková T., Sychrová E., Matějová E., Chrpová J.' Šíp V. (2006): Toxigenic micromycetes of genus *Fusarium* on wheat isolated in the Czech Republic. Sborník

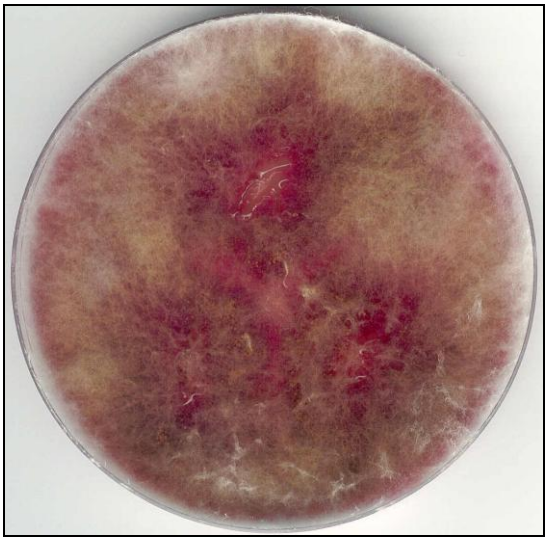
příspěvků z XVII. české a slovenské konference o ochraně rostlin, 328 -333.ISBN 80-213-1564

Chrpová J., Šíp V., Sýkorová S., Sumíková T., Sychrová E. (2007): Occurrence of Fusarium head blight (FHB) in wheat in the Czech Republic and the possibilities of the disease control. Aktuální poznatky v pěstování, šlechtění a ochraně rostlin. Sborník z konference s mezinárodní účastí konané v Brně ve dnech 8. -9. listopadu 2007, ISBN 80-86908-04-6: 99-104.

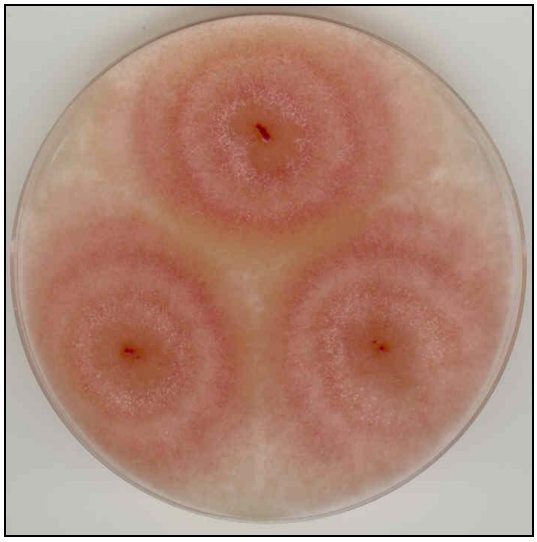
Sumíková T., Remešová J., Leišová L., Sychrová E., Chrpová J., Šíp V. (2008): Fusarium species associated with FHB on wheat isolated in the Czech republic and their molecular diversity. European Wheat Aneuploid Co-operative Newsletter, Proceedings of the 14th International EWAC Conference 6-10 May 2007, Istanbul, Turkey. 170 -171.

Slezakova L., Sumikova T., Kocourek F. (2008): The virulence of Fusarium isolates and their ability of mycotoxin production. Journal of Plant Pathology Vol. 90, Supplement 3.

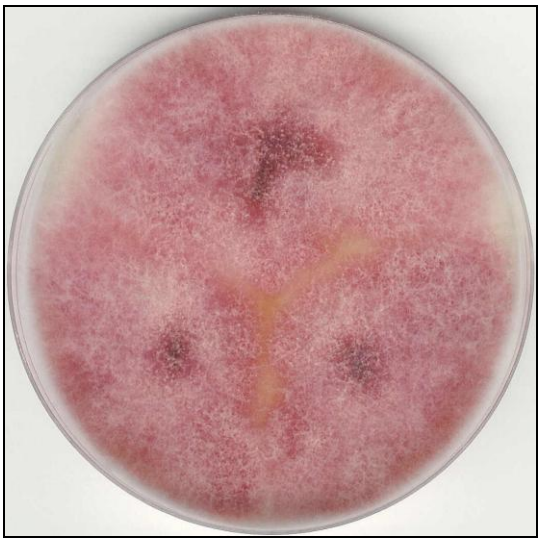
Příloha



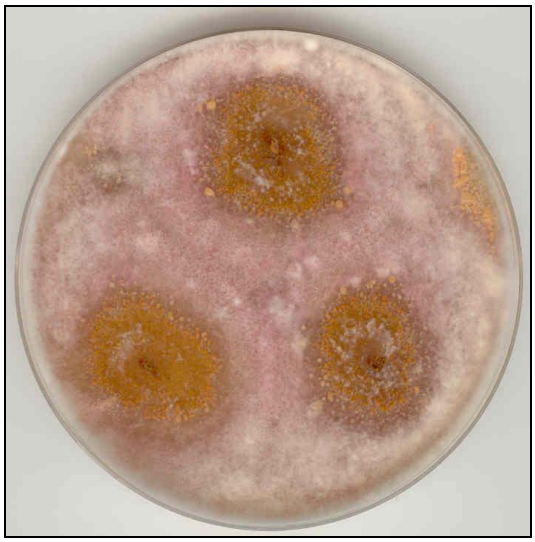
Fusarium culmorum, OA, 7 dní (2 ukázkové kmeny)



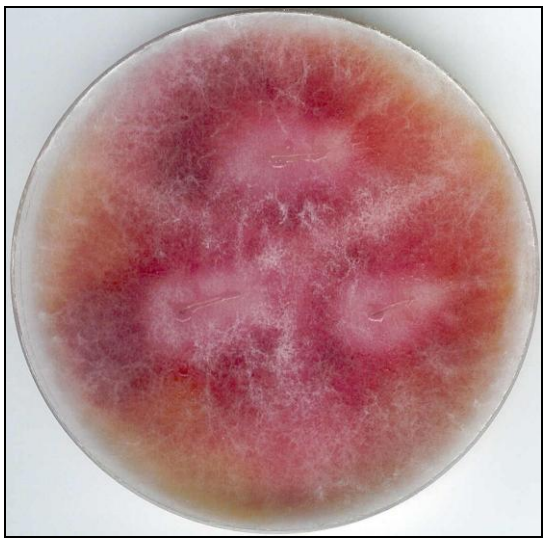
Fusarium graminearum, OA, 7 dní (2 ukázkové kmeny)

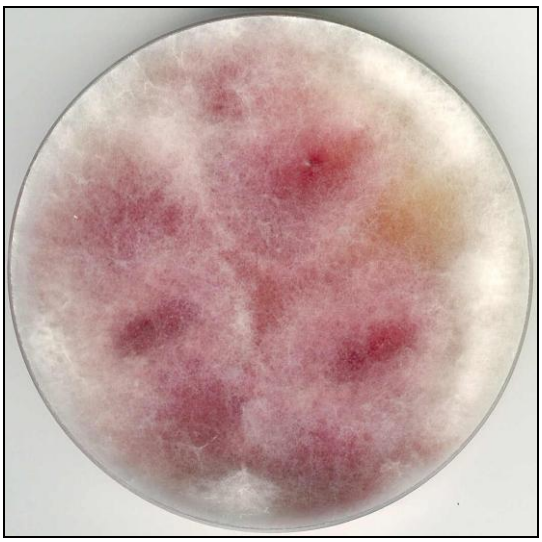


Fusarium avenaceum, OA, 7 dní

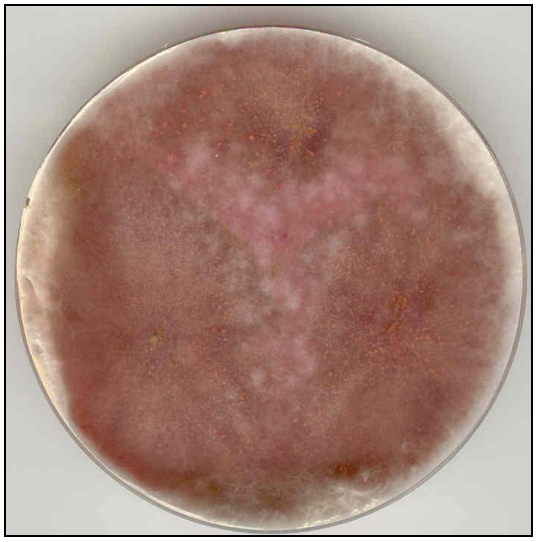


Fusarium avenaceum, OA, 14 dní



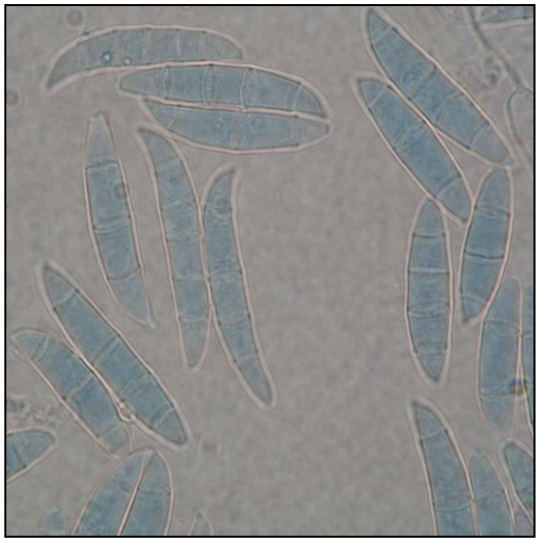


Fusarium sporotrichioides, OA, 7 dní (2 ukázkové kmeny)

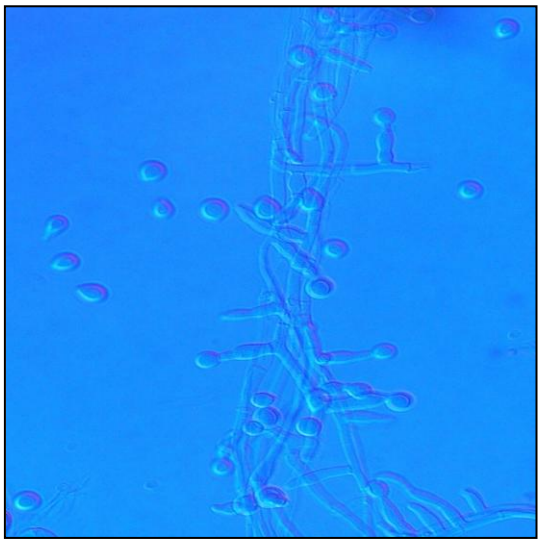


Fusarium pseudograminearum, OA, 14 dní

Fusarium poae, OA, 7 dní



Fusarium culmorum, makrokonidie, OA, 7 dní



Fusarium poae, monofialidy s mikrokonidiemi, OA, 7 dní

Symptomy napadení houbami rodu *Fusarium* na klasech pšenice

Autoři:
Mgr. Taťána Sumíková
Mgr. Ludmila Gabrielová-Slezáková
Ing. Martin Žabka, Ph.D.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
Drnovská 507
161 06 Praha 6 – Ruzyně

Název: Metodika identifikace původců fuzarióz klasu pomocí PCR

Vydal:
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
Drnovská 507
161 06 Praha 6 – Ruzyně

Metodika je veřejně přístupná na adrese www.vurv.cz

Náklad: 200 výtisků

Vydáno bez jazykové úpravy.

Metodika je poskytována bezplatně.

Kontakt na autora: sumikova@vurv.cz

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha, 2009

ISBN: 978-80-7427-036-9