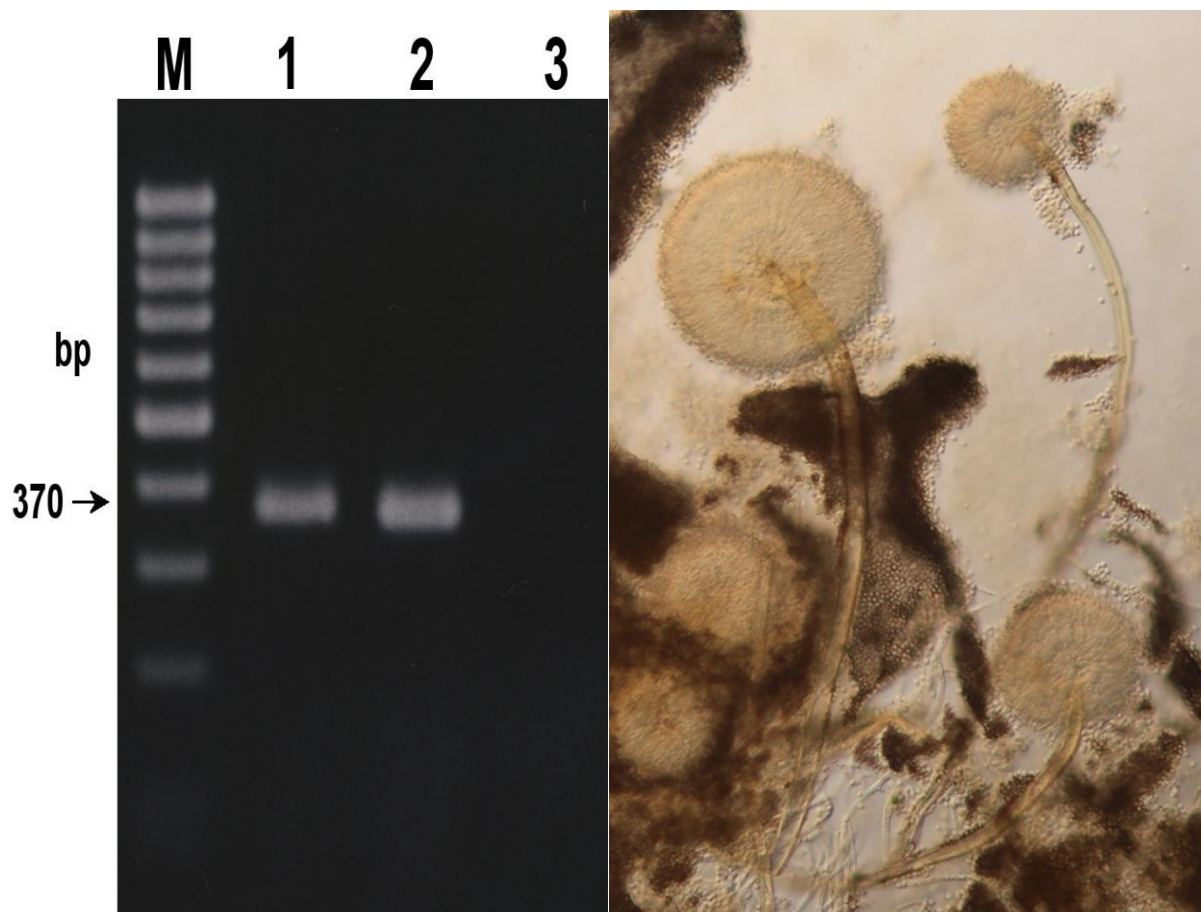




METODIKA DETEKCE A IDENTIFIKACE HUB ODPOVĚDNÝCH ZA KONTAMINACI OBILOVIN OCHRATOXINEM A CITRININEM POMOCÍ PCR

JAROSLAV SALAVA
DAVID NOVOTNÝ

METODIKA PRO PRAXI

VÝZKUMNÝ ÚSTAV ROSTLINNÉ VÝROBY, V.V.I.

2018



Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu Národní agentury zemědělského výzkumu MZe č. QJ1510204 “Technologie a metody pro zachování kvality, bezpečnosti a nutriční hodnoty vybraných rostlinných surovin“.

Metodika je určena pro praxi. O uplatnění metodiky byla 18. 12. 2017 podle ustanovení § 269 zákona 513/1991 Sb., obchodního zákoníku uzavřena smlouva s firmy AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o..

Oponenti:

Odborný oponent: Doc. Ing. Miloslav Zouhar, Ph.D., Česká zemědělská univerzita v Praze,
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Oponent ze státní správy: Ing. Jana Pekárková, Ph.D., Ústřední kontrolní a zkušební ústav
zemědělský, Praha

Autoři:

Doc. Dr. Ing. Jaroslav Salava

RNDr. David Novotný, Ph.D.

Autoři děkují Ing. Tereze Neubauerové, Ph.D. za pomoc při fotodokumentaci kmenů hub.

Metodika byla schválena Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským, osvědčení číslo UKZUZ 008178/2018.

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha 6-Ruzyně

ISBN: 978-80-7427-269-1

Obsah

1. Cíl metodiky	3
2. Vlastní popis metodiky	3
2.1. Úvod	3
2.2. Morfologie a fyziologie druhů rodů <i>Aspergillus</i> a <i>Penicillium</i>	4
2.2.1. <i>Aspergillus</i> spp.	5
2.2.2. <i>Penicillium</i> spp.	10
2.3. Detekce hub rodů <i>Aspergillus</i> a <i>Penicillium</i> molekulárními metodami	13
2.3.1. Podstata metody	13
2.3.2. Metodika vychází z literatury	13
2.3.3. Vybavení pro laboratoře a potřebné chemikálie	13
2.3.4. Extrakce celkové DNA z rostlinných pletiv DNeasy® Plant Mini Kit	16
2.3.5. Polymerázová řetězová reakce pro amplifikaci specifických sekvencí toxinogenních hub	17
2.3.6. Analýza produktů PCR	19
2.4. Závěr	21
3. Srovnání novosti postupů	21
4. Popis uplatnění metodiky	21
5. Ekonomické aspekty	21
6. Seznam použité literatury	22
7. Seznam publikací, které předcházely metodice	23

1. Cíl metodiky

Cílem vytvoření této metodiky bylo popsat pracovní postup pro rychlou a spolehlivou detekci mikroskopických hub z rodů *Penicillium* a *Aspergillus* schopných produkovat mykotoxiny ochratoxin A a citrinin v obilovinách, pokud možno před jejich produkcí a akumulací, použitím polymerázové řetězové reakce (PCR) a možnosti využití těchto postupů např. pro hodnocení zdravotní a hygienickou nezávadností rostlinných produktů.

V průběhu vypracovávání metodiky byly uvedené postupy využity ke zjištění kontaminace skladovaného obilí houbami produkujícími ochratoxin A a citrinin.

2. Vlastní popis metodiky

2.1. Úvod

Mykotoxiny jsou malé organické molekuly s obrovskou diverzitou chemické struktury a biologické aktivity. Jsou toxickými sloučeninami, občas velmi nebezpečnými pro zvířata a člověka. Hlavním místem výskytu mykotoxinů jsou potraviny rostlinného původu, které jsou kontaminovány během sklizně, dopravy, skladování a zpracování, nebo dokonce i na poli. Jejich působení na zdraví lidí a zvířat se pohybuje od neurotoxických, teratogenních, immunosupresivních, nefrotoxických, hepatotoxických po karcinogenní účinky.

Okolo 20 různých mykotoxinů poškozuje lidské zdraví, proto stále existuje požadavek na rychlé a spolehlivé techniky detekce mykotoxinů a jejich producentů.

Ochratoxin A (OTA) je mykotoxin, který celosvětově získává rostoucí pozornost díky své silné nefrotoxicitě. Mimo to International Agency for Research on Cancer (IARC) zařadila OTA do Group B2, tj. metabolit pravděpodobně karcinogenní pro člověka. Podle provedeného průzkumu, jsou potraviny kontaminované OTA hojně nacházeny. Příklady jsou obiloviny, kávové boby, koření, ořechy, vinné hrozny a fíky. Ochratoxin A je produkován houbami rodu *Aspergillus* a *Penicillium*. Z rodu *Aspergillus* produkují ochratoxin A a jiné příbuzné látky druhy ze sekcí *Circumdati* a *Nigri*. Z rodu *Penicilium* produkuje ochratoxin A a jiné příbuzné látky několik druhů ze sekce *Fasciculata*.

Citrinin (CTN) kontaminuje skladované obiloviny, arašídy a ovoce. U obilovin je jeho přítomnost častá již před sklizní. Citrinin má nefrotoxické, hepatotoxické, kardiotoxické, genotoxické, cytotoxické a teratogenní účinky. CTN je produkován běžně se vyskytujícími houbami rodů *Penicillium*, *Aspergillus* a *Monascus*. IARC zařadila citrinin do třetí skupiny karcinogenů, tedy neklasifikovaný. Do dneška neměl žádný z provedených výzkumů průkazné výsledky, a proto se nedá karcinogenita s jistotou potvrdit. Společný výskyt OTA a CTN způsobuje rakovinu jater. Citrinin produkují z rodu *Aspergillus* druhy ze sekcí *Terrei* a z rodu *Penicillium* několik druhů ze sekcí *Citrina* a *Fasciculata*.

Konvenční způsoby izolace a identifikace toxinogenních hub na základě morfologických, fyziologických a biochemických znaků z potravin jsou časově náročné a vyžadují hodně znalostí z taxonomie hub. Dokonce i s odbornými znalostmi z taxonomie je často identifikace složitá u některých rodů hub, které zahrnují velké množství blízce příbuzných druhů.

Používání technik molekulární biologie může pomoci překonat tyto problémy, protože může zkrátit čas z několika dnů na několik hodin a umožnit přesnou identifikaci druhů.

Polymerázová řetězová reakce (PCR) umožňuje přesnou identifikaci a rychlou detekci toxigenních druhů hub bez potřeby izolace čistých kultur.

Cílem tvorby této metodiky bylo umožnit detekci hub rodů *Penicillium* a *Aspergillus* schopných produkce ochratoxinu A a citrininu v obilninách, pokud možno před produkcí těchto toxinů.

2.2. Morfologie a fyziologie druhů rodů *Aspergillus* a *Penicillium*

Pro druhové rozlišení druhů hub z rodů *Penicillium* a *Aspergillus* jsou z morfologických a fyziologických znaků nejvíce používány znaky zjištěné na Czapekově agaru s kvasničným extraktem (CYA, angl. Czapek yeast autolysate agar) a sladínovém agaru pro rod *Penicillium* (MEA, angl. malt extract agar for *Penicillium* spp.). Kultivace probíhá při 25°C a 37°C. Po sedmi 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 MEA mediu.

ASPERGILLUS NIGER TIEGH.

V současné době je v rodu *Aspergillus* v sekci *Nigri* známo okolo 28 druhů a jsou členěny do 5 kladů. Z nich jsou pouze *Aspergillus carbonarius*, *A. lacticoffeatus*, *A. niger* a *A. sclerotioniger* schopny produkovat ochratoxin A.

Druhy *A. lacticoffeatus* a *A. sclerotioniger* jsou známy pouze z tropických oblastí z kávovníku a druh *A. carbonarius* nebyl nikdy zatím zjištěn na obilovinách a vyskytuje se v tropech nebo teplejších oblastech než je Česká republika. Pouze *A. niger* je znám ze zrn obilovin.

Morfologie a fyziologie *Aspergillus niger* Tiegh.

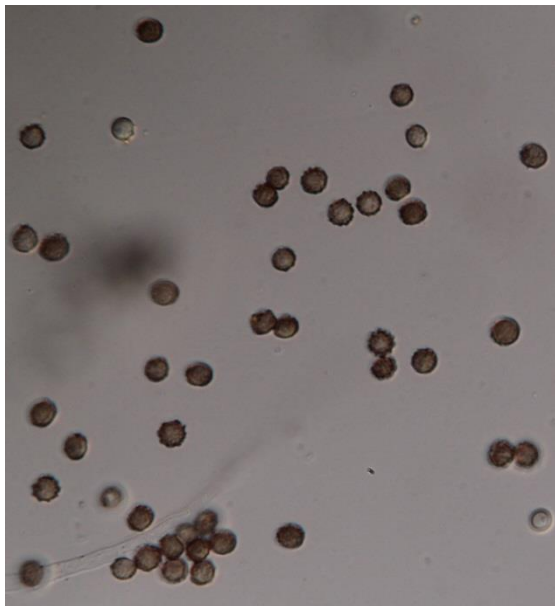
Kolonie na CYA při teplotě 25°C jsou po 7 dnech 4,5-5,0 cm velké, hnědočerné práškovité, reverz světle krémový. Kolonie na MEA při teplotě 25°C jsou po 7 dnech 5,0-6,0 cm velké, hnědočerné práškovité, reverz krémový.

Konidiofory hladké, hnědě zbarvené, 200-2500 µm vysoké, konidiogenní hlavice kulovitá 15-80 µm široká, biseriátní, metuly pokrývají více než 60% povrchu hlavice, konidiogenní buňky typu fialida, 3,5-14,5 x 2,5-5,4 µm. Konidie skorokulovité až kulovité, drsné, 3,5-5,0 µm.

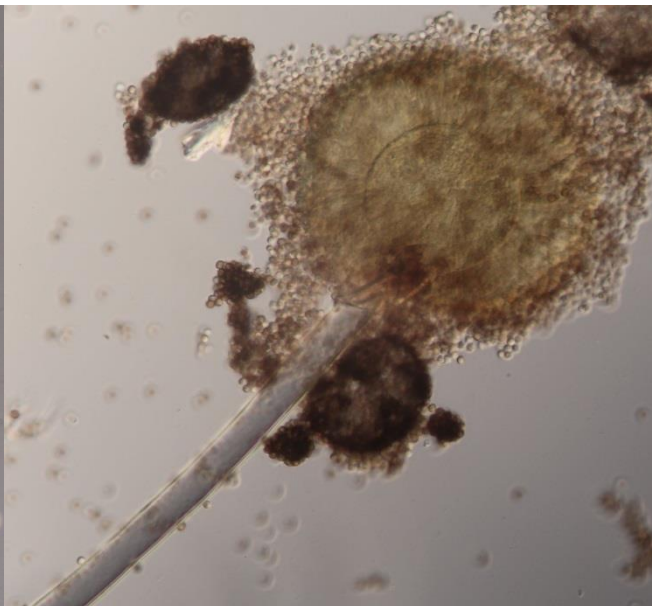
Tento druh se vyskytuje často na čerstvém opadu, semenech (vč. obilovin), sušených plodech a ořechách. Byl izolován z různých biotopů nejen v Evropě ale i jinde ve světě (DOMSCH ET AL. 2007, SAMSON ET AL. 2004).

A. niger produkuje důležité toxické metabolity: naphtho-γ-pyrony, malforminy, ochratoxin A (jen některé kmeny). Produkuje různé organické kyseliny (DOMSCH ET AL. 2007, SAMSON ET AL. 2004).

Obrázek č. 1: *Aspergillus niger* - konidie



Obrázek č. 2: *Aspergillus niger* - konidiogenní hlavice



Obrázek č. 3: *Aspergillus niger* - líč kolonie na sladínovém agaru pro *Penicillium* spp.



Obrázek č. 4: *Aspergillus niger* - líč kolonie na sladínovém agaru pro *Penicillium* spp.

ASPERGILLUS OCHRACEUS* A *ASPERGILLUS WESTERDIJKIAE

V současné době je v rodu *Aspergillus* v sekci *Circumdati* známo okolo 27 druhů a jsou členěny do 7 kladů. Z nich ochratoxin A mohou produkovat druhy *A. affinis*, *A. cretensis*, *A. fresenii*, *A. muricatus*, *A. occultus*, *A. ochraceopetaliformis*, *A. ochraceus*,

A. pseudoelegans, *A. pulvericola*, *A. roseoglobulosus*, *A. sesamicola*, *A. steynii* a *A. westerdijkiae*. Z těchto druhů byly na zrnech obilnin zjištěny druhy *A. ochraceus* a *A. westerdijkiae*.

Morfologie a fyziologie *Aspergillus ochraceus*

Kolonie na CYA při teplotě 25°C jsou po 7 dnech 3,8-4,7 cm velké, na okrajích bílé, uprostřed světle až krémové žluté, revers světle až tmavě hnědý. Kolonie na MEA při teplotě 25°C jsou po 7 dnech 3,6-4,2 cm velké, na okrajích bílé, uprostřed světle, krémové až šedivě žluté. Kolonie na CYA při teplotě 37°C jsou po 7 dnech 1,2-1,9 cm velké.

Konidiofory drsné, hyalinní až hnědě zbarvené, 400-2000 µm vysoké, konidiogenní hlavice kulovitá někdy protáhlá 34-65 µm široká, biseriátní, metuly pokrývají celý povrch hlavice, konidiogenní buňky typu fialida, 9-11,5 x 2,5-4 µm. Konidie skorokulovité až kulovité, drsné, 2,5-4,0 µm.

Tento druh se udává, že se vyskytuje na různých druzích rostlin, včetně obilovin a v půdě. Byl izolován nejen v Evropě, vč. České republiky, ale i dalších částech světa.

Aspergillus ochraceus produkuje mykotoxiny ochratoxiny, kyselinu penicilinovou a xanthomegniny (VISAGIE ET AL. 2014, FRISVAD ET AL 2004).

V roce 2004 byl popsán blízký druh *A. westerdijkiae* a poté (2014) další příbuzné druhy. Do kladu *A. ochraceus* patří druhy *A. melleus*, *A. ochraceus*, *A. ostianus*, *A. pallidofulvus*, *A. sesamicola*, *A. westerdijkiae* a vzhledově nejbližšími druhy k *A. ochraceus* jsou *A. westerdijkiae* a pak *A. melleus*, *A. pallidofulvus*, *A. ostianus* a *A. roseoglobulosus*. *A. ochraceus* roste při teplotě 33°C rychleji než *A. westerdijkiae*, na mediu DG18 má olivový revers. Rozlišení uvedených druhů pomocí morfologických znaků je obtížné a z tohoto důvodu údaje o výskytu *A. ochraceus* z předchozích let je potřeba brát s opatrností. (VISAGIE ET AL. 2014, FRISVAD ET AL 2004, DOMSCH ET AL. 2007, SAMSON ET AL. 2004).

Morfologie a fyziologie *Aspergillus westerdijkiae* Frisvad & Samson

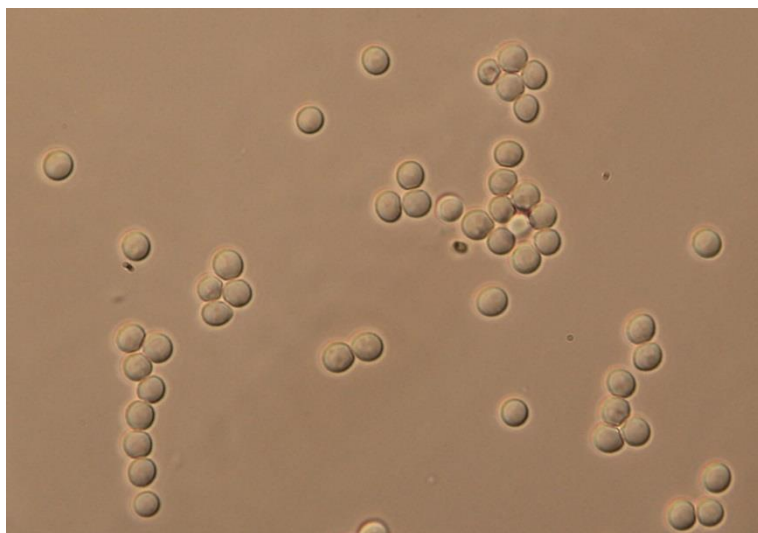
Kolonie na CYA při teplotě 25°C jsou po 7 dnech 4,9-5,5cm velké, na okrajích bílé, uprostřed lehce až světle až krémové žluté, revers světle až tmavě hnědý. Kolonie na MEA při teplotě 25°C jsou po 7 dnech 3,8-4,4 cm velké, na okrajích bílé, uprostřed světle až šedivě žluté. Kolonie na CYA při teplotě 37°C jsou po 7 dnech 0-0,5 cm velké (VISAGIE ET AL. 2014, FRISVAD ET AL 2004).

Konidiofory drsné, hyalinní, žlutě až hnědě zbarvené, 260-1200 µm vysoké, konidiogenní hlavice kulovitá někdy až lopatkovitá 22-75 µm široká, biseriátní, metuly pokrývají celý povrch hlavice, konidiogenní buňky typu fialida, 9-11,5 x 2,5-4 µm. Konidie skorokulovité až kulovité, jemně drsné až drsné, 2,5-4,0 µm (VISAGIE ET AL. 2014, FRISVAD ET AL 2004).

Tento druh se vyskytuje často na semenech různých rostlin (vč. obilovin) v mírném i tropickém pásmu. Byl izolován nejen v Evropě, ale i jiných částech světa (VISAGIE ET AL. 2014, FRISVAD ET AL 2004).

Aspergillus westerdijkiae produkuje mykotoxiny: ochratoxiny, kyselinu penicilinovou, xanthomegniny, viomellein a vioxanthin (VISAGIE ET AL. 2014, FRISVAD ET AL 2004).

Obrázek č. 5: *Aspergillus ochraceus* - konidie



Obrázek č. 6: *Aspergillus ochraceus* - konidiogenní hlavice

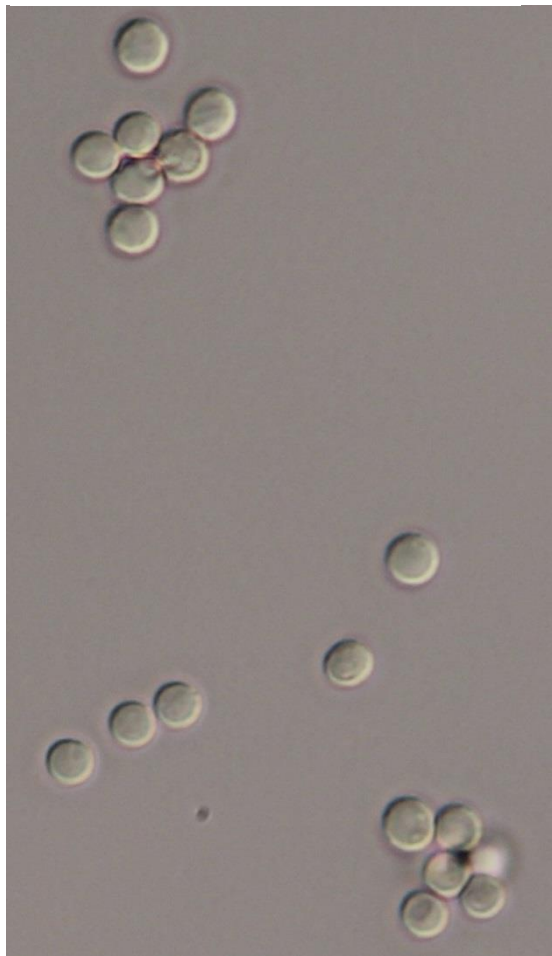


Obrázek č. 7: *Aspergillus ochraceus* - líč kolonie na sladínovém agaru pro *Penicillium* spp.



Obrázek č. 8: *Aspergillus ochraceus* - líč kolonie na CYA

Obrázek č. 9: *Aspergillus westerdijkiae* - konidie



Obrázek č. 10: *Aspergillus westerdijkiae* - konidiogenní hlavice



Obrázek č. 11: *Aspergillus westerdijkiae* - líč kolonie na sladínovém agaru pro *Penicillium* spp.



Obrázek č. 12: *Aspergillus westerdijkiae* - líč kolonie na CYA

PENICILLIUM VERRUCOSUM

Z druhů rodu *Penicillium* patřících do sekce *Fasciculata* produkují ochratoxin A druhy *P. verrucosum* a *P. nordicum*. Citrinin z této sekce produkují druhy *P. expansum*, *P. radicicola* a *P. verrucosum*. Druh *P. nordicum* se vyskytuje na sušeném masu, solených rybách, sýru a džemu. Druh *P. expansum* lze zaznamenat na ovoci a druh *P. radicicola* na zelenině (mrkev, cibule) a bramborách. Pouze druh *P. verrucosum* se vyskytuje na obilovinách.

Morfologie a fyziologie *Penicillium verrucosum* Dierckx

Kolonie na CYA při teplotě 25°C jsou po 7 dnech 1,0-2,5 cm velké, ostře ohraničené, na okraji bílé, uprostřed zelené, reverz krémový až žlutohnědý. Kolonie na MEA při teplotě 25°C jsou po 7 dnech 1,0-2,2 cm velké, ostře ohraničené, na okraji bílé, uprostřed zelené, reverz hnědorezavý. Na CYA při teplotě 37°C neroste.

Konidiofory drsné, terverticilátní, stěsnané, 200-450 µm vysoké. Konidiogenní buňky typu fialida, 7-9 x 2 – 3 µm. Konidie skorokulovité až kulovité, hladké až drsné, 2,5-3,5 µm.

Tento druh se vyskytuje na obilovinách (ječmen, pšenice, žito, oves) a někdy sýru v mírném pásmu. Byl izolován nejen v Evropě ale i Severní Americe. (Domsch *et al.* 2007, Samson *et al.* 2004).

P. verrucosum produkuje citrinin a ochratoxin A, ale také látky, které mají herbicidní účinky (verrucolony, pestalotiny) (FRISVAD *ET AL.* 2004).

PENICILLIUM CITRINUM

Z druhů rodu *Penicillium* patřících do sekce *Citrina* produkuje citrinin 16 druhů, a to *P. christenseniae*, *P. chrysosporium*, *P. citrinum*, *P. cosmopolitanum*, *P. godlewskii*, *P. gorlenkoanum*, *P. hetheringtonii*, *P. manginii*, *P. nothofagi*, *P. pancosmium*, *P. raphiae*, *P. ubiquetum*, *P. vancouverense*, *P. waksmanii*, *P. wellingtonense* a *P. westlingii*. Část z těchto druhů je známa z tropických oblastí a většina byla zaznamenána z půdy. V obilovinách byl zjištěn pouze druh *P. citrinum*.

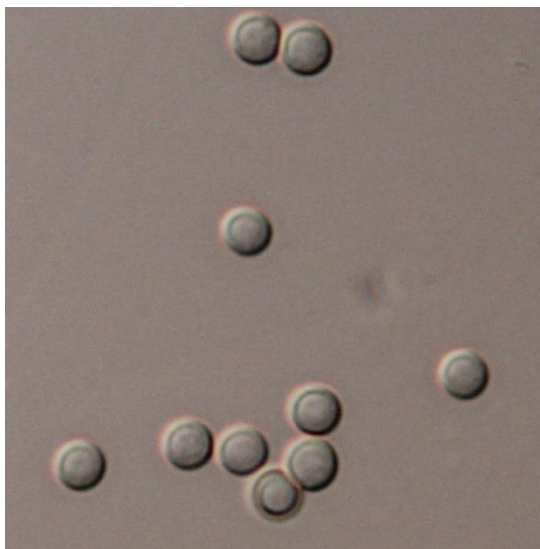
Morfologie a fyziologie *Penicillium citrinum* Thom

Kolonie na CYA při teplotě 25°C jsou po 7 dnech 2,7-3,3 cm velké, na okraji bílé, uprostřed modro-šedivo-zelené, reverz žlutohnědý, pigment v mediu žlutý. Kolonie na MEA při teplotě 25°C jsou po 7 dnech 1,8-2,5 cm velké, na okraji bílé, uprostřed šedě zelené, reverz hnědorezavý. Na CYA po 7 dnech při teplotě 37°C jsou kolonie 2-12 mm velké.

Konidiofory hladké, většinou biverticilátní, stěsnané, 100-300 µm vysoké. Konidiogenní buňky typu fialida, 7,5-10 x 2-2,5 µm. Konidie skorokulovité až kulovité, hladké, 2,0-2,5 µm.

Tento druh se vyskytuje více v (sub)tropickém pásmu než v mírném pásmu, a to v půdě, vzduchu, uvnitř budov a v potravinách. Byl izolován nejen v Evropě ale i z jiných částí světa. *P. citrinum* produkuje mycotoxin citrinin (DOMSCH *ET AL.* 2007, HOUBRAKEN *ET AL.* 2011, SAMSON *ET AL.* 2004).

Obrázek č. 13: *Penicillium verrucosum* - konidie



Obrázek č. 14: *Penicillium verrucosum* - konidiofory

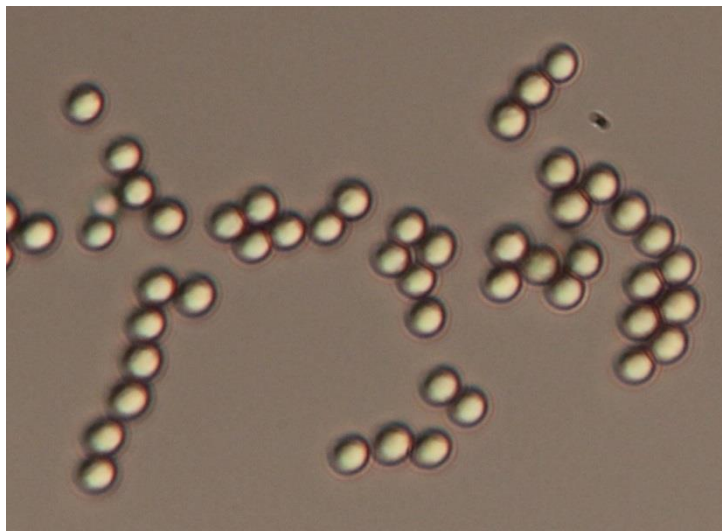


Obrázek č. 15: *Penicillium verrucosum* - bílé kolonie na sladinném agaru pro *Penicillium*

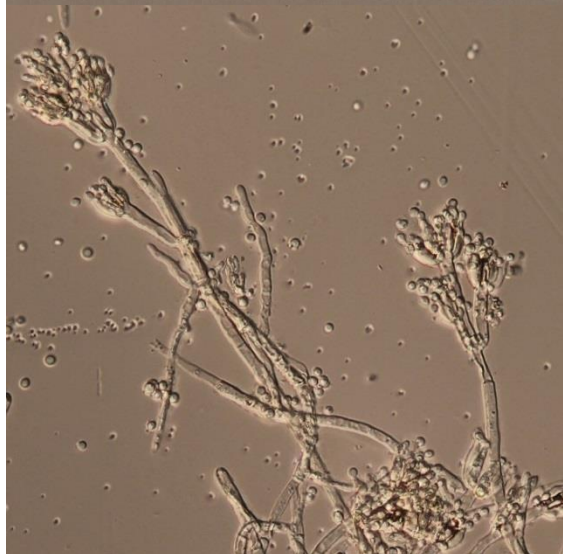


Obrázek č. 16: *Penicillium verrucosum* - červené kolonie na sladinném agaru pro *Penicillium*

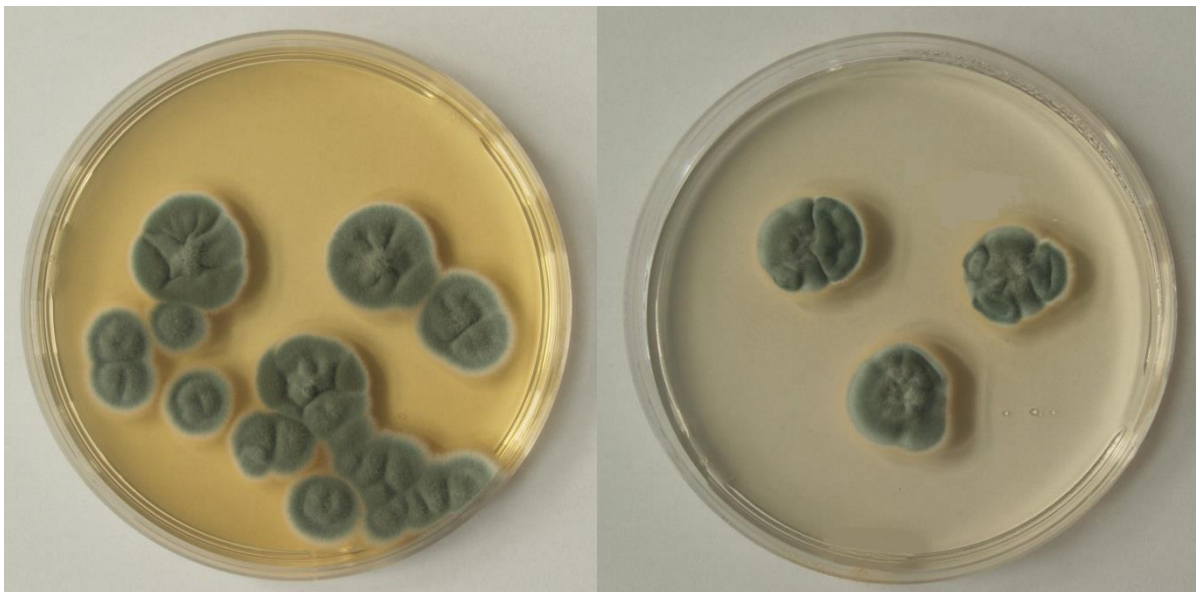
Obrázek č. 17: *Penicillium citrinum* - konidie



Obrázek č. 18: *Penicillium citrinum* - konidiofor



Obrázek č. 19: *Penicillium citrinum* - konidiofory



Obrázek č. 20: *Penicillium citrinum* - líč kolonie na sladínovém agaru pro *Penicillium*

Obrázek č. 21: *Penicillium citrinum* - líč kolonie na CYA

2.3. Detekce hub rodů *Aspergillus* a *Penicillium* molekulárními metodami

2.3.1. Podstata metody

Aspergillus niger, *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *Penicillium verrucosum* a *P. citrinum* jsou detekovány v zrnech obilovin. Ze zrna je extrahována celková DNA obsahující DNA zmíněných hub. Fragmenty DNA specifické pro tyto houby jsou namnoženy pomocí PCR. Produkty PCR jsou detekovány gelovou elektroforézou a barvením fluorescenčním barvivem ethidium bromidem.

2.3.2. Metodika vychází z literatury

DNeasy Plant Handbook, 10/2012 (www.qiagen.com); González-Salgado *et al.* (2005): FEMS Microbiology Letters, 245: 353-361; McKernan *et al.* (2015): F1000Research, 4: 1422; Morello *et al.* (2007): International Journal of Food Microbiology, 119, 270-276; Patiño *et al.* (2005): International Journal of Food Microbiology, 104: 207-214; Schmidt-Heydt *et al.* (2008): Food Additives & Contaminants, 25 (8): 989-996.

2.3.3. 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 kapalný dusík
- Homogenizátor
- Vodní lázeň nebo teplotní blok

Cykler pro PCR
UV transiluminátor
Chladnička (+ 4°C)
Mraznička (- 20°C) (případně hlubokomrazicí box - 80°C)
Digitální pipety 0,5 - 10 µl, 2 - 20 µl, 20 - 200 µl a 200 - 1000 µl
Dvě samostatné sady pipet: jedna pro extrakci 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)
Kapalný dusík
1,5 ml a 2,0 ml zkumavky Eppendorf
PCR zkumavky (podle typu cykleru pro PCR)
Váženky
Magnetická míchadla
Špičky k pipetám + krabičky (sterilní, prosté RNáz)
Špičky s filtrem k pipetám (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

dH₂O (destilovaná voda)
sdH₂O (sterilní destilovaná voda, např. PCR H₂O, kat. č. P042, Top Bio, s.r.o., Vestec, Česká republika)
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 MgCl₂ (např. kat. č. 501-050, GeneAll Biotechnology Co., Ltd., Songpa-gu, Republic of Korea)
Směs dNTP (např. kat. č. U1420, Promega, Madison, WI, USA)
Primery (syntetizované oligonukleotidy) (např. od Generi Biotech, s.r.o., Hradec Králové, Česká republika): tabulka 1
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. H5041, Promega, Madison, WI, 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 ₂ 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 ₂ O do 150 ml.	

Ethidium bromid

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

Ethidium bromid je látka, která se váže na šroubovici nukleových kyselin, kde pak pod UV-lampou (312 nm) intenzivně 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 pufry 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. R0611, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, 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 ₂ O do 10 ml	

Standard molekulové hmotnosti pro elektroforézu

např. GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (kat. č. SM0241, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), Lambda DNA/*Hind*III Marker (kat. č. SM0101, Thermo Fisher Scientific, MA, Waltham, USA)

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 ₂ O

Tabulka 1: Sekvence specifických oligonukleotidových primerů pro detekci a identifikaci hub schopných produkovat ochratoxin A a citrinin, očekávaná délka DNA fragmentu a původ primerů

Cílový druh	Název primerů	Sekvence (5'→3')	Délka amplikonu	Zdroj
<i>Aspergillus niger</i>	ITS1 NIG	TCCGTAGGTGAACCTGCGG CCGGAGAGAGGGGACGGC	420 bp	González-Salgado <i>et al.</i> , 2005
<i>Aspergillus ochraceus</i>	OCRA1 OCRA2	CTTCCTTAGGGGTGGCACAGC GTTGCTTTTCAGCGTCGGCC	400 bp	Patiño <i>et al.</i> , 2005
<i>Aspergillus westerdijkiae</i>	Bt2Aw-F Bt2Aw-R	TGATACCTTGCGCTTGTGACG CGGAAGCCTAAAAAATGAAGAG	347 bp	Morello <i>et al.</i> , 2007
<i>Penicillium citrinum</i>	PcF1 PcR1	GATTTTCCAAAATGCCGTCT GCTCAAGCATTAAGTTAGCTA	799 bp	Mc Kernan <i>et al.</i> , 2015
<i>Penicillium verrucosum</i>	pksCT-Mp-3_for pksCT-Mp-3_rev	CCAAGCGGCGGACAGTG TGCAGCAGGGGAAGTAGG	415 bp	Schmidt-Heydt <i>et al.</i> , 2007

2.3.4. Extrakce celkové DNA z rostlinných pletiv pomocí DNeasy Plant Mini Kit

Důležitá upozornění před začátkem extrakce:

- Všechny centrifugace provádíme při pokojové teplotě (15-25°C).
- Je-li to nutné, rozpustíme sraženiny v koncentrátech pufrů AP1 a AW1.
- Do koncentrátů pufrů AW1 a AW2 přidáme ethanol.
- Vodní lázeň nebo teplotní blok předehřejeme na 65°C.

1. Na analytických vahách odvážíme 20 mg rostlinného materiálu. V misce v kapalném dusíku důkladně vzorek rozdrtíme tloučkem. Jemný prášek přeneseme špachtlí do sterilní 2 ml zkumavky. Nedovolíme, aby vzorek roztál. Ihned pokračujeme krokem 2. Vzorky je také možné rozdrtit pomocí elektrického homogenizátoru (vibračního mlýnu), např. Mixer Mill

MM 400 (Retsch, Haan, SRN). Ke vzorku do zkumavky přidáme ocelovou kuličku (průměr 5 mm). Držák zkumavek pečlivě uzavřeme a upneme do čelistí homogenizátoru. Vzorky homogenizujeme 1 minutu při 30 kmitech za vteřinu.

2. K homogenátu přidáme 400 µl pufru AP1 a 4 µl RNázy A (zásobní roztok 100 mg/ml). Směs důkladně promícháme na vortexu a inkubujeme 10 minut 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 P3, 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 AW1 a směs jemně promícháme pipetou. Fialovou kolonku s usazeninou vyhodíme.

6 Pipetou přeneseme 650 µl směsi do bílé kolonky DNeasy Mini Spin Column umístěné ve 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 AW2. Centrifugujeme po dobu 1 minuty při 10 000 otáčkách. Vylijeme fázi prošlou kolonkou.

8 Přidáme dalších 500 µl promývacího pufru AW2. Centrifugujeme po dobu 2 minut při 14 000 otáčkách.

9 Kolonku se zachycenou DNA přeneseme do nových 1,5 ml zkumavek. Přímou membránu kolonky přidáme pipetou 100 µl predehřátého 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 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

2.3.5. Polymerázová řetězová reakce pro amplifikaci specifických sekvencí toxinogenních hub

Příprava pracovního prostoru

Pracovní plochy otřeme čerstvě připraveným 20% roztokem Sava a 70% denaturovaným 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 2.

Tabulka 2: Podmínky PCR s používanými primery

Název primerů	Reakční podmínky	MgCl ₂ (mM)	dNTPs (mM)	DNA polymeráza
ITS1 NIG	95°C 4 min; [95°C 30 s, 66°C 25 s, 72°C 40 s] x 25; 72 °C 5 min	2	0,2	1 U
OCRA1 OCRA2	95°C 4 min 30 s; [95°C 30 s, 63°C 30 s, 72°C 1 min] x 30; 72 °C 3 min	2	0,1	1 U
Bt2Aw-F Bt2Aw-R	95°C 5 min; [95°C 30 s, 62°C 30 s, 72°C 30 s] x 45; 72°C 5 min	2	0,2	1 U
PcF1 PcR1	95°C 2 min, [95°C 20 s, 55°C 10s, 72°C 30 s] x 35, 72°C 5 min	2	0,2	1 U
pksCT-Mp-3_for pksCT-Mp-3_rev	95°C 5 min; [95°C 30 s, 55°C 40 s, 72°C 30 s] x 35 72°C 5 min	3	0,1	1 U

Pracovní postup

1. Chemikálie potřebné pro PCR necháme roztát, jemně je promícháme a krátce centrifugujeme. Chemikálie uchováváme 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 sdH₂O a jedna zkumavka je určená pro pozitivní kontrolu (DNA z čisté kultury houby).
3. Do sterilní 1,5 ml zkumavky Eppendorf přidáme v daném pořadí jednotlivé složky reakční směsi (Tabulka 1). Celkový objem reakční směsi vypočítáme podle vzorce $V = V_1 \times (n + 1)$, kde V_1 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 24,0 µl do připravených 0,5 ml PCR zkumavek. Nejprve přidáme do kontroly premixu 1,0 µl sdH₂O, do každé další zkumavky pak přidáme 1,0 µl templátové DNA jednotlivých vzorků. Pozitivní kontrola (DNA houby) 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.

2.3.6. 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, použitém elektroforetickém pufru a na koncentraci agarózy v gelu. Ethidium bromid se naváže do DNA a při excitaci UV zářením vyzařuje oranžové fluorescenční světlo. Pro kontrolu velikosti dělení produktů PCR používáme délkový standard DNA.

Příprava agarózového gelu

Zásobní roztok 50x TAE pufru naředíme sdH₂O 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
40	1,5%	0,6	1-20
80	1,5%	1,2	více než 20

Pracovní postup

1. Ve váženice 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 zkumavky přidáme po proběhlé PCR 2,8 µl nanášecího pufru, 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 nanесeme 2,5 µl délkového standardu GeneRuler™ 100bp DNA Ladder. Do dalších drah nanášíme vždy 10 µl každého vzorku v pořadí od kontroly premixu po pozitivní kontrolu. Před nanášením 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 1,5% gel 3-5 V / cm vzdálenosti elektrod).
5. Elektroforéza probíhá 60 až 90 minut (Dokud barva orange G nedorazí na konec gelu.).
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 µg/ml). Gel necháme barvit 5 minut.
7. Obarvený gel si prohlédneme na UV transiluminátoru a dáme ho na 20 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 ampliconů jsou uvedeny v tabulce 1.

Výsledek

Pozitivním výsledkem je fluoreskující proužek ("band") odpovídající velikosti. Proužky porovnáme s velikostním standardem a pozitivní kontrolou. Negativní kontrola (voda) nesmí obsahovat žádný proužek. Pozitivní kontrola musí obsahovat proužek odpovídající velikosti (tab. 1). Jestliže tomu tak není, **test opakujeme**.

2.4. Závěr

Metodika detekce a identifikace 5 druhů toxinogenních hub z rodů *Aspergillus* a *Penicillium* založená na polymerázové řetězové reakci s druhově specifickými primery v zrnech obilovin se ukázala jako spolehlivou a vhodnou metodou pro zjištění přítomnosti uvedených mykotoxinogenních druhů. Nevýhodou této metody ve srovnání s klasickými metodami je její větší náročnost na přístrojové vybavení.

3. Srovnání novosti postupů

V předložené metodice jsou optimalizovány postupy spolehlivé detekce a identifikace druhů rodů *Aspergillus* a *Penicillium* pomocí druhově specifické PCR, která je méně odborně obtížná a časově náročná než diagnostika na základě standardních mykologických klíčů. Další předností je, že lze přítomnost hub zjistit už v časných fázích infekce.

Kromě původních vědeckých prací publikovaných především v anglickém jazyce, které obsahují dílčí výsledky výzkumu, nebyly kompletní metodické postupy diagnostiky těchto toxinogenních hub v češtině publikovány.

V metodice je nově zavedena kombinace detekce a identifikace toxinogenních hub rodů *Aspergillus* a *Penicillium* pomocí PCR s druhově specifickými primery s rychlou extrakcí celkové DNA ze zrn obilovin pomocí kitu DNeasy Plant Mini Kit od firmy Qiagen. Metoda extrakce DNA byla modifikována s cílem zlepšit spolehlivost a opakovatelnost detekce uvedených hub. Modifikace spočívá v použití automatického homogenizátoru a zařazení dalších centrifugací.

4. Popis uplatnění metodiky

Metodika je určena pro diagnostické laboratoře Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského a pro vědecká a výzkumná pracoviště zabývající se fytopatologií, skladováním rostlinných produktů a zdravotní a hygienickou nezávadností rostlinných produktů.

Metodika je uplatněna prostřednictvím firmy AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o. se kterou je uzavřena smlouva o uplatnění metodiky.

5. Ekonomické aspekty

Náklady na stanovení 5 druhů hub v 1 vzorku se pohybují klasickými i molekulárními technikami okolo 500 Kč. Používání metodiky však umožní zvýšit výkonnost diagnostické laboratoře a produktivitu práce v ní.

Vyčíslení neekonomických přínosů v penězích je velmi obtížné. Z pohledu ochrany zdraví spotřebitele je v současnosti hlavním celospolečenským přínosem metodiky snížení výskytu toxických látek produkovaných druhů rodu *Aspergillus* a *Penicillium* v obilí a nižší zatížení zdraví lidí a hospodářských zvířat mykotoxiny.

Používání molekulárních technik umožní eliminovat chyby, které vznikají při identifikaci hub pomocí kultivačních a následně mikroskopických metod.

Metodika je dobře rutinně aplikovatelná, přičemž analýza od přijetí vzorků do laboratoře, přes extrakci DNA až po samotné stanovení přítomnosti toxinogenních hub trvá pouze 2-3 dny. Časově nejnáročnějším krokem je extrakce celkové DNA z rostlinných pletiv. Vzhledem k obvyklé kapacitě centrifugy je jeden pracovník schopen extrahovat okolo 40 vzorků denně.

Zjištění přítomnosti toxinogenních hub už v časných fázích infekce umožní využít napadené obilí k jiným než potravinářským nebo krmným účelům, tak aby se mykotoxiny nedostávaly do potravního řetězce lidí a hospodářských zvířat.

6. Seznam použité literatury

- DOMSCH K. H. GAMS W. et ANDERSON T. H. (2007): Compendium of soil fungi. Second edition, Eching, 672 p.
- FRISVAD J. C., FRANK J. M., HOUBRAKEN J.A.M.P., A. F.A. KUIJPERS A. F.A. AND SAMSON R. A. (2004): New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. - *Studies in Mycology* 50: 23–43.
- FRISVAD J. C. AND SAMSON R. A. (2004): Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium* A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. - *Studies in Mycology* 49: 1–174
- FRISVAD J. C., SMEDSGAARD J., LARSEN T. O. AND SAMSON R. A. (2004) Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium* - *Studies in Mycology* 49: 201–241.
- GONZÁLEZ-SALGADO A., PATIÑO B., VÁZQUEZ C., GONZÁLEZ-JAÉN M. (2005): Discrimination of *Aspergillus niger* and other *Aspergillus* species belonging to section *Nigri* by PCR assay. *FEMS Microbiology Letters*, 245: 353-361.
- HOUBRAKEN J., FRISVAD J.C. AND SAMSON R.A. (2011): Taxonomy of *Penicillium* section *Citrina* - *Studies in Mycology* 70: 53–138.
- MCKERNAN K, SPANGLER J, ZHANG L TADIGOTLA V., HELBERT Y., FOSS T., SMITH. D.R. (2015): *Cannabis* microbiome sequencing reveals several mycotoxic fungi native to dispensary grade *Cannabis* flowers [version 1; referees: 1 approved, 1 approved with reservations] *F1000Research*, 4: 1422 (doi: 10.12688/f1000research.7507.1)

- MORELLO, L.G.; SARTORI, D.; MARTINEZ, A.L.O.; CARNEIRO VIEIRA, M.L.; TANIWAKI, M.H.; PELEGRINELLI, FUNGARO, M.H. (2007): Detection and quantification of *Aspergillus westerdijkiae* in coffee beans based on selective amplification of β -tubulin gene by using real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 270–276.
- PATIÑO B., GONZÁLEZ-SALGADO A., GONZÁLEZ-JAÉN M.T., VÁZQUEZ C. (2005): PCR detection assays for the ochratoxin-producing *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* species. *International Journal of Food Microbiology*, 104: 207-214.
- SAMSON R.A., HOEKSTRA E.S. AND FRISVAD J. C. (EDS.) (2004): Introduction to food – and airborne fungi – 389 p., Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- SCHMIDT-HEYDT M, RICHTER W, MICHULEC M, BUTTINGER G, GEISEN R (2008): A comprehensive molecular system to study presence growth and ochratoxin A biosynthesis of *P. verrucosum* in wheat. *Food Additives & Contaminants*, 25 (8): 989-996.
- VARGA J., FRISVAD J., KOCSUBÉ S., BRANKOVICS B., TÓTH B., SZIGETI G. AND SAMSON R. (2011): New and revisited species in *Aspergillus* section Nigri. *Studies in Mycology*: 69:1-17.
- VISAGIE C. M., VARGA J., HOUBRAKEN J., MEIJER M., KOCSUBÉ S., YILMAZ N., FOTEDAR R., SEIFERT K. A., FRISVAD J. C. AND SAMSON R. A. (2014): Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section Circumdati) - *Studies in Mycology* 78: 1–61.
- FUNGARO M. H. P. AND SARTORI D. (2009): An Overview on Molecular Markers for Detection of Ochratoxigenic. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, (52, special no.): 1-9.

7. Seznam publikací, které předcházejí metodice

- CAPOUCHOVÁ I., KOSTELANSKÁ M., ERHARTOVÁ D., PROKINOVÁ E., HAJŠLOVÁ J. ŠKEŘÍKOVÁ A., SALAVA J., PAZDERŮ K. (2011): Rizika výskytu fuzarióz pro produkci bioetanolu z pšenice. *Listy cukrovarnické a řepařské*, 127 (3): 95-99.
- CHRPVÁ J., ŠÍP V., SUMÍKOVÁ T., SALAVA J., PALICOVÁ J., ŠTOČKOVÁ L., DŽUMAN Z., HAJŠLOVÁ J. (2016): Occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in wheat grain collected in the Czech Republic. *World Mycotoxin Journal*, 9 (2): 317-327.
- NEDĚLNÍK J., MORAVCOVÁ H., HAJŠLOVÁ J., LANCOVÁ K., VÁŇOVÁ M. AND SALAVA J. (2007): *Fusarium* spp. in wheat grain in the Czech Republic analysed by PCR method. *Plant Protection Science*, 43 (4): 135-137.
- PAPOUŠKOVÁ L., CAPOUCHOVÁ I., KOSTELANSKÁ M., ŠKEŘÍKOVÁ A., PROKINOVÁ E., HAJŠLOVÁ J., SALAVA J., FAMĚRA O. (2011): Changes in baking quality of winter wheat with different intensity of *Fusarium* spp. contamination detected by means of new rheological system Mixolab. *Czech Journal of Food Sciences*, 29 (4): 420-429.
- 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): 521-524.
- SUMÍKOVÁ T., CHRPVÁ J., DŽUMAN Z., SALAVA J., ŠTĚRBOVÁ L., PALICOVÁ J., SLAVÍKOVÁ P., STRÁNSKÁ-ZACHARIÁŠOVÁ M., HAJŠLOVÁ J. (2017): Mycotoxins content and its

association with changing patterns of *Fusarium* pathogens in wheat in the Czech Republic. World Mycotoxin Journal, 10 (2): 143-151.

Autoři: Doc. Dr. Ing. Jaroslav Salava a RNDr. David Novotný, Ph.D.

Název: Metodika detekce a identifikace hub odpovědných za kontaminaci obilovin ochratoxinem A a citrininem pomocí PCR

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 507/73, 161 06 Praha 6 - Ruzyně

Náklad: 20 výtisků

Metodika je veřejně přístupná na adrese www.vurv.cz.

Vyšlo v roce 2018.

Vydáno bez jazykové úpravy.

Metodika je poskytována bezplatně.

Kontakt na autora: salava@vurv.cz

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

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2018

ISBN: 978-80-7427-269-1