

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2019

Blanka Kyrlová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Toxinogenní plísně rodu *Fusarium* v ječmeni  
Blanka Kyrlová

Diplomová práce  
2019

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2018/2019

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Blanka Kyrálová**  
Osobní číslo: **C16612**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**  
Název tématu: **Toxinogenní plísň rodu *Fusarium* v ječmeni**  
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

#### Teoretická část:

Vypracujte literární rešerši cílenou na problematiku, zaměřte se na výskyt plísni rodu *Fusarium* v ječmeni a jiném obilí.

Zaměřte se na produkci a analýzu trichothecenových mykotoxinů.

#### Experimentální část:

Optimalizujte multiplex PCR, pro detekci genu kódujícího produkci trichothecenových mykotoxinů a genu kódující rod *Fusarium*.

Pokuste se zoptimalizovat PCR pro druhovou identifikaci rodu *Fusarium*.

Z různých vzorků ječmene a sladu izolujte a identifikujte plísň rodu *Fusarium*.

Pokuste se zavést metodu HPLC/MS pro detekci a kvantifikaci trichothecenových mykotoxinů.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucí práce.**

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Iveta Brožková, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce:

**doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce:

**5. února 2019**

Termín odevzdání diplomové práce:

**9. května 2019**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.

prof. Ing. Karel Ventura, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012 Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Bc. Blanka Kyrlová

Na tomto místě bych ráda poděkovala Ing. Ivetě Brožkové, Ph.D. za vedení a věcné připomínky v průběhu sepisování práce a doc. Lence Česlové, Ph. D. za pomoc se zpracováním analytické části.

Mé poděkování dále patří Mgr. Tomáši Valachovi a Kamile Leščišínové za to, že se vždy s velkou ochotou postarali o rostlinky karafiátů po pobu mé nepřítomnosti.

## **ANOTACE**

Diplomová práce představuje multiplexní metodu polymerázové řetězové reakce pro specifickou detekci rodu *Fusarium* spolu s průkazem *Tri5* genu, klíčového pro produkci trichothecenových mykotoxinů. Dále uvádí metody druhové identifikace fuzárií, se zaměřením na *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. langsethiae* a *F. tricinctum*. Optimální metody jsou využity pro hodnocení výskytu plísni rodu *Fusarium* ve vzorcích ječmene. Poslední část je věnována detekci vybraných trichothecenových mykotoxinů pomocí HPLC/MS.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

plísně, rod *Fusarium*, identifikace plísni, fuzarióza klasů, analýza mykotoxinů

## **TITLE**

Toxigenic *Fusarium* species in barley

## **ANNOTATION**

The diploma thesis deals with the multiplex polymerase chain reaction for specific detection of fungi genus *Fusarium* with the detection of *Tri5* gene that is required for trichothecene biosynthesis. The thesis includes the species-specific detection of *Fusarium* and is focused on *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. langsethiae* and *F. tricinctum*, which occurrence are evaluated in barley. The last part of thesis achieves the goal of the detection of the selected trichothecene mycotoxins with HPLC/MS.

## **KEYWORDS**

molds, genus *Fusarium*, identification of molds, Fusarium head blight, analysis of mycotoxins

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>14</b>
<b>1 TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1 Plísně rodu <i>Fusarium</i></b> .....	<b>15</b>
<b>1.2 Fuzarióza klasů</b> .....	<b>15</b>
<b>1.3 Fytopatogenní druhy rodu <i>Fusarium</i></b> .....	<b>16</b>
1.3.1 <i>Fusarium graminearum</i> .....	16
1.3.2 <i>Fusarium culmorum</i> .....	17
1.3.3 <i>Fusarium tricinctum</i> / <i>Fusarium avenaceum</i> / <i>Fusarium arthrosporioides</i> .....	18
1.3.4 <i>Fusarium poae</i> / <i>Fusarium sporotrichioides</i> / <i>Fusarium langsethiae</i> .....	19
1.3.5 <i>Fusarium equiseti</i> .....	20
<b>1.4 Identifikace plísní rodu <i>Fusarium</i></b> .....	<b>20</b>
1.4.1 Identifikace na základě morfologických znaků.....	21
1.4.2 Identifikace pomocí polymerázové řetězové reakce.....	22
1.4.3 Druhově specifická identifikace.....	23
<b>1.5 Trichothecenové mykotoxiny</b> .....	<b>25</b>
1.5.1 Geny syntézy trichothecenů.....	27
1.5.2 Maskované mykotoxiny.....	30
<b>1.6 Analýza mykotoxinů</b> .....	<b>30</b>
<b>1.7 Inhibice fuzárií a snižování obsahu mykotoxinů v konečném produktu</b> .....	<b>32</b>
<b>2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>35</b>
<b>2.1 Přístroje a pomůcky</b> .....	<b>35</b>
<b>2.2 Materiál</b> .....	<b>35</b>
<b>2.3 Použité sbírkové kmeny plísní</b> .....	<b>35</b>
<b>2.4 Chemikálie</b> .....	<b>37</b>
<b>2.5 Použité pufry</b> .....	<b>37</b>
<b>2.6 Příprava a složení kultivačních médií</b> .....	<b>38</b>
2.6.1 Karafiátový agar (CLA).....	38
2.6.2 Speciální nutričně-chudý agar (SNA).....	38
2.6.3 Bramboro-glukózový agar (PDA).....	39
2.6.4 Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC agar).....	39
2.6.5 Dichloran Glycerol Medium Base (DG18).....	40
2.6.6 Sladinový agar (MALT agar).....	40
2.6.7 Bramboro-glukózový bujon (PD bujon).....	40
2.6.8 Sladinový bujon (MALT bujon).....	41
2.6.9 Rýže pro produkci mykotoxinů.....	41
2.6.10 Fyziologický roztok s peptonem.....	41
<b>2.7 Pracovní postupy</b> .....	<b>41</b>



2.7.1	Stanovení celkového počtu plísni a izolace rodu <i>Fusarium</i> .....	41
2.7.2	Identifikace na základě makroskopických a mikroskopických znaků .....	42
2.7.3	Izolace DNA .....	42
2.7.4	Optimální podmínky PCR a příprava reakčních směsí .....	43
2.7.5	Identifikace rodu <i>Fusarium</i> a průkaz <i>Tri5</i> genu .....	44
2.7.6	Identifikace <i>F. avenaceum/tricinatum</i> , <i>F. graminearum</i> a <i>F. sporotrichioides</i> .....	45
2.7.7	Identifikace <i>F. poae</i> a <i>F. langsethiae</i> .....	45
2.7.8	Specifická identifikace <i>F. tricinctum</i> .....	46
2.7.9	Elektroforetická separace produktů PCR.....	46
2.7.10	Produkce a extrakce mykotoxinů.....	46
2.7.11	Analýza mykotoxinů.....	47
<b>3</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>49</b>
<b>3.1</b>	<b>Stanovení celkového počtu plísni a izolace rodu <i>Fusarium</i> .....</b>	<b>49</b>
<b>3.2</b>	<b>Identifikace na základě morfologických znaků .....</b>	<b>50</b>
<b>3.3</b>	<b>Optimalizace PCR podmínek.....</b>	<b>52</b>
3.3.1	Identifikace plísni rodu <i>Fusarium</i> a průkaz <i>Tri5</i> genu.....	52
3.3.2	Identifikace <i>F. avenaceum/tricinatum</i> , <i>F. graminearum</i> a <i>F. sporotrichioides</i> .....	54
3.3.3	Identifikace <i>F. poae</i> a <i>F. langsethiae</i> .....	55
3.3.4	Specifická identifikace <i>F. tricinctum</i> .....	55
<b>3.4</b>	<b>Identifikace plísni rodu <i>Fusarium</i> a ověření přítomnosti <i>Tri5</i> genu .....</b>	<b>56</b>
<b>3.5</b>	<b>Hodnocení vzorků ječmene z hlediska plísni rodu <i>Fusarium</i> .....</b>	<b>62</b>
<b>3.6</b>	<b>Optimalizace podmínek HPLC/MS pro detekci mykotoxinů .....</b>	<b>64</b>
<b>3.7</b>	<b>Analýza mykotoxinů .....</b>	<b>67</b>
<b>4</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>70</b>
<b>4.1</b>	<b>Izolace plísni rodu <i>Fusarium</i> .....</b>	<b>70</b>
<b>4.2</b>	<b>Optimalizace podmínek PCR.....</b>	<b>72</b>
<b>4.3</b>	<b>Identifikace plísni rodu <i>Fusarium</i> a ověření přítomnosti <i>Tri5</i> genu .....</b>	<b>74</b>
<b>4.4</b>	<b>Hodnocení vzorků ječmene z hlediska výskytu plísni rodu <i>Fusarium</i> .....</b>	<b>75</b>
<b>4.5</b>	<b>Optimalizace podmínek HPLC/MS pro detekci mykotoxinů .....</b>	<b>78</b>
<b>4.6</b>	<b>Analýza mykotoxinů .....</b>	<b>79</b>
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>81</b>
<b>6</b>	<b>CITOVANÁ LITERATURA .....</b>	<b>82</b>
<b>7</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>93</b>

## SEZNAM ILUSTRACÍ, TABULEK A GRAFŮ

Obrázek 1 Mikroskopické znaky rodu <i>Fusarium</i> .....	22
Obrázek 2 Pozice ITS regionu fungální rDNA.....	23
Obrázek 3 Syntéza trichothecenů skupiny A.....	28
Obrázek 4 Syntéza trichothecenů skupiny B.....	29
Obrázek 5 II. ředění vzorku č. 23 na DG18 po kultivaci 7 dní při 25 °C.....	49
Obrázek 6 Kontaktní metoda izolace.....	50
Obrázek 7 Mikroskopické znaky izolátů rodu <i>Fusarium</i> .....	51
Obrázek 8 Rozdílné makroskopické znaky na PDA.....	52
Obrázek 9 Optimalizované podmínky amplifikace úseku ITS a průkaz <i>Tri5</i> genu.....	54
Obrázek 10 Optimalizované podmínky PCR pro druhovou identifikaci.....	55
Obrázek 11 Optimální podmínky PCR pro identifikaci <i>F. tricinctum</i> .....	56
Obrázek 12 Mikroskopické znaky <i>F. poae</i> CCM F-584, reklasifikované na <i>F. sporotrichioides</i> .....	58
Obrázek 13 Mikroskopické znaky izolátů rodu <i>Fusarium</i> .....	62
Obrázek 14 HPLC/MS separace mykotoxinů.....	65
Obrázek 15 HPLC/MS separace mykotoxinů.....	66
Obrázek 16 HPLC/MS separace mykotoxinů.....	66
Obrázek 17 Finální separace mykotoxinů.....	67
Tabulka 1 Sekvence primerů pro identifikaci více než jednoho druhu fuzária.....	25
Tabulka 2 Přehled důležitých trichothecenových mykotoxinů v EU.....	26
Tabulka 3 Sekvence použitých primerů.....	36
Tabulka 4 Použité kmeny plísňí.....	36
Tabulka 5 Složení pufrů.....	37
Tabulka 6 Optimální podmínky multiplex PCR pro identifikaci rodu <i>Fusarium</i> a průkaz <i>Tri5</i> genu.....	44
Tabulka 7 Optimální podmínky multiplex PCR pro identifikaci <i>F. avenaceum/tricinctum</i> , <i>F. graminearum</i> a <i>F. sporotrichioides</i> .....	45
Tabulka 8 Optimální podmínky multiplex PCR pro identifikaci <i>F. poae</i> a <i>F. langsethiae</i> .....	45
Tabulka 9 Optimální podmínky PCR pro identifikaci <i>F. tricinctum</i> .....	46
Tabulka 10 Parametry pro přímou infuzi analytů do hmotnostního spektrometru.....	47
Tabulka 11 Optimální podmínky pro HPLC/MS analýzu.....	48
Tabulka 12 Retenční časy, sledované adukty a deklasterační potenciály analyzovaných mykotoxinů.....	48
Tabulka 13 Amplifikace úseku ITS a průkaz <i>Tri5</i> genu.....	57
Tabulka 14 Výsledky identifikace suspektních izolátů a průkaz <i>Tri5</i> genu.....	59
Tabulka 15 Výsledky identifikace členů <i>F. tricinctum</i> species komplex.....	61
Tabulka 16 Druhová identifikace plísňí rodu <i>Fusarium</i> v jednotlivých vzorcích ječmene.....	64
Tabulka 17 Intenzity pík mykotoxinů po kultivaci <i>F. sporotrichioides</i> na různých médiích.....	68
Tabulka 18 Intenzity pík mykotoxinů po kultivaci <i>F. graminearum</i> CCF-1626 na různých médiích.....	68

Graf 1 Počet izolovaných druhů plísni rodu <i>Fusarium</i> z jednoho vzorku ječmene. ....	63
Graf 2 Zastoupení jednotlivých druhů izolovaných z 27 vzorků ječmene. ....	63
Graf 3 Produkce mykotoxinů kmene <i>F. sporotrichioides</i> na různých médiích. ....	69
Graf 4 Produkce mykotoxinů kmene <i>F. graminearum</i> CCF-1626 na různých médiích. ....	69

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

15-ADON – 15-acetyldeoxynivalenol

3-ADON – 3-acetyldeoxynivalenol

aw – Aktivita vody (water activity)

CE – Kolizní energie

CLA – Karafiátový agar (Carnation Leaves Agar)

CXP – Výstupní potenciál kolizní cely

ČR – Česká republika

D3G – Deoxynivalenol-3-glukosid

DG18 – Dichloran Glycerol Medium Base

DMSO – Dimethylsulfoxid

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

dNTP – Deoxyribonukleotid

DON – Deoxynivalenol

DP – Deklasterační potenciál

DRBC – Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar

EDTA – Kyselina ethylendiamintetraoctová

ELISA – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ESI – Ionizace elektrosprejem

ESI<sup>-</sup> – Ionizace elektrosprejem při snímání záporných iontů

ESI<sup>+</sup> – Ionizace elektrosprejem při snímání kladných iontů

EU – Evropská Unie

*F.* – *Fusarium*

GC – Plynová chromatografie

HPLC – Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-performance Liquid Chromatography)

IGEPAL CA-630 – Oktylfenoxy poly(ethylenoxy)etanol

ITS – Internal transcribed spacer

KTJ – Kolonie tvořících jednotky

LC-MS/MS – Kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií

MALT Agar – Sladinový agar

MALT bujon – Sladinový bujon

MF – Mobilní fáze

MRM – Monitorování specifických přechodů (Multiple Reaction Monitoring)

MS – Hmotnostní spektrometrie

NIV – Nivalenol

pb. – Párů bází

PCR – Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)

PD bujon – Bramboro-glukózový bujon

PDA – Bramboro-glukózový agar (Potato Dextrose Agar)

QuEChERS – Rychlý, jednoduchý, levný, efektivní, robustní a bezpečný (Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe)

rDNA – Ribozomální DNA

SCAR – Amplifikovaná oblast charakterizovaná sekvencí (Sequence Characterized Amplified Region)

SIM – Selektivní záznam iontu (Selected Ion Monitoring)

SNA – Speciální nutričně-chudý agar (Spezieller Nährstoffarmer Agar)

TBE – TRIS-borátový pufr s EDTA

TDI – Tolerovatelný denní příjem (Tolerable Daily Intake)

TPFE – Polytetrafluorethylen

TRIS – Tris(hydroxymethyl)aminomethan

USA – Spojené státy americké

UV – Ultrafialové záření (Ultraviolet)

ZON – Zearalenon

## ÚVOD

Ječmen setý (*Hordeum vulgare*) patří celosvětově k nejvíce pěstovaným obilninám. Jeho sklizeň na našem území v roce 2018 dosáhla hodnoty 1 606 tisíc tun, což je druhé nejvyšší množství po pšenici seté. Většina sklizně se využívá ke krmným účelům a zhruba 30 % je zpracováno na výrobu sladu.

Výnosnost a kvalita sklizeného zrna může být negativně ovlivněna plísněmi rodu *Fusarium*, způsobujícími onemocnění zvané fuzarióza klasů. Většina těchto plísní je schopna produkce sekundárních toxických metabolitů (mykotoxinů), které mají negativní účinky na zdraví zvířat a lidí. Jednu z hlavních skupin tvoří trichotheceenové mykotoxiny, jejichž metabolity je možné detekovat v konečném produktu po zpracování, např. v pivu. Primární produkty rodu *Fusarium* (hydrofobiny), jsou mimo jiné příčinou přepěňování piva, fenoménu, známého také jako gushing.

Snížení výskytu plísní rodu *Fusarium* a produkci mykotoxinů lze ovlivnit pouze částečně. K jedné z mnoha posklizňových strategií patří sledování přítomnosti jednotlivých druhů fuzárií v obilovinách, stejně jako detekce a kvantifikace mykotoxinů. Tyto údaje pomáhají porozumět reakcím těchto plísní na vnější faktory prostředí a mohou sloužit k předpovědi intenzity jejich výskytu nebo odhadovat riziko kontaminace obilovin mykotoxiny. Mimo jiné přispívají k hledání nových opatření a postupů pro ochranu obilovin před napadením plísněmi rodu *Fusarium*.

Cílem práce je zoptimalizovat metodu multiplexní polymerázové řetězové reakce pro detekci plísní rodu *Fusarium* spolu s průkazem *Tri5* genu, který je jedním z genů klíčových v biochemické cestě syntézy trichotheceenových mykotoxinů. Dále uvést metody pro druhovou identifikaci vybraných fytopatogenních druhů rodu *Fusarium* a zhodnotit vzorky ječmene z hlediska jejich výskytu. Posledním cílem je zavedení metody detekce a kvantifikace trichotheceenových mykotoxinů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Plísně rodu *Fusarium*

Plísně rodu *Fusarium* (*F.*) patří k celosvětově rozšířeným a všudypřítomným půdním saprofytickým mikroorganismům se schopností růstu na široké škále substrátů (Okungbowa a Shittu, 2012). Z hlediska taxonomie patří do říše *Fungi*, oddělení *Ascomycota*, třídy *Sordariomycetes*, podtřídy *Hypocreomycetidae*, řádu *Hypocreales* a čeledi *Nectriaceae* (Taheri, 2018; Aoki *et al.*, 2014; Havránková a Ovesná, 2012). Celý rod do sebe zahrnuje nejméně 300 fylogeneticky rozdílných druhů, dělených do 20 druhových komplexů a 9 monotypických linií (O'Donnell *et al.*, 2015; Van Diepeningen *et al.*, 2014). Stejně jako ostatní houby se i fuzária vyznačují genetickou rozmanitostí (Ramdial *et al.*, 2017; Kulik, 2008), která svědčí o dobré schopnosti adaptace na měnící se podmínky prostředí (Ramdial *et al.*, 2017).

V přírodě mohou zastávat roli parazitů, endofytů nebo patogenů rostlin (Wenda – Plesik *et al.*, 2017; Aoki *et al.*, 2014; Leslie a Summerell, 2006). Fytopatogeny jsou z velké části situovány do 4 genetických komplexů a jejich výskyt je závislý na klimatických podmínkách prostředí (Aoki, *et al.*, 2014). Fuzária způsobují řadu onemocnění tím, že napadají kořenový systém, stonky nebo semena různých druhů rostlin (Wenda – Plesik *et al.*, 2017; Dweba *et al.*, 2017). Mimo jiné mohou infikovat klasy obilovin s následkem snížení výnosnosti dané plodiny a kontaminace zrna mykotoxiny (Aoki *et al.*, 2014), které tak vstupují do potravinového řetězce (Okungbowa a Shittu, 2012).

## 1.2 Fuzarióza klasů

Fuzarióza klasů (*Fusarium head blight*) je celosvětově rozšířené onemocnění postihující běžně pěstované obiloviny, jako je pšenice (*Triticum* spp.), ječmen (*Hordeum vulgare*), rýže (*Secale cereale*), oves (*Avena sativa*), triticales (*x Triticosecale*) (Wegulo *et al.*, 2015) a kukuřice (*Zea mays*) (Dweba *et al.*, 2017). Zejména pěstování pšenice a ječmene je díky fuzariózám zatíženo značnými ekonomickými ztrátami (Wegulo *et al.*, 2015). Za původce tohoto onemocnění je považováno zhruba 18 druhů fuzárií (Davari *et al.*, 2012). V evropských zemích je nejčastěji zapříčiněno druhy *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, a také *F. poae*, *F. tricinctum*, *F. sporotrichioides*, *F. equiseti* a *F. langsethiae* (Nicolaisen *et al.*, 2009).

Infekce začíná kontaminací klasu hostitelské plodiny sporami, z nichž se během klíčení vytváří hyfy, které přechází do rostlinných pletiv (Terzi *et al.*, 2014). V případě pšenice plíseň přechází do vřetena klasu, způsobí jeho zblednutí, které se od počátečního místa infekce šíří do dalších klásků. Vlivem rozdílné stavby klasu ječmene v porovnání s klasem pšenice se příznaky napadeného ječmene liší, neboť infekce klásku je lokalizovaná a k šíření do vřetena klasu

nedochází (Janssen *et al.*, 2018; Matny, 2015). Příznaky onemocnění tak nejsou často zcela viditelné nebo jsou zaměnitelné s jinou chorobou. Nicméně, napadený ječmen lze poznat dle nekrotických nebo bílých skvrn klásku a barevných změn zrn, které mohou být žluto-hněděného, oranžového, hnědé, růžového až červeného zbarvení. Na zrnech mohou být v některých případech pozorovány černé tečky, mycelium nebo spory plísni (Janssen *et al.*, 2018).

Zdrojem spor, které jsou šířeny větrem a vodou je půda nebo zbytky rostlinných pletiv, na kterých fuzária přezimují. Na vzniku a šíření choroby se podílí produkované mykotoxiny, neboť jsou faktory virulence výše uvedených druhů rodu *Fusarium* (Terzi *et al.*, 2014), a také enzymy zodpovědné za poškození buněčné stěny a membrány rostlin, jako jsou celulózy, pektinázy, proteázy, xylanázy a lipázy (Taheri, 2018).

Výskyt fuzarióz klasů je závislý na mnoha faktorech. Především se jedná o počasí a zemědělské praktiky, jako je střídání plodin, způsob hnojení nebo aplikace fungicidů. Za rizikové faktory je možné považovat použití kukuřice jako předplodiny (Wenda-Plesik *et al.*, 2017), stejně jako vlhké a teplé podmínky v období růstu a zrání rostliny (Matny, 2015). K napadení může dojít v celé fázi růstu, z čehož největší riziko představuje období kvetení (Wegulo *et al.*, 2015, Havránková a Ovesná, 2012), neboť květ je zdrojem stimulantů pro klíčení spor a růst plísni (Wegulo *et al.*, 2015).

### **1.3 Fytopatogenní druhy rodu *Fusarium***

#### **1.3.1 *Fusarium graminearum***

Pojmenování *Fusarium graminearum* v širším slova smyslu označuje 16 různých druhů (linií) fuzárií (Taheri, 2018; Aoki *et al.*, 2014; Przemieniecki *et al.*, 2014). Z hlediska taxonomie tvoří samostatný druhový komplex pod názvem *Fusarium graminearum* species komplex situovaný do genetického komplexu *sambucinum* (Aoki *et al.*, 2014) a sekce *Discolor* (O'Donnell *et al.*, 2013). Výskyt jednotlivých linií je vázán na určitou geografickou oblast (Przemieniecki *et al.*, 2014), kdy v zemích Evropské Unie (EU) a na území severní Ameriky převládá linie 7, zvaná také jako *Fusarium graminearum sensu stricto* (Yli-Matilla, 2010). Nelze ale vyloučit případnou možnost šíření druhů komplexu napříč světem. Mezi izoláty z Evropy, Brazílie a Spojených států amerických (USA) bylo identifikováno i *Fusarium asiaticum*, jehož výskyt je vázán na oblast Asie (Przemieniecki *et al.*, 2014).

Všechny linie komplexu disponují velice podobnými morfologickými znaky (Aoki *et al.*, 2014). *Fusarium graminearum* se na bramboro – glukózovém agaru (PDA) vyznačuje rychlým růstem v koloniích bílé, žluté až světle oranžové barvy s produkcí červeného pigmentu



do agaru. Vytváří obvykle pěti až šesti septované silnostěnné makrokonidie (Leslie a Summerell, 2006), které se v rámci druhů komplexu neliší svým tvarem (Przemieniecki *et al.*, 2014). Mikrokonidie netvoří vůbec, chlamydospory obvykle velmi pomalu (Leslie a Summerell, 2006, Nelson *et al.*, 1983).

*F. graminearum* je některými autory považováno za jednoho z dominantních patogenů fuzariózy klasů (Dweba *et al.*, 2017; Beccari *et al.*, 2017; Terzi *et al.*, 2014). Nicméně výsledky průzkumů, prováděných v posledních letech s cílem identifikace jednotlivých druhů fuzárií, uvádí odlišné informace. Např. v Itálii v letech 2011-2013 nebylo *F. graminearum* ve sladovnickém ječmeni převažujícím druhem. To samé zjištění vyplývá z obdobných analýz sladovnického ječmene v Dánsku a Velké Británii (Beccari *et al.*, 2017). Také v České republice (ČR), konkrétně ve vzorcích pšenice, nebyl tento druh v posledních letech vyhodnocen jako dominantní (Sumíková *et al.*, 2017).

Z hlediska produkce mykotoxinů se *F. graminearum* dělí na chemotypy trichothecenů skupiny B. Konkrétně se jedná o producenty deoxynivalenolu (DON) a jeho acetylovaných forem 3-acetyldeoxynivalenolu (3-ADON), 15-acetyldeoxynivalenolu (15-ADON), nivalenolu (NIV) (Garmendia *et al.*, 2018; Dweba *et al.*, 2017; Wegulo *et al.*, 2015; Boutigny *et al.*, 2014; Yli-Matilla, 2010) a 4-acetylnivalenolu, označovaného také jako fusarenon X (Garmendia *et al.*, 2018; Dweba *et al.*, 2017; Boutigny *et al.*, 2014). Výsledky studií ukazují, že chemotypy *F. graminearum* 3-ADON jsou oproti 15-ADON schopny produkce DON o vyšší koncentraci (Taheri, 2018). V období roku 2000-2013 probíhalo v zemích Evropské unie sledování výskytu *Fusarium graminearum sensu stricto* se zaměřením na výskyt jednotlivých chemotypů. Celkem bylo zpracováno 1147 vzorků pocházejících ze 17 zemí EU, izolovaných zejména z pšenice, kukuřice a ječmene. Z výsledků vyplývá, že v Evropě je převažujícím chemotypem 15-ADON (82,9 %), následně 3-ADON (13,6 %) a NIV (3,5 %). Zastoupení forem 15-ADON a 3-ADON je silně ovlivněno klimatickými podmínkami prostředí (Pasquali *et al.*, 2016). Např. u izolátů pocházejících z oblasti jihu Ruska převažuje chemotyp 15-ADON, zatímco v severo-západní oblasti, kde byl výskyt *F. graminearum* poprvé zaznamenán v roce 2003, převládá 3-ADON (Yli-Matilla, 2010). 3-ADON také dominuje v Severských zemích (Pasquali *et al.*, 2016).

### **1.3.2 *Fusarium culmorum***

*Fusarium culmorum* je dalším členem druhového komplexu *sambucinum* (Aoki *et al.*, 2014) a sekce *Discolor* (O'Donnell *et al.*, 2013). Na rozdíl od *Fusarium graminearum* není členěno do samostatného druhového komplexu (Kim *et al.*, 2016). Jeho výskyt je spojován

převážně s chladnějšími oblastmi, jako je severní, střední a západní Evropa, Kanada, západní Asie, severní Afrika a Austrálie. (Kim *et al.*, 2016; Yli-Matilla, 2010, Demeke *et al.*, 2005).

Vyznačuje se rychlým růstem na PDA, obvykle s produkcí červeného pigmentu do agaru. Vytváří krátké silnostěnné makrokonidie, zpravidla 3-4 septované. Mikrokonidie netvoří, poměrně rychle produkuje chlamydospory (Leslie a Summerell, 2006; Nelson *et al.*, 1983).

*F. culmorum* spolu s *Fusarium graminearum* patří k producentům trichothecenových mykotoxinů skupiny B, včetně členění na chemotypy, o kterých je však ve vzájemném porovnání méně dostupných informací. Sledování prováděné v letech 2000-2013 napříč evropskými zeměmi vychází z informací získaných ze 479 vzorků, z nichž 59,9 % *F. culmorum* bylo označeno jako chemotyp 3-ADON, zbytek (40,1 %) naopak jako chemotyp NIV. Z výsledků dále vyplývá, že nivalenol chemotyp převládá v západních evropských oblastech. Autoři se domnívají, že tato převaha vyplývá z rozdílných klimatických podmínek prostředí nebo odlišných zemědělských praktik, na které se tento druh adaptoval (Pasquali *et al.*, 2016).

### **1.3.3 *Fusarium tricinctum/Fusarium avenaceum/Fusarium arthrosporioides***

Tato úzce příbuzná skupina je řazena do druhového komplexu *tricinctum* (Aoki *et al.*, 2014). *F. avenaceum* patří do sekce *Roseum*, zatímco *F. tricinctum* do sekce *Sporotrichiella* (O'Donnell *et al.*, 2013). I přesto, že každý druh patří do jiné sekce a liší se svými mikroskopickými znaky, jsou si vzájemně geneticky úzce příbuzné. (Kulik, 2008) *F. avenaceum* a *F. arthrosporioides*, které jsou některými autory uváděny jako jeden druh fuzária (Yli-Matilla, 2010) a často jsou vzájemně zaměňovány (Yli-Matilla *et al.*, 2004), lze pomocí biomolekulárních metod odlišit od *F. tricinctum*. Samotné *F. avenaceum* je děleno na 2 skupiny (*F. avenaceum I* a *F. avenaceum II*), zatímco *F. arthrosporioides* na tři klastry, kdy pouze jeden z nich je možno odlišit od výše zmíněné *F. avenaceum* (Yli-Matilla, 2010; Yli-Matilla *et al.*, 2004).

*F. avenaceum* roste na PDA variabilní rychlostí za tvorby bílého, světle žlutého až šedo-růžového mycelia. Makrokonidie jsou tenkostěnné, dlouhé, štíhlé, obvykle s pěti septy. Podle Leslie a Summerell (2006) mohou některé izoláty zřídka vytvářet mikrokonidie různých velikostí, zatímco tento znak je dle Nelson *et al.*, (1983) přisuzován kmenům *F. arthrosporioides*. Chlamydospory netvoří. *F. tricinctum* se na PDA vyznačuje rychlým růstem a produkcí červeného pigmentu do agaru. Zpočátku tvoří bílé mycelium, které je později zbarveno růžově, červeně až fialově. Makrokonidie jsou relativně štíhlé, větvenovité, převážně se třemi septy. Vytváří mikrokonidie tvaru hrušky, citronu nebo větvena, obvykle bez

přítomnosti sept. U některých lze po delší době kultivace pozorovat chlamydospory (Leslie a Summerell, 2006; Nelson *et al.*, 1983).

Výskyt *F. avenaceum* je spojován především s chladnějšími podmínkami prostředí (Beccari *et al.*, 2016) a je považováno za dominantní druh převážně na území severní Evropy, Kanady (Uhlir *et al.*, 2007) a Asie (Yli-Matilla, 2010). Není ale možné vyloučit jeho adaptabilitu k odlišným klimatickým podmínkám, neboť v posledních letech byla jeho zvýšená přítomnost zaznamenána v různých zemích EU (Beccari *et al.*, 2016).

*F. avenaceum* i *F. tricinctum* produkují, v porovnání s výše popsány druhy, jiné typy mykotoxinů, a sice moniliformin, a skupinu eniantinů. Trichothecenové mykotoxiny neprodukují (Yli-Matilla, 2010; Yli-Matilla *et al.*, 2002). Rozdílné informace jsou dostupné o schopnosti syntézy beauvericinu. V roce 2002 bylo zaznamenáno, že *F. avenaceum* je na území Finska této syntézy schopné. Později, konkrétně v roce 2004 a 2008 bylo naopak uvedeno, že finské kmeny *F. avenaceum*, *F. tricinctum* a *F. arthrosporioides* nejsou schopny produkce beauvericinu ve velkém množství. Ke stejným závěrům dospěli i autoři podobných studií v Norsku a Švýcarsku (Yli-Matilla, 2010).

#### **1.3.4 *Fusarium poae*/*Fusarium sporotrichioides*/*Fusarium langsethiae***

Všechny tři druhy patří do genetického komplexu *sambucinum* (Aoki *et al.*, 2014) a sekce *Sporotrichiella* (O'Donnell *et al.*, 2013). Z fylogenetického hlediska je *F. langsethiae* sesterským taxonem *F. sporotrichioides* a *F. poae* je sesterským taxonem *F. kyushuense*, jehož výskyt byl zaznamenán pouze na území Japonska. Fenotypově je *F. langsethiae* podobné k *F. poae*, ze kterého bylo vyčleněno v roce 2004 jako samostatný druh. Svoji metabolickou činností je naopak podobné k *F. sporotrichioides* (Imathiu *et al.*, 2013; Knutsen *et al.*, 2004).

Růst *F. poae* na PDA je charakterizován tvorbou světlého mycelia, které časem mění barvu do červenohnědé a produkcí červeného pigmentu do agarů. Pudrový vzhled kolonií stejného vzhledu je přisuzován druhu *F. langsethiae*, mikroskopické znaky obou druhů jsou téměř identické (Imathiu *et al.*, 2013; Knutsen *et al.*, 2004). Schopnost vytvářet makrokonidie nebyla nalezena u všech kmenů *F. poae*. Pokud jsou přítomny, jsou štíhlé, relativně krátké, většinou se třemi septy. Mikrokonidie jsou kulatého nebo kapkovitého tvaru, obvykle bez sept. Jsou tvořeny na monofialidách ve shlucích připomínajících trsy hroznů. Chlamydospory vytváří *F. poae* zřídka (Leslie a Summerell, 2006).

*F. sporotrichioides* tvoří na PDA bohaté mycelium zpočátku bílé nebo světle červené barvy, které později tmavne. Produkuje červený pigment do agarů. Makrokonidie jsou srpkovité, převážně 3 septované (Leslie a Summerell, 2006). Vytváří především hruškovité

a vrетенovité mikrokonidie, na monofialidách i polyfialidách, maximálně 1 septované. Oproti morfologicky podobnému *F. poae* vytváří chlamydospory ve velkém množství (Leslie a Summerell, 2006; Knutsen *et al.*, 2004; Nelson *et al.*, 1983).

*F. poae* je producentem trichothecenových mykotoxinů skupiny A, konkrétně diacetoxyascirpenolu, skupiny B (nivalenolu), eniantinů a beauvericinu (Yli-Matilla, 2010). *F. langsethiae* je stejně jako *F. sporotrichioides* významným producentem T-2 a HT-2 toxinů (Imathiu *et al.*, 2013).

### 1.3.5 *Fusarium equiseti*

*Fusarium equiseti* je řazeno do geneticky rozmanitého komplexu *incarnatum-equiseti* (Aoki *et al.*, 2014; Marín *et al.*, 2012) a sekce *Elegans* (O'Donnell *et al.*, 2013).

Samotný druh *F. equiseti* se dělí na 2 fylogeneticky rozdílné populace, respektive typy I a II, lišící se geografickým výskytem. Typ I převládá v oblasti severní Evropy, zatímco typ II dominuje v jižní Evropě (Marín *et al.*, 2012). Ve spojení s výskytem fuzarióz klasů je považováno za příležitostného patogena (Goswami *et al.*, 2008).

Na PDA vytváří bílé mycelium, které postupem času přechází do hnědého zbarvení (Leslie a Summerell, 2006; Nelson *et al.*, 1983). Do agaru produkuje světle hnědý až hnědý pigment, obvykle s hnědými skvrnami. Makrokonidie jsou dlouhé a štíhlé, obvykle pěti až sedmi septované. Mikrokonidie netvoří. Chlamydospory jsou uspořádány v řetízku, shlucích nebo jednotlivě, vytvářeny jsou ve velkém množství (Leslie a Summerell, 2006).

*F. equiseti* produkuje trichothecenové mykotoxiny typu A i B. U kmenů, vyskytující se v severských oblastech byla zaznamenána produkce toxinů typu A společně s NIV a fusarenonem X, produkce DON a jeho derivátů nebyla detekována. Oproti tomu na území Španělska bylo u 80 % izolovaných kmenů publikována produkce DON a jeho derivátů a u 25 % kmenů produkce NIV (Marín *et al.*, 2012). Kromě trichothecenů byla zaznamenána i syntéza zearalenonu (Marín *et al.*, 2012; Goswami *et al.*, 2008) a beauvericinu (Marín *et al.*, 2012).

## 1.4 Identifikace plísni rodu *Fusarium*

Do roku 1997 byla identifikace a taxonomie fuzárií založena pouze na posuzování makroskopických a mikroskopických znaků (Aoki *et al.*, 2014, Van Diepeningen *et al.*, 2014; Havránková a Ovesná, 2012). Toto hodnocení bývá z důvodu morfologické mezidruhové podobnosti složité (Kuzdraliński *et al.*, 2017; Nayaka *et al.*, 2011) a časově náročné (Nicolaisen *et al.*, 2009). Velkému pochopení fylogeneze a usnadnění identifikace jednotlivých druhů přinesl rozvoj biomolekulárních metod (Aoki *et al.*, 2014, Nayaka *et al.*, 2011), které jsou

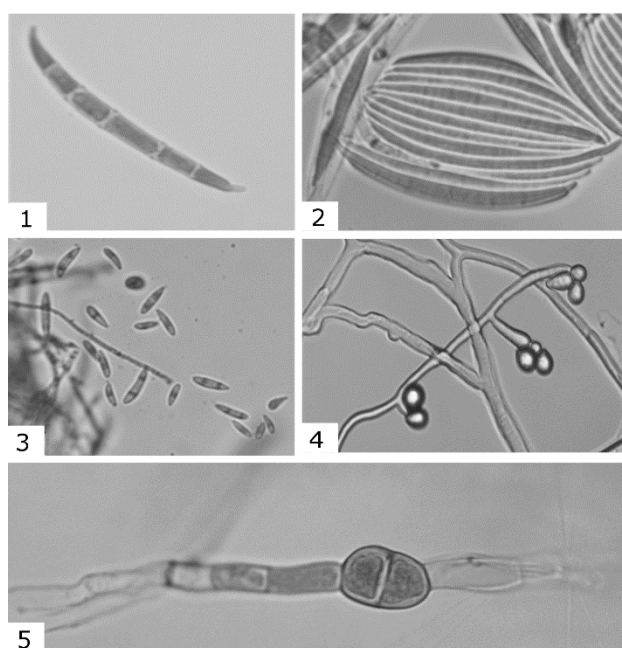
v porovnání s kultivačními metodami rychlé, citlivé a zároveň mají možnost kvantifikace i automatizace (Nicolaisen *et al.*, 2009).

#### **1.4.1 Identifikace na základě morfologických znaků**

Typickým charakteristickým a zároveň nejdůležitějším identifikačním znakem fuzárií je tvorba mnohobuněčných nepohlavních spor zakřiveného tvaru, tzv. makrokonidií. (Van Diepeningen *et al.*, 2014; Leslie a Summerell, 2006; Nelson *et al.*, 1998). Jsou tvořeny na fialidách vystupujících z konidioforu (Malíř *et al.*, 2003). Konidiofory mohou být lokalizované ve vzdušném myceliu (Leslie a Summerell, 2006; Nelson *et al.*, 1998.), nebo se shlukují do okem viditelných útvarů zvaných sporodochia (Malíř *et al.*, 2003). Makrokonidie produkované na energeticky bohatých médiích, jako je např. bramboro glukózový agar (PDA), jsou často nejednotných tvarů a velikostí, což je pro odlišení jednotlivých fuzárií nevhodné. Z tohoto důvodu se pro kultivaci za účelem identifikace využívá karafiátový agar (CLA), který potlačuje růst vzdušného mycelia, a naopak podporuje tvorbu spor. Pro správnou identifikaci by měly být preferovány ty makrokonidie, které pocházejí ze sporodochií přítomných na povrchu karafiátového listu, neboť jsou tvarově jednotné (Leslie a Summerell, 2006; Nelson *et al.*, 1998). Ke sporulaci obvykle dochází v rámci 10-14 dní, za inkubační teploty 25 °C a přítomnosti světla, respektive 20 °C a tmy měnících se v 12hodinových intervalech. Identifikace spočívá v hodnocení celkové délky, vzhledu apikální a bazální buňky, počtu sept a tloušťky buněčné stěny (Leslie a Summerell, 2006; Nelson *et al.*, 1998, Malíř *et al.*, 2003).

Ve vzdušném myceliu jsou tvořeny mikrokonidie, které se od makrokonidií liší svojí velikostí a tvarem, konkrétně jsou menší a tvarově rozmanitější. Vzhledem k tomu, že nejsou vytvářeny všemi druhy fuzárií, je již jejich samotná přítomnost považována za identifikační znak. Dále se hodnotí jejich tvar, přítomnost sept a způsob vzniku (Leslie a Summerell, 2006; Malíř *et al.*, 2003; Nelson *et al.*, 1998). Z důvodu toho, že jeden druh fuzária může produkovat mikrokonidie rozdílných tvarů, využívá se pro kultivaci speciální nutričně-chudý agar (SNA), který tuto tvorbu podporuje. Protože na tomto médiu dochází k omezené tvorbě sporodochií, není zcela vhodné pro hodnocení tvaru makrokonidií (Leslie a Summerell, 2006).

U některých druhů dochází k tvorbě chlamydospor různých tvarů a velikostí. Mohou vznikat na konci vláken, mezi buňkami vlákna, u starších kultur z jednotlivých buněk konidioforu nebo buněk makrokonidií (Malír *et al.*, 2003). Vytváří se zpravidla po delší době kultivace (i více než 6 týdnů). Hodnotí se jejich uspořádání a umístění, a to jak na SNA, tak i CLA (Leslie a Summerell, 2006). Přehled výše popsaných mikroskopických znaků je uveden na obrázku 1.



Obrázek 1 Mikroskopické znaky rodu *Fusarium*. 1 makrokonidie, 2 makrokonidie *in situ*, 3 mikrokonidie, 4 mikrokonidie *in situ*, 5 chlamydospora na hyfě. Zvětšení 40x10 (400x), (foto autor).

Makroskopické znaky, kam se řadí barva mycelia, pigment produkovaný do kultivačního média a rychlost růstu kolonií se posuzují na energeticky bohatém PDA. Tyto znaky by měli být v rámci identifikace považovány za sekundární charakter, neboť pigmentace kolonií mnohých fuzárií na PDA je velmi variabilní (Leslie a Summerell, 2006).

#### 1.4.2 Identifikace pomocí polymerázové řetězové reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je založena na syntéze milionů kopií specifické části deoxyribonukleové kyseliny (DNA) během několika opakujících se kroků (Aslam *et. al.*, 2017). Reakční mix PCR se skládá ze sady specifických primerů, oligonukleotidů (dNTP mixu), enzymu polymerázy,  $MgCl_2$ , PCR pufru a vyšetřované DNA. Analýza je prováděna v termocykléru a obecně se skládá ze 30 až 40 opakujících se kroků. Nejprve je směs zahřáta na teplotu 94 °C, při které je DNA denaturována. V další fázi teplota klesne zhruba na 50-65 °C, přičemž dochází k jevu zvanému annealing neboli nasednutí primerů. Závěrečným krokem je extenze, probíhající při 72 °C, ve kterém je syntetizován nově vzniklý úsek DNA.

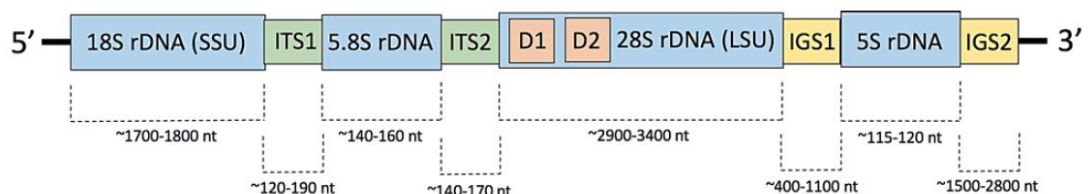
Produkt je následně po elektroforetické separaci v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu identifikován (Shahi *et. al.*, 2018). V případě, že v jedné reakci dochází k detekci dvou nebo více cílových DNA, je tato metoda označována jako multiplex PCR. Toto provedení přináší výhodu v podobě úspory času a financí, na druhou stranu může docházet ke snížení citlivosti reakce nebo vzájemné interakci primerů (Aslam *et. al.*, 2017).

Zvláštním typem je tzv. „Touchdown“ PCR, která se od té standardní liší v uspořádání teploty annealingu. Ta je zpravidla nejprve nastavena o 10 °C výše než teoretická a následně v 10 až 15 cyklech snižována o 1 °C. Po dosažení cílené teploty nastává druhá fáze reakce, která je již identická s výše uvedenou PCR, a probíhá v 20 až 25 cyklech. Obecně se doporučuje, aby celkový počet cyklů byl maximálně 30 až 35, neboť se zvyšujícím se počtem cyklů se zvyšuje riziko vzniku nespecifických produktů. „Touchdown“ PCR svým uspořádáním vede ke zlepšení citlivosti stanovení bez nutnosti dlouhé optimalizace celého procesu (Korbie a Mattick, 2008).

Jednou z výhod použití PCR je široké spektrum informací, které tyto metody poskytují. Kromě samotné detekce plísně je možné prokázat její schopnost produkovat mykotoxiny včetně určení konkrétního chemotypu (Morcia *et al.*, 2013). DNA může být ve vzorku identifikována ještě před tím, než je možné pozorovat příznaky onemocnění napadených rostlinných pletiv (Kuzdraliński *et al.*, 2017) nebo zrna. Příkladem je práce autorů Suanthie *et al.* (2009), kteří pomocí PCR detekovali DNA plísní rodu *Fusarium*, *Aspergillus* a *Penicillium* první den po kontaminaci uskladněných zrn, přičemž v této krátké době po infekci nebyla možná mikroskopická identifikace (Morcia *et. al.*, 2013).

### 1.4.3 Druhově specifická identifikace

Pro identifikaci hub pomocí PCR metod se v mykologii obecně využívá *international transcribed region* (ITS) ribozomální DNA (rDNA) (Ramdial *et al.*, 2017; Kuzdraliński *et al.*, 2017) a je zároveň i nejčastějším sekvenovaným úsekem DNA, používaným v oblasti molekulární ekologie hub (Ramdial *et al.*, 2017). ITS region je lokalizován kolem 5.8S kódující sekvence a odděluje úseky 18S malé ribozomální a 28S velké ribozomální podjednotky (viz obrázek 2) (Kuzdraliński *et al.*, 2017).



Obrázek 2 Pozice ITS regionu fungální rDNA Označení nt odpovídá velikosti úseku v jednotkách oligonukleotidů (Kuzdraliński *et al.*, 2017)

V případě identifikace rodu *Fusarium* ale tento úsek vzájemně neodliší členy tvořící genetický komplex. Z tohoto důvodu jsou častěji využívány geny kódující proteiny, jako je např.  $\beta$ -tubulin, *translation elongation factor 1- $\alpha$* , RNA polymerázové podjednotky 1 a 2 (RPB1 a RPB2) (Ramdial *et al.*, 2017; O'Donnell *et al.*, 2015), dále *intergenic spacer region*, mitochondriální DNA (Ramdial *et al.*, 2017; Gong, Jiang a Chen, 2014) nebo geny kódující syntézu trichothecenových mykotoxinů (*Tri* geny) (Kuzdraliński *et al.*, 2017). Návrh specifického primeru může být uskutečněn i pomocí amplifikované oblasti označené sekvencí, tzv. SCAR metody, která je pro identifikaci rodu *Fusarium* široce využívána (Kuzdraliński *et al.*, 2017). Vzhledem k tomu, že fuzária mohou být z genetického hlediska úzce příbuzná, může se využití PCR, respektive návrh druhově specifických primerů potýkat s problémy křížných reakcí s ostatními úzce příbuznými druhy. To platí i v případě těch druhů, které se na první pohled vzájemně liší svými makroskopickými a mikroskopickými znaky (Kuzdraliński *et al.*, 2017; Kulik, 2008).

Příkladem je návrh specifických primerů autory Nicholson *et al.*, (1998). Z důvodu úzké mezidruhové příbuznosti *F. graminearum* a *F. culmorum* byla navržena sada primerů Fcg17F/R, která poskytuje produkt s oběma patogeny za odlišení příbuzného druhu *F. cerealis* (Kuzdraliński *et al.*, 2017; Nicholson *et al.*, 1998). Pro specifickou detekci *F. graminearum* byl autory navržen set Fg16F/R, který s vyšetřovanými izoláty *F. graminearum* vytvořil produkt čtyř různých velikostí (Nicholson *et al.*, 1998). Postupem času bylo zjištěno, že s uvedeným primerem lze získat až šest rozdílných produktů s liniemi *Fusarium graminearum* species komplex a s jeho pomocí je kromě samotné detekce druhu možné určit i linii komplexu (Abedi-Tizaki a Zafari, 2016; Nicholson *et al.*, 2004). Pro detekci a zároveň kvantifikaci *F. culmorum* byl autory Nicolaisen *et al.*, (2009) navržen primer FculC561/FculC614, se kterým ale není možné odlišit *F. culmorum* od *F. cerealis* (Nicolaisen *et al.*, 2009).

Další případ tvoří skupina *F. avenaceum*, *F. tricinctum* a *F. acuminatum*. U primeru Fa F/R, prvotně představeného pro specifickou detekci *F. avenaceum* (Doohan *et al.*, 1998), byla autorem Kulik (2008) zaznamenána křížná reakce s izoláty *F. tricinctum* (Kulik, 2008). Obdobné zjištění se týká primeru FA-ITSF/R, primárně pro specifickou detekci *F. avenaceum*. Křížná reakce s *F. tricinctum* byla zjištěna autory Turner *et al.* (1998). Autoři současně navrhli nový primer FA-U17 F/R, který má identickou sekvenci s Fa F/R, ale odlišný produkt reakce. Zatímco výsledným produktem po použití primeru Fa F/R je úsek o velikosti 920 pb (párů bází), u primeru FA-U17 F/R pouze 345 pb. Nicméně ani s FA-U17 F/R se nepodařilo vzájemně odlišit druhy *F. avenaceum* a *F. tricinctum* (Turner *et al.*, 1998). Dodatečně bylo autory Demeke *et al.*, (2005) zjištěno, že produkt 920 pb s primerem Fa F/R poskytly nejen



vyšetřované izoláty *F. avenaceum*, ale i všechny izoláty *F. acuminatum* (Kuzdraliński *et al.*, 2017; Demeke *et al.*, 2005).

Detekce *F. poae* pomocí primeru CNL12/PoaeIGSr se potýká s křížnou reakcí *F. kyushuense* a slabou reakcí s jedním vyšetřovaným izolátem *F. langsethiae* (Kuzdraliński *et al.*, 2017; Konstantinova a Yli-Matilla, 2004). Autoři článku tuto slabou reakci diskutují jako možnou kontaminaci vyšetřované DNA (Konstantinova a Yli-Matilla, 2004). *F. sporotrichioides*, ale zároveň i *F. langsethiae*, lze společně detekovat pomocí primeru SporoITSf/SporoITSr. Nicméně, autoři při jeho návrhu zaznamenali současně několik nespecifických reakcí (Kuzdraliński *et al.*, 2017; Konstantinova a Yli-Matilla, 2004). Autoři Wilson *et al.*, (2004) představili primer 127F2/127R2 pro společnou detekci *F. sporotrichioides* a *F. langsethiae*. Zároveň ověřili 32 kombinací primerů, kdy pouze jeden z nich byl specifický pro *F. sporotrichioides* a jeden pro *F. langsethiae* (Wilson *et al.*, 2004).

Výše uvedené primery pro identifikaci více než jednoho druhu fuzária jsou včetně sekvencí uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1 Sekvence primerů pro identifikaci více než jednoho druhu fuzária.

Primer	Sekvence (5' - 3')	Identifikace
Fcg17F Fcg17R	TCGATATACCGTGCGATTTCC TACAGACACCGTCAGGGGG	<i>F. culmorum</i> / <i>F. graminearum</i>
Faf Far	CAA GCA TTG TCG CCA CTC TC GTT TGG CTC TAC CGG GAC TG	<i>F. avenaceum</i> / <i>F. tricinctum</i> / <i>F. acuminatum</i>
FA-ITS f FA-ITS r	CCA GAG GAC CCA AAC TCT AA ACC GCA GAA GCA GAG CCA AT	<i>F. avenaceum</i> / <i>F. tricinctum</i>
FculC561 fwd FculC614 rev	CAC CGT CAT TGG TAT GTT GTC ACT CGG GAG CGT CTG ATA GTC G	<i>F. culmorum</i> / <i>F. cerealis</i>
CNL12 PoaeIGS-R	CTGAACGCCTCTAAGTCAG CAAGCTCTCCTCGGAGAGTCGAA	<i>F. poae</i> / <i>F. kyushuense</i> / <i>F. langsethiae</i>
SporoITSr SporoITSf	ATCAGCCCGCGCCCCGTAA CAATTTGGGACTGTGTTTGC	<i>F. sporotrichioides</i> / <i>F. langsethiae</i>
Spo3F Spo1R	ATAACTCCGTGGCTGCTTGG ATCAACAAACTAGATCGCTATACATT	<i>F. sporotrichioides</i> / <i>F. langsethiae</i>

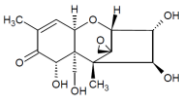
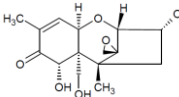
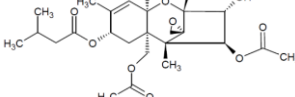
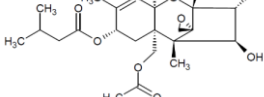
## 1.5 Trichothecenové mykotoxiny

Trichotheceny představují skupinu více než 200 toxinů základní seskviterpenoidní struktury 12,13-epoxytrichothec-9-ene, na základě jejíž substituce se dělí na 4 skupiny, konkrétně na typ A, B, C a D. Jsou produkovány plísněmi rodu *Fusarium*, *Myrothecium*,

*Spicellum*, *Stachybotrys*, *Cephalosporium*, *Trichoderma* a *Trichothecium*, přičemž rodem *Fusarium* je syntetizován typ A a B. Typ A představuje sloučeniny, které mají na osmém uhlíku základního řetězce hydroxylovou nebo esterovou funkční skupinu, v případě typu B je na identickém uhlíku navázána karbonylová funkční skupina (Escrivá *et al.*, 2015; McCormik *et al.* 2011).

Jedná se o amfipatické molekuly, které mohou pasivně procházet přes buněčné membrány. Jsou snadno vstřebávány kůží a gastrointestinálním traktem. Inhibují syntézu proteinů, především tím, že blokují tvorbu polypeptidového řetězce na peptidyltransferáze, centra 60S ribozomální podjednotky. Blokována je především iniciace a elongace řetězce, ačkoliv může být postižena i terminace. Dále inhibují syntézu mitochondriálních proteinů a interagují s thiolovými skupinami přítomných na proteinech. Jejich působením jsou vytvářeny volné radikály. U zvířat může expozice těmito toxiny vyvolat odmítání krmiva, zvracení, dermatitidy, hemoragie nebo imunopresi. U rostlin má jejich působení za následek vznik chlorózy, zpomalení až inhibici růstu kořenů a jsou faktorem virulence fuzárií při vzniku fuzarióz klasů (Escrivá *et al.*, 2015; McCormick *et al.*, 2011). Přehled důležitých trichothecenů přítomných v EU včetně jejich hodnot LD<sub>50</sub> a tolerovatelného denního příjmu (TDI) je uveden v tabulce 2.

Tabulka 2 Přehled důležitých trichothecenových mykotoxinů v EU. Zpracováno dle Sumiková *et al.*, 2017; Beccari *et al.*, 2016; Broekaert *et al.*, 2015.

Toxin	Nivalenol	Deoxynivalenol	T-2 toxin	HT-2 toxin
Hlavní producenti v EU	<i>F. graminearum</i> <i>F. culmorum</i> <i>F. poae</i>	<i>F. graminearum</i> <i>F. culmorum</i>	<i>F. sporotrichioides</i> <i>F. langsethiae</i>	<i>F. sporotrichioides</i> <i>F. langsethiae</i>
Typ	B	B	A	A
Struktura				
Molekulová hmotnost [g/mol]	312,32	296,32	466,53	424,49
LD <sub>50</sub> [μg/kg]	38,9	46,0		4,0
Způsob podání	myš/perorálně	myš/ perorálně		potkan/perorálně
TDI [μg/kg]	1,2	1,0		0,1

Typy A jsou v porovnání s typem B více toxické (Morcia *et al.*, 2016). Zatímco limity pro T-2 a HT-2 toxin jsou stanoveny pouze jako orientační, a to doporučením komise ze dne 27. března 2013 ohledně přítomnosti T-2 a HT-2 v obilovinách a výrobků z obilovin

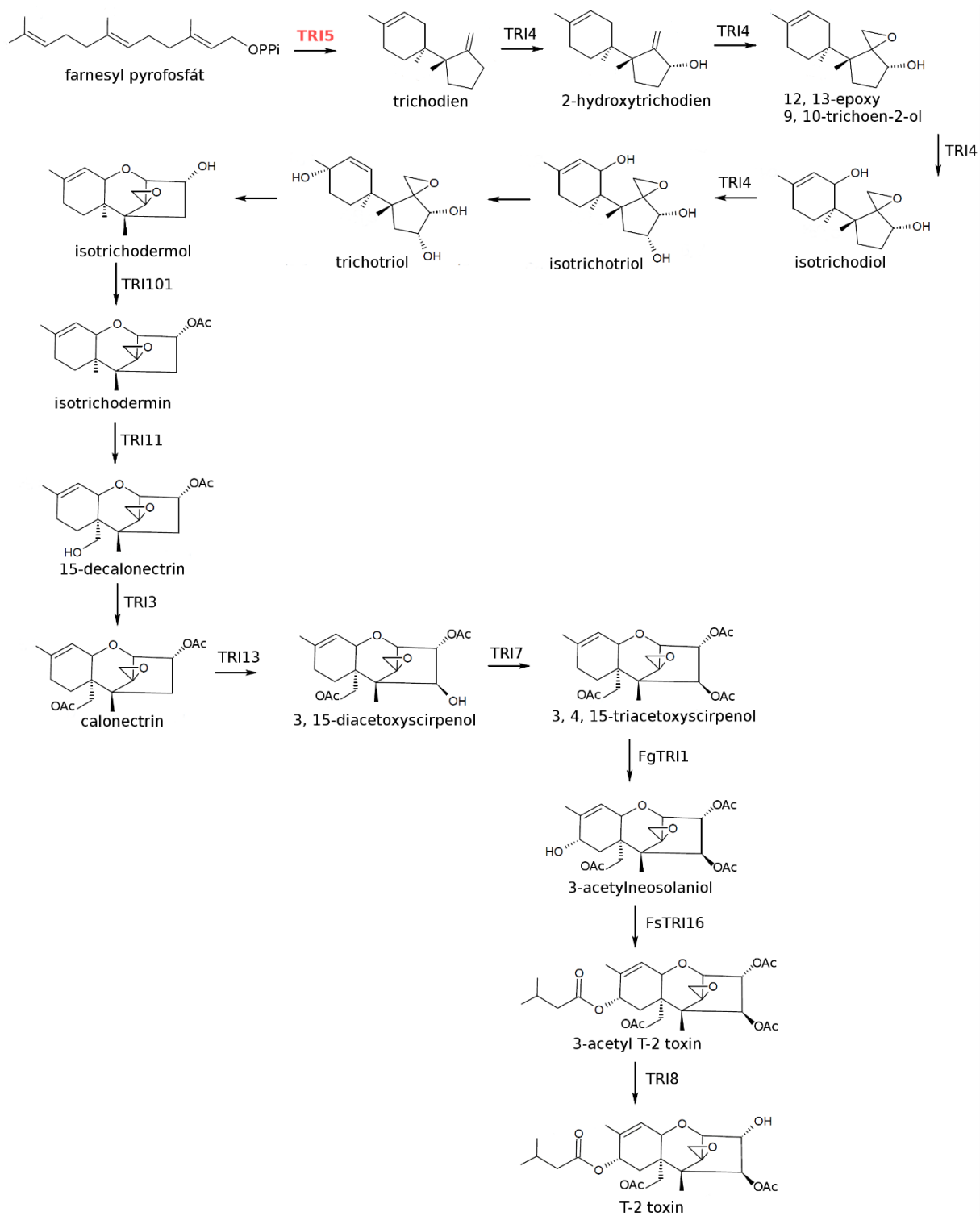
(Doporučení komise 91/12), obsah DON je v nezpracovaných obilovinách a výrobců z obilovin limitován nařízením komise (ES) č. 1881/2006 (Nařízení komise (ES) č. 1881/2006 v pozdějším znění).

### 1.5.1 Geny syntézy trichothecenů

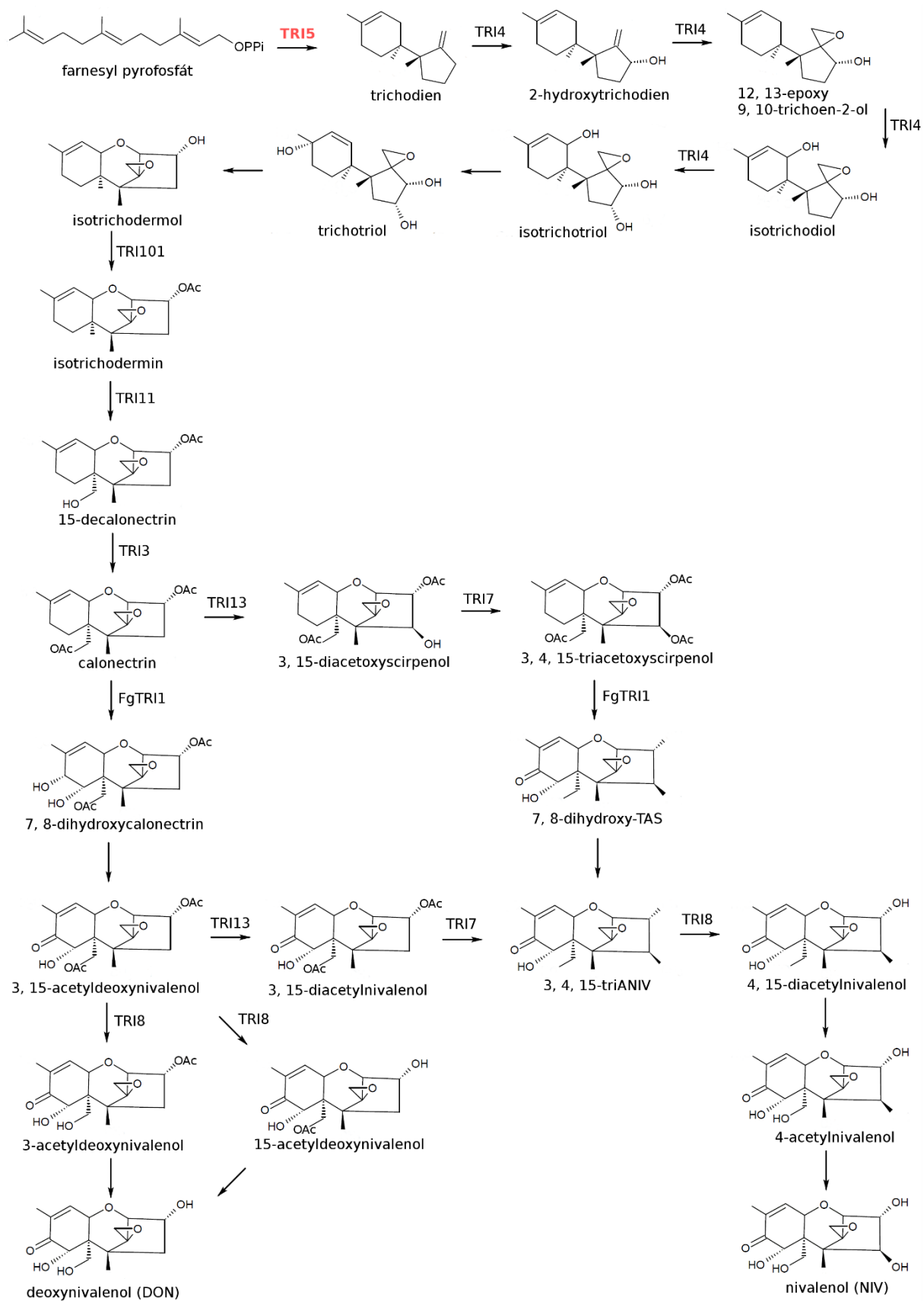
Většina genů kódujících enzymy pro syntézu trichothecenů je uspořádána do *Tri* klastrů (Morcia *et al.*, 2013, Havránková a Ovesná, 2012, Yli-Matilla, 2010), které jsou funkčními analogy bakteriálních plasmidů (Morcia *et al.*, 2013). Jsou uspořádány do 3 lokusů, kdy převážná část genů je součástí klastru *Tri5*, dva *Tri* geny se nachází v klastru *Tri1-Tri16* a v samostatných lokusech se nachází geny *Tri15* a *Tri101* (Havránková a Ovesná, 2012). *Tri5* klastr, který v sobě zahrnuje více než polovinu genů zodpovědných za syntézu, obsahuje 2 regulační geny, 7 genů biochemické syntézy a 1 transportní gen (Morcia *et al.*, 2013). Součástí *Tri5* klastru je i *Tri5* gen, který kóduje enzym trichodien syntázu, katalyzující tvorbu trichodienu z farnesyl pyrofosfátu na trichodien, a zároveň je prvním genem syntézy (Morcia *et al.*, 2013; Havránková, Ovesná, 2012; Merhej *et al.*, 2011). *Tri5* gen je často využíván pro průkaz schopnosti produkce trichothecenů pomocí PCR (Covarelli *et al.*, 2014). Podrobný průběh biochemické cesty včetně genů zodpovědných za vznik konkrétních meziproductů je uveden na obrázku 3 a 4.

Ne všechna fuzária jsou syntézy toxinů schopné, a to z důvodu absence jednoho či více genů nutných pro produkci (Kokonen *et al.*, 2010). Produkce trichothecenů hraje významnou roli ve vztahu fytopatogen – hostitel, konkrétně ve schopnosti šíření plísňe (Merhej *et al.*, 2011). Poškození *Tri5* genu u kmenů *F. graminearum* produkujících DON nebo NIV mělo za následek kolonizace inokulovaného klasu pšenice, vytvoření zjevných symptomů onemocnění, ale patogen se nešířil do ostatních klásků (Taheri, 2018).

Exprese genů je ovlivňována vnějšími podmínkami prostředí, jako je teplota, aktivita vody (*a<sub>w</sub>*), hodnota pH, stejně jako obsah a dostupnost nutričních faktorů. Za polních podmínek jsou to klimatické vlivy, zemědělská činnost, hostitelská plodina, přítomnost ostatních mikroorganismů (Kokonen, 2010) a konkurence mezi kmeny syntézy toxinů schopných a neschopných (Broekaert *et al.*, 2015; Havránková a Ovesná, 2012). Samotný průběh syntézy je ovlivňován i regulačními geny, konkrétně geny *Tri6* a *Tri10* (Havránková a Ovesná, 2012, Merhej *et al.*, 2011).



Obrázek 3 Syntéza trichothecenů skupiny A. Upraveno dle (Escrivá *et al.*, 2015; McCormik *et al.* 2011)



Obrázek 4 Syntéza trichothecenů skupiny B. Upraveno dle (Escrivá *et al.*, 2015; McCormik *et al.* 2011)

### 1.5.2 Maskované mykotoxiny

Mykotoxiny, stejně jako řada dalších xenobiotik, jsou snadno absorbovány rostlinami, které je svým metabolismem transformují na tzv. maskované mykotoxiny (Broekaert *et al.*, 2015). Metabolismus transformace může být aktivován po napadení plísněmi rodu *Fusarium*, respektive po kontaktu rostliny s vyprodukovaným mykotoxinem (Janssen *et al.*, 2018).

V první fázi metabolismu obecně dochází k enzymatické aktivaci sloučeniny pomocí hydrolýzy, hydroxylace nebo oxidace. Následuje druhá fáze metabolismu, ve které se tvoří vazba aktivované sloučeniny s hydrofilními molekulami, jako jsou cukry, kyselina malonová, glutathion nebo aminokyseliny. Výsledný produkt je v porovnání s původní sloučeninou zpravidla více hydrofilní a v případě mykotoxinů i méně toxický vůči rostlině. V přírodních vzorcích se běžně vyskytují maskované formy trichothecenů vázaných na cukry, jako je T-2-glukosid, HT-2-glukosid nebo deoxynivalenol-3-glukosid (D3G) (Janssen *et al.*, 2018; Broekaert *et al.*, 2015). Transgenní rostliny jsou díky přítomnosti genu FsTRI101 schopné převedení DON na 3-ADON, který je oproti DON méně toxický, a je ho tedy také možné považovat za maskovanou formu DON (Broekaert *et al.*, 2015).

Maskované formy, nebo přechod jednotlivých mykotoxinů ve vázané formy, lze pozorovat i při zpracování zrna, konkrétně např. při sladování ječmene. Pravděpodobně díky zvýšené aktivitě enzymů jako je glykosyltransferáza během klíčení byl některými autory publikován přechod DON na formu D3G (Terzi *et al.*, 2015). Ze studie Pazderů *et al.*, (2016), zabývající se změnami trichothecenových mykotoxinů během procesu sladování ječmene a pšenice vyplynulo, že u pšenice došlo k statisticky významnému zvýšení obsahu D3G (konkrétně o 293 % oproti počátečnímu obsahu), u ječmene došlo ke zvýšení o 136 %. Autoři se ztotožňují se závěrem studie McCormick *et al.*, (2011), že formy A-DON mohou být společně s DON během sladování transformovány do formy D3G (Pazderů *et al.*, 2016). Tato forma se může vyskytovat až v konečném produktu, tedy pivu (Janssen *et al.*, 2018).

### 1.6 Analýza mykotoxinů

Správná kvalitativní a kvantitativní analýza je zásadní pro posouzení bezpečnosti potravin, přičemž pro detekci nízké koncentrace mykotoxinů je důležité vyvinutí citlivých, přesných a rychlých analýz (Shanakhat *et al.*, 2018). Většina metod pro analýzu mykotoxinů je založena na použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) ve spojení s fluorescenčním či spektrofotometrickým detektorem nebo s hmotnostním spektrometrem (MS). Velký vědecký zájem spočívá ve vyvinutí metod s možností analýzy více mykotoxinů současně za pomoci kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií

(LC-MS/MS). Další možnou analytickou metodou je plynová chromatografie (GC) s plamenově-ionizačním detektorem, detektorem elektronového záhytu nebo ve spojení s hmotnostním spektrometrem. (Terzi *et al.*, 2014).

Kromě chromatografických metod mohou být mykotoxiny analyzovány metodami imunochemickými. Běžně se využívá imunoenzymatická reakce ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Principem je reakce protilátky s antigenem (mykotoxinem). Měření signálu se nejčastěji provádí spektrofotometricky po přidání enzymem značeného antigenu či protilátky. V případě kompetitivního uspořádání se převážně měří množství komplexu značeného antigenu s protilátkou, měřit lze rovněž množství nenavázaného značeného antigenu. V případě nekompetitivního uspořádání je za účelem dosažení co nejvyšší citlivosti měřeno množství navázané značené protilátky (Malír *et al.*, 2003). ELISA je oblíbena zejména díky své finanční nenáročnosti a jednoduchosti, na druhé straně je omezena možnými křížnými reakcemi nebo falešně pozitivními, případně nadhodnocenými výsledky. Křížnou reakcí je např. ovlivněna analýza DON vedle jeho vázané formy D3G (Bolechová *et al.*, 2015).

Pro analýzu trichothecenových mykotoxinů v potravinách se nejvíce vědeckých prací publikovaných v posledních letech zabývalo výše zmíněnou metodou LC-MS/MS a pouze jedna představila využití GC-MS (Berthiller *et al.*, 2017). Výhody LC-MS/MS spočívají v selektivní a citlivé detekci, možnosti získání informací o struktuře látky, dosažení nízkých detekčních limitů, minimálních požadavcích na přípravu vzorku a identifikace širokého spektra analytů (Shanakhat *et al.*, 2018).

Prvním krokem analýzy je odběr reprezentativního vzorku, který je dán Nařízením komise (ES) č. 401/2006. Dle nařízení by měla být zvlášť pečlivě provedena homogenizace vzorku, neboť zastoupení mykotoxinů je obecně velmi nestejně rozloženo, a to především v nezpracovaných potravinách. Nařízení komise (ES) č. 401/2006 dále vymezuje kritéria pro přípravu vzorků a pro metody analýzy použité při úředních kontrolách množství mykotoxinů v potravinách (Nařízení komise (ES) č. 401/2006).

V dalším kroku je analyt extrahován a přečištěn. Běžně využívanou extrakční metodou je extrakce pevná látka – kapalina, ačkoli v posledních letech byli v této oblasti představeny i jiné metody, jako např. mikrovlnná extrakce nebo superkritická fluidní extrakce (Shanakhat *et al.*, 2018).

Pro přečištění analytu za účelem odstranění možných interferujících látek se využívají komerčně dostupné patronky s různým typem sorbentů (Habler a Rychlik, 2016; Habler *et al.*, 2016; Běláková *et al.*, 2014). Využívaným sorbentem je modifikovaný silikagel, pro trichotheceny konkrétně Florisil- a cyano-silikagel. Dalším typem jsou imunoafinitní kolony,

kteře mají pevnou fázi modifikovanou protilátkou. Ta specificky váže konkrétní mykotoxin, který je po odstranění interferujících látek eluován pomocí rozpouštědla nebo denurací protilátky. Další typ tvoří kolonky Mycosep a Multisep, kde je cílený analyt filtrován, zatímco proteiny, mastné kyseliny a pigmenty jsou zadrženy na pevné fázi. Pro analýzu trichothecenů jsou využívány kolonky Mycosep 226 a 227 (Shanakhat *et al.*, 2018; Kai *et al.*, 2016).

Mykotoxiny lze pro analýzu připravit i metodou QuEChERS (z anglického Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe – rychlý, jednoduchý, levný, efektivní, robustní a bezpečný) (Shanakhat *et al.*, 2018; Beccari *et al.*, 2016; Bolechová *et al.*, 2015). Tato příprava vzorku byla prvotně navržena pro analýzu reziduí pesticidů v ovoci a zelenině s vysokým obsahem vody (Shanakhat *et al.*, 2018; Rejczak a Tuzimnski, 2015), nicméně může být použita pro různé typy organických molekul vázaných v různých matricích (Shanakhat *et al.*, 2018; Beccari *et al.*, 2016; Rejczak a Tuzimnski, 2015). Oproti klasickým extrakčním metodám se QuEChERS vyznačuje svojí rychlostí, nízkou spotřebou extrakčních rozpouštědel a malým množstvím vznikajícího odpadu (Shanakhat *et al.*, 2018). Principem metody je extrakce pevného vzorku pomocí acetonitrilu s přidávkem MgSO<sub>4</sub> a NaCl a následným přečištěním s využitím N-propyl ethylendiaminu nebo sorbentů na bázi oktadecilsilikagelu pro zadržení cukrů a mastných kyselin (Shanakhat *et al.*, 2018; Rejczak a Tuzimnski, 2015). Pro přípravu analytu lze zvolit i kombinaci výše uvedených metod, např. QuEChERS s dodatečným přečištěním přes komerčně dostupné kolonky (Tamura *et al.*, 2015).

## **1.7 Inhibice fuzárií a snižování obsahu mykotoxinů v konečném produktu**

Minimalizace růstu plísní a obsahu mykotoxinů v potravinách a krmivech v první řadě zajišťují opatření prováděná před sklizní obilovin včetně jejich posklizňovém skladování. Zemědělské praktiky, jako je střídání plodin, šlechtění rezistentních odrůd, orba, používání prostředků pro ochranu rostlin proti vzniku chorob a napadení škůdci, se podílí na inhibici růstu plísní a produkci mykotoxinů. Během skladování se jedná především o sledování vlhkosti, měření teploty a sledování výskytu patogenů, v případě zpracování potravin může zejména čištění a třídění zrna výrazně snížit obsah mykotoxinů v konečném produktu (Shanakhat *et al.*, 2018; Terzi *et al.*, 2014). V krmném průmyslu se pro potlačení nežádoucích účinků mykotoxinů využívají aditiva, jako jsou bentonit, aluminosilikáty, montmorillonit, zeolity nebo aktivované uhlí vedoucí k zabránění absorpci toxinů do organismu (Terzi *et al.*, 2014).

Kromě výše zmíněných opatření lze růst fuzárií a produkci mykotoxinů potlačit některými mikroorganismy, které mají potenciální využití v kontrole fuzariózy klasů. Inhibiční účinky byly zaznamenány u plísní rodu *Trichoderma*, dále u *Clonostachys rosea*, *Cladosporium*



*cladosporioides*, kvasinek *Aerobasidium pollulans* a kmenů rodu *Cryptococcus*. Podobně působí i endofytická mikroflóra nacházející se na rostlinné rhizosféře. Výrazný inhibiční efekt proti růstu mycelia *F. graminearum* včetně produkce DON byl zaznamenán u bakteriálního kmene *Bacillus subtilis* SG6, izolovaného z klasu pšenice. Z klasu pšenice byly izolovány i další bakterie, konkrétně *Bacillus subtilis* RC 218 a *Brevibacillus* sp. RC 263, které za částečně kontrolovaných polních podmínek snížily výskyt a průběh fuzariózy klasů a akumulaci DON (Tian *et al.*, 2017).

Slibnou strategií v oblasti redukce obsahu mykotoxinů se mimo jiné zdá být narušení biochemické cesty zodpovědné za produkci trichothecenů nebo biotransformace již vzniklých toxinů pomocí biologických agens na produkty o nižší toxicitě (Juodeikiene *et al.*, 2018; Terzi *et al.*, 2014). Většina vědeckých prací se orientovala na snížení toxicity DON, a to na základě de-epoxidace, čili otevření 12,13-epoxy kruhu vedoucí k produktům, které jsou ve srovnání s původní formou DON méně toxické. Tato schopnost byla prokázána u některých bakteriálních kmenů (Pierron *et al.*, 2016). Prvním publikovaným bakteriálním kmenem, schopné deepoxidace DON, bylo *Eubacterium* sp. BBSH 797, izolované z tekutiny žaludku skotu (Wilson *et al.*, 2017; He *et al.*, 2016;), dále pak druhy bakterií patřících do čeledi *Clostridiales* a rodů *Anaerofilum*, *Collinsella* a *Bacillus* izolovaných z trávicího traktu kuřat. Využití těchto bakterií je ale omezeno tím, že detoxifikace probíhá za anaerobních podmínek (He *et al.*, 2016). Myšlenka, že ačkoliv jsou trichotheceny chemicky stabilní sloučeniny, ale nedochází k jejich akumulaci v půdě, přivedla některé autory ke studiu degradace těchto látek pomocí půdních mikroorganismů (He *et al.*, 2016). Autoři He *et al.*, (2016) ve své práci uvádí směs půdních bakterií patřících do kmenů *Firmicutes* a *Proteobacteria*, které po 76hodinové kultivaci začaly degradovat DON a NIV za současného nárůstu metabolitu deepoxy-DON, respektive deepoxy-NIV. Kompletní biotransformace DON byla zaznamenána po 168hodinové kultivaci, probíhala v aerobním prostředí, širokém rozmezí pH (5-10) a teplotě 20–37 °C. Deepoxidace DON byla dále zaznamenána u směsné kultury bakterií rodů *Serratia*, *Clostridium*, *Citrobacter*, *Enterococcus*, *Stenotrophomonas* a *Streptomyces*. Probíhala stejně jako v předchozím případě za aerobních podmínek, v širokém rozmezí teplot (12–40 °C) a pH v oblasti 6-7,5 (He *et al.*, 2016).

Mimo epoxidového kruhu se na toxicitě trichothecenů podílí i přítomnost hydroxylové skupiny vázané na třetím uhlíku, neboť mikrobiální biotransformace DON na 3-epimer-DON snižuje toxicitu vůči intestinálním buňkám (Pierron *et al.*, 2016), a 3-keto-DON je zpravidla o 90 % méně toxický než DON (Wilson *et al.*, 2017). Autoři Wilson *et al.*, (2017) publikovali

směsné bakteriální kultury patřící do rodu *Acinetobacter*, *Leadbetterella* a *Gemmata* schopné biotransformace DON na 3-epimer-DON (Wilson *et al.*, 2017).

Kromě negativního působení trichothecenů na zdraví zvířat a lidí se nepříznivé účinky mohou projevit i při sladování obilovin, a to narušením metabolické činnosti kvasinek vlivem interakce epoxidového kruhu s thiolovými skupinami enzymu alkoholdehydrogenázy. Samotné kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* jsou schopné absorpce toxinů na buněčnou stěnu, a tím přispět k redukci celkového obsahu mykotoxinů v konečném produktu (Nathanail *et al.*, 2016). Z tohoto důvodu mohou být využity jako aditiva v krmném průmyslu (Terzi *et al.*, 2014). Kromě toho mohou mykotoxiny biotransformovat na maskované formy, případně je z vázaných forem reaktivovat. Autoři Nathanail *et al.* (2016) se ve své práci zabývali účinkem kvasinek *Saccharomyces pastorianus* na obsah trichothecenů během kvašení. Sledována byla schopnost redukce toxinů během 96hodinové fermentace. Obsah DON byl snížen o 15 %, D3G o 17 %, T-2 o 31 % a HT-2 o 34 %. U toxinu D3G nedošlo k reaktivaci na DON, a ani při koncentraci toxinů 10,000 µg/L nedošlo k významnému ovlivnění životaschopnosti nebo metabolické činnosti kvasinek (Nathanail *et al.* 2016). Pozitivní účinky v oblasti inhibice růstu fuzárií a detoxifikace DON během fermentace byly zaznamenány i u bakterií mléčného kvašení. Autoři Juodeikiene *et al.*, (2018) ve své práci publikují antifungální účinky supernatantů získaných po kultivaci bakterií *Lactobacillus sakei*, *Pediococcus acidilactici* a *Pediococcus pentosaceus*, a to zejména vůči *F. poae* a *F. culmorum*. Suspenze těchto bakterií navíc dokázala snížit obsah mykotoxinů, a to konkrétně DON o 23 %, T-2 toxin o 34 % a HT-2 toxin o 58 % oproti původní koncentraci. Dle autorů jsou antifungální účinky prisuzovány působení sekundárních metabolitů těchto bakterií, kam patří kyselina mléčná, kyselina octová, fenolické sloučeniny, kyselina benzoová a bakteriociny (Juodeikiene *et al.*, 2018).

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Přístroje a pomůcky

Horkovzdušný sterilizátor Sterimat (BMT Medical Technology s.r.o., ČR), parní sterilizátor Sterilab (BMT Medical Technology s.r.o., ČR), termostat (POL-EKO, Polsko), horkovzdušná sušárna 122A (BMT Medical Technology s.r.o., ČR), mraznička (Whirpool, USA), chladnička (Liebherr, Spolková republika Německo), zařízení pro měření aktivity vody (AW Sprint Novasina TH-500, Švýcarsko) mikroskop (Nikon Eclipse e200), mikroskop (Olympus BX 41) s kamerou (Nikon, Japonsko), PCR termocyklér Biometra (Analytik Jena, Spolková republika Německo), zdroj napětí (POL-EKO, Polsko), zdroj ultrafialového záření (UV) pro detekci PCR produktu (Vilber Lourmat, Spolková republika Německo), běžné jednorázové laboratorní pomůcky a nádobí, plastové květinové truhlíky, elektroforetické vany pro vertikální elektroforézu (Thermo Fisher, Scientific, ČR), třepačka vortex (Biosan, Litva), třepačka Labnet Orbit 1900 (LAB MARK a.s., ČR), odstředivka (OneMed, Indonésie), chromatografická kolona Ascentis<sup>®</sup> Express C18 (150 × 3 mm × 2,7 μm částice; Supelco, USA), sušící vana s přívodem dusíku (Miulab, Čína), kapalinový chromatograf ve spojení s hmotnostním spektrometrem QTRAP 4500 (AB SCIEX, Framingham, USA), který obsahoval 2 čerpadla mobilní fáze LC-20AD (Shimadzu, Japonsko; vysokotlaký gradient), směšovač mobilní fáze (Shimadzu, Japonsko), autosampler SIL-20A (Shimadzu, Japonsko), kolonový termostat LCO 102 single (Ecom, Česká republika).

### 2.2 Materiál

Semena Hvozdík karafiát mix *Dianthus caryophyllus* (MoravoSeed, ČR), substrát pro výsev a množení rostlin (AGRO CS, ČR), substrát pro pelargonie a pokojové rostliny (AGRO CS, ČR), zahradnický substrát (AGRO CS, ČR), primery o sekvencích viz tabulka 3 (Biotech, ČR), One Taq DNA polymeráza včetně pufrů 5U/μl (Biolabs, Nová Anglie, USA), dNTP mix 10 mM (Top-Bio s.r.o., ČR), MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Thermo Fisher Scientific, ČR), PCR voda (Top-Bio s.r.o., ČR), DNA marker 200-1500 pb. a 100-500 pb. (Top-Bio s.r.o., ČR), vkladací pufr (Top-Bio s.r.o., ČR), agaróza SERVA (SERVA Electrophoresis GmbH, Spolková republika Německo), sada pro izolaci DNA NucleoSpin<sup>®</sup> Plant II (Macherey-Nagel, Spolková republika Německo), netkaná textilie Perlan (Vyroubal Textiles s.r.o., ČR), polyetraflourethylenový (TPFE) filtr (velikost pórů 0,45 μm) (Labicon, ČR).

### 2.3 Použité sbírkové kmeny plísní

Viz tabulka 4

Tabulka 3 Sekvence použitých primerů

Primer	Sekvence (5'-3')	Detekce	Velikost produktu (pb.)	Zdroj
Its 1 Its 2	GCA TGC CTG TTC GAG CGT CTG TTG CCG CTT CAC TCG C	<i>Fusarium spp.</i>	300	Ramana <i>et al.</i> (2011)
ITSF ITSR	AAC TCC CAA ACC CCT GTG AAC ATA TTT AAC GGC GTG GCC GC	<i>Fusarium spp.</i>	431	Bluhm <i>et al.</i> (2002)
Tox5F Tox5R	GCT GCT CAT CAC TTT GCT CAG CTG ATC TGG TCA CGC TCA TC	<i>Tri5</i> gen	658	Niessen a Vogel (1998)
FA-U17F FA-U17R	CAA GCA TTG TCG CCA CTC TC GTT TGG CTC TAC CGG GAC TG	<i>F. avenaceum</i> <i>F. tricinctum</i>	345	Turner <i>et al.</i> (1998)
Fg16F Fg16R	CTC CGG ATA TGT TGC GTC AA GGT AGG TAT CCG ACA TGG CAA	<i>F. graminearum</i>	400-500	Nicholson <i>et al.</i> (1998)
FSpoF1 LanSpoR1	CGC ACA ACG CAA ACT CAT C TAC AAG AAG AGC GTG GCG ATA T	<i>F. sporotrichioides</i>	310	Wilson <i>et al.</i> (2004)
FP82F FP82R	CAA GCA AAC AGG CTC TTC ACC TGT TCC ACC TCA GTG ACA GGT T	<i>F. poae</i>	220	Parry a Nicholson (1996)
FlangF3 LanSpoR1	CGC ACA ACG CAA ACT CAT C TAC AAG AAG AGC GTG GCG ATA T	<i>F. langsethiae</i>	332	Wilson <i>et al.</i> (2004)
Tri1 Tri2	CGT GTC CCT CTG TAC AGC TTT GA GTG GTT ACC TCC CGA TAC TCT	<i>F. tricinctum</i>	215	Kulik (2008)

Tabulka 4 Použité kmeny plísní. Označení CCF značí kmeny původem ze sbírky kultur hub přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy Praha. Označení CCM a CCM F značí sbírkové kultury z České sbírky mikroorganismů při Masarykově univerzitě, Brno. Zbytek plísní je původem ze sbírky katedry biologických a biochemických věd Univerzity Pardubice.

Rod <i>Fusarium</i>	Ostatní rody plísní
<i>F. culmorum</i> CCM F-163	<i>Cladosporium</i> spp.
<i>F. culmorum</i> CCF-1839	<i>Alternaria</i> spp.
<i>F. graminearum</i> CCF-1626	<i>Trichothecium roseum</i> CCM 352
<i>F. graminearum</i> CCM F-683	<i>Aspergillus brasiliensis</i> CCM 8222
<i>F. austroamericanum</i> CCM 8244	<i>Trichoderma viridae</i> CCM F-486
<i>F. poae</i> CCM F-584	<i>Mucor racemosus</i> CCM 8190
<i>F. poae</i> CCM F-169	<i>Epicoccum nigrum</i> CCM 1811
<i>F. sporotrichioides</i> CCF-3212	<i>Eurotium repens</i> CCF
<i>F. sporotrichioides</i> CCM F-352	<i>Verticillium</i> spp.
<i>F. equiseti</i> CCF-1747	
<i>F. avenaceum</i> CCM-8015	

## 2.4 Chemikálie

Etanol 96 % (Top-Bio s.r.o., ČR), Chloroform (Lach-Ner s.r.o., ČR), Ethidium Bromid 10 mg/ml (Top-Bio s.r.o., ČR), Glycerin (Lachema, ČR),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Penta, ČR), KCl (Lach-Ner s.r.o., ČR),  $\text{KNO}_3$  (Lachema, ČR),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Lachema, ČR), Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) (Sigma Aldrich, USA), Kyselina diethylaminoctová (EDTA) (AppliChem, Spolková republika Německo), Kyselina boritá (Sigma Aldrich, Francie), SAVO® Original (Bochemie a.s., ČR), Acetonitril (Sigma Aldrich, USA), Kyselina mravenčí (Sigma Aldrich, USA), Ethylacetát (Lach-Ner s.r.o., ČR), deionizovaná voda Mili-Q (Merk, Spolková republika Německo), analytické standardy DON, NIV, T-2 a HT-2 toxin 100 µg/ml (Fluka® Analytical, USA).

## 2.5 Použité pufrы

Složení pufrů použitých v předložné práci uvádí tabulka 5.

Tabulka 5 Složení pufrů. Označení IGEPAL CA-630 představuje Oktylfenoxý poly(ethyleneoxy)etanol, DMSO značí dimethylsulfoxid.

<b>1x One Taq Standard reakční pufr</b>	<b>1x One Taq GC reakční pufr</b>
20 mM Tris-HCl (pH 8,9 při 25 °C)	80 mM Tris- $\text{SO}_4$ (pH 9,2 při 25 °C)
1,8 mM $\text{MgCl}_2$	2 mM $\text{MgSO}_4$ ,
2 mM KCl,	20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
0,06 % IGEPAL CA-630	5 % glycerol
0,05 % Tween 20	5 % DMSO
	0,06 % IGEPAL CA-630,
	0,05 % Tween 20
<b>Pufr pro elektroforetickou separaci TBE 10 x</b>	<b>g/1000 ml</b>
TRIS	108 g
Kyselina boritá	55 g
EDTA	5,84

Reakční pufrы byly zakoupeny spolu s One Taq polymerázou. Jejich složení nebylo upravováno. Podle potřeby bylo pracováno s dvojnásobnou koncentrací One Taq Standard reakčního pufru. One taq GC reakční pufr byl používán jako 10% obsah z celkového množství pufru.

V případě přípravy Tris-borátového pufru s EDTA (TBE pufru) 10x byly uvedené komponenty odváženy a doplněny destilovanou vodou na objem 1000 ml. Směs byla míchána

za tepla do úplného rozpuštění. Pro elektroforetickou separaci byl použit TBE pufr 1x, který byl připraven smícháním 1 dílu TBE pufru 10x a 9 dílů destilované vody.

## 2.6 Příprava a složení kultivačních médií

### 2.6.1 Karafiátový agar (CLA)

#### *Složení*

Agar	20 g/1000 ml
Karafiátové listy	3-4 ks/Petriho miska (průměr 9 cm)

Semena rostliny Hvozdík karafiát (*Dianthus caryophyllus*) byla zasazena do komerčně dostupného substrátu pro výsev a množení rostlin a pěstována při pokojové teplotě. Podle fáze růstu byly vzešlé rostlinky přesazovány do substrátu pro pelargonie a balkonové květiny ve směsi se zahradním substrátem. Pěstovány byly na slunném místě s pravidelnou zálivkou. Pro samotnou přípravu kultivačního média byly použity listy rostlin, prvotně po pěti měsících pěstování. Nastříhané listy byly ve skleněné Petriho misce sušeny při 70 °C po dobu 2 hodin a sterilizovány při 121 °C, 15 min. Po sterilizaci byly rozděleny do Petriho misek s obsahem 2% agaru (Himedia, Indie), předem sterilizovaného při 121 °C, 15 min a ochlazeného na teplotu 50-60 °C. Jedna miska obsahovala 2-3 ks listů. Fotodokumentace pěstování rostlin je uvedena v příloze A.

### 2.6.2 Speciální nutričně-chudý agar (SNA)

<i>Složení</i>	<i>g/500 ml</i>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5
KNO <sub>3</sub>	0,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,25
KCl	0,25
D-glukóza	0,1
Sacharóza	0,1
Agar	10

Do 500 ml destilované vody byly naváženy výše uvedené komponenty, směs byla promíchána a sterilizována při 121 °C, 15 min. Po ochlazení na teplotu 50-60 °C byl obsah rozdělen do Petriho misek. Před utužením byly do každé Petriho misky přidány 3-4 ks filtračního papíru, nastříhaného na čtverce o přibližné velikosti 2x2cm, které byly předem sterilizovány při 121 °C, 15 min.

### 2.6.3 Brambora-glukózový agar (PDA)

<i>Složení</i>	<i>g/1000 ml</i>
Bramborová infuze	4
D-glukóza	20
Agar	15
Konečné pH (při 25 °C)	5,6±0,2

V 1000 ml destilované vody bylo rozpuštěno 39 g směsi (Himedia, Indie), promícháno a sterilizováno při 121 °C, 15 min. Po ochlazení na teplotu 50-60 °C byl obsah rozdělen do Petriho misek.

### 2.6.4 Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC agar)

<i>Složení</i>	<i>g/1000 ml</i>
Pepton	5
D-glukóza	10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub>	0,5
Bengálská červeň	0,025
Chloramfenikol	0,1
Dichloran	0,002
Agar	15
Konečné pH (při 25 °C)	5,6±0,2

V 500 ml destilované vody bylo rozpuštěno 15,76 g směsi (Himedia, Indie), promícháno a sterilizováno při 121 °C, 15 min. Po ochlazení na teplotu 50-60 °C bylo ke směsi přidáno antibiotikum Chloramfenikol (Himedia, Indie), předem rozpuštěného ve 2 ml etanolu. Po důkladném promíchání byl obsah rozdělen do Petriho misek.

### 2.6.5 Dichloran Glycerol Medium Base (DG18)

<i>Složení</i>	<i>g/1000 ml</i>
Pepton	5
D-glukóza	10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0
MgSO <sub>4</sub>	0,5
Dichloran	0,002
Chloramfenikol	0,1
Agar	15
Konečné pH (při 25 °C)	5,6±0,2

Do 500 ml destilované vody bylo přidáno 110 g glycerolu a 15,8 g směsi (Himedia, Indie), promícháno a sterilizováno při 121 °C, 15 min. Po ochlazení na teplotu 50-60 °C byl obsah rozdělen do Petriho misek.

### 2.6.6 Sladinový agar (MALT agar)

<i>Složení</i>	<i>g/1000 ml</i>
Sladinový extrakt	30
Agar	15
Konečné pH (při 25 °C)	5,6±0,2

V 1000 ml destilované vody bylo rozpuštěno 45 g směsi (Himedia, Indie), promícháno a sterilizováno při 121 °C, 15 min. Po ochlazení na teplotu 50-60 °C byl obsah rozdělen do Petriho misek.

### 2.6.7 Brambora-glukózový bujon (PD bujon)

<i>Složení</i>	<i>g/1000 ml</i>
Bramborová infuze	4,0
D-glukóza	20
Konečné pH (při 25 °C)	5,1±0,2

V 1000 ml destilované vody bylo rozpuštěno 24 g směsi (Himedia, Indie), promícháno a sterilizováno při 121 °C, 15 min.



### 2.6.8 Sladinový bujon (MALT bujon)

<i>Složení</i>	<i>g/1000 ml</i>
Sladinový extrakt	17
Pepton	3,0
Konečné pH (při 25 °C)	5,4±0,2

V 1000 ml destilované vody bylo rozpuštěno 20 g směsi (Himedia, Indie), promícháno a sterilizováno při 121 °C, 15 min.

### 2.6.9 Rýže pro produkci mykotoxinů

<i>Složení</i>	<i>g (ml)</i>
Rýže	10
Destilovaná voda	7

Do Erlenmeyerovy baňky bylo naváženo 10 g komerčně dostupné rýže (Thai Jasmine Rice Golden Sun; 80 g sacharidů/100 g), přidáno 6 ml destilované vody a sterilizováno při 121 °C 15 min. Po sterilizaci bylo médium ponecháno 24 hodin při laboratorní teplotě a poté znovu sterilizováno při 121 °C, 15 min. Těsně před inokulací kultury bylo k rýži dodatečně přidáno 1 ml destilované vody, předem sterilizované při 121 °C, 15 min.

### 2.6.10 Fyziologický roztok s peptonem

<i>Složení</i>	<i>g/500 ml</i>
NaCl	4,25
Pepton	0,5

Do 500 ml destilované vody byly naváženy výše uvedené komponenty a směs byla sterilizována při 121 °C, 15 min.

Všechna výše uvedená média byla do dalšího použití skladována při + 4 °C, maximálně po dobu tří týdnů.

## 2.7 Pracovní postupy

### 2.7.1 Stanovení celkového počtu plísní a izolace rodu *Fusarium*

U dostupných vzorků byla nejprve zjištěna aktivita vody. Na základě výsledků bylo stanovení celkového počtu plísní provedeno dle české technické normy ČSN ISO 21527-2.

Ze vzorku ječmene bylo naváženo 10 g reprezentativního podílu a přidáno 90 ml fyziologického roztoku s peptonem. Homogenizace byla provedena v homogenizačním sáčku ručně, po dobu 2 min. Následně bylo první a druhé desítkové ředění inokulováno v dubletu na agar DG18 a volitelnou půdu DRBC. Při zpracování prvních vzorků byla uvedená ředění dodatečně inokulována na agar MALT. Kultivace probíhala v termostatu při 25 °C po dobu

7 dní s kontrolou po 2 a 5 dnech. Z přítomných kolonií byly izolovány ty, u kterých byl předpoklad, že se jedná o rod *Fusarium*. Izolace suspektních kolonií byla provedena na MALT agar s kultivací při 25 °C v termostatu po dobu 5-7 dní.

Ze vzorků, u kterých se výše uvedeným způsobem fuzária nepodařilo izolovat, bylo sterilně odebráno 10 zrn ječmene, které vykazovaly známky možného napadení plísněmi. Vybírána byla ta zrna, která se od ostatních lišila morfologicky, zejména svým zbarvením. Zrno bylo po dobu 2 min desinfikováno v 1% roztoku komerčně dostupného výrobku SAVO® original. Po desinfekci byla semena dvakrát oplachována sterilní vodou po dobu 1 min a následně sterilně přenesena na PDA. Misky byly umístěny do plastového sáčku a kultivovány v termostatu při 25 °C po dobu 4-5 dní. Z přítomných kolonií byly jako v předchozím případě izolovány ty, u kterých byl předpoklad, že se jedná o rod *Fusarium*.

### **2.7.2 Identifikace na základě makroskopických a mikroskopických znaků**

Kultivace za účelem identifikace probíhala při laboratorní teplotě na parapetu okna orientovaného na severní stranu. Makrokonidie byly vyšetřovány po kultivaci na CLA, mikrokonidie na SNA a celkový vzhled na PDA. Vzhled na PDA byl hodnocen po kultivaci 10-14 dní, konidie v závislosti na růstu a kondici kultury, maximálně po 4 týdnech. Identifikace probíhala podle Leslie a Summerell (2006) a Nelson *et al.*, (1998).

Pro identifikaci plísní *in situ* byly připraveny sklíčkové kultury. Na sterilní podložní sklíčko bylo nanášeno malé množství CLA nebo SNA, které bylo po zaočkování kultury překryto sterilním krycím sklíčkem. Kultivační médium CLA i SNA bylo stejného složení jako v případě jejich přípravy pro kultivaci klasickým způsobem. Sklíčko bylo umístěno do Petriho misky a podloženo sterilními kusy plastové očkovací kličky. Pod sklíčko bylo pipetováno 5 ml sterilní destilované vody, která byla během kultivace podle potřeby doplňována, tak aby nedošlo k úplnému vypaření. Kultivace byla provedena za podmínek uvedených v předchozím odstavci.

Makroskopické a mikroskopické znaky vybraných plísní rodu *Fusarium* jsou uvedeny v příloze B, respektive C.

### **2.7.3 Izolace DNA**

Pro izolaci fungální DNA byla zvolena izolační sada NucleoSpin® Plant II, stejně jako u autorů Schöneberg *et al.*, (2018) nebo Naef a Defágo, (2006). DNA plísní byla izolována dle návodu izolační sady, která obsahovala níže použité pufry, enzym RNázu a barevně značené kolonky s filtrem, respektive sorbentem. Zkratky uvedené za příslušným pufrem značí jeho obchodní název.

Volba kultivačního média pro získání mycelia spočívala podle charakteru růstu dané plísně na PDA. Jestliže se kultura vyznačovala růstem s produkcí bohatého vzdušného mycelia, byla kultivována na PDA. V opačném případě bylo pro kultivaci zvoleno 0,5 ml bramboro-glukózového bujónu. Podmínky kultivace byly v obou případech stejné, a to 25 °C po dobu 5-7 dní, v termostatu. Malé množství mycelia vytvořené na PDA bylo následně sterilně sejmutu z agaru do zkumavky Eppendorf. Mycelium, získané z bujónu bylo nejprve odstředěno při 15000 rpm po dobu 2 min. Bujón byl odpipetován, k myceliu přidáno 0,5 ml sterilní destilované vody a opět odstředěno při 15000 rpm po dobu 2 min. Následně byla voda odpipetována.

K získanému myceliu bylo přidáno 0,5 ml 96% etanolu a po dobu 3 s vortexováno. Etanol byl odpipetován, přidáno 200 µl lýzačního pufru (PL1) a 5 s vortexováno. Ke směsi bylo dále přidáno 100 µl téhož pufru a 10 µl enzymu RNázy o koncentraci 10 mg/l. Pomocí sterilní očkovací kličky byla směs důkladně homogenizována a následně inkubována při 65 °C 10 min. Po uplynutí této doby následoval přídavek 100 µl chloroformu, 10 s vortexováno a odstředěno při 15 000 rpm 10 min. Dále bylo pracováno s horní odstředěnou vrstvou.

Lyzát byl pipetován do kolonky s filtrem, označené fialovým pruhem. Filtrace byla podpořena odstředěním při 11 000 rpm po dobu 2 min. K filtrátu bylo přidáno 450 µl DNA vazného pufru (PC) a důkladně promícháno. Dále byla směs pipetována do kolonky se sorbentem, označené zeleným pruhem. Filtrace byla, podobně jako v předchozím případě, podpořena odstředěním při 11 000 rpm po dobu 1 min. Dále bylo pracováno s DNA adsorbované na sorbentu, filtrát byl odpipetován.

Do kolonky s adsorbovanou DNA bylo přidáno 400 µl promývacího pufru (PW1) a odstředěno při 11 000 rpm po dobu 1 min. Tento krok byl opakován s 700 µl promývacího pufru (PW2). Následně bylo k sorbentu dodatečně přidáno 200 µl pufru (PW2) a odstředěno při 11 000 rpm po dobu 2 min. Kolonka se sorbentem byla umístěna do sterilní zkumavky Eppendorf a přidáno 50 µl elučního pufru (PE), předem zahřátého na 65 °C. Zkumavka byla inkubována při 65 °C po dobu 5 min a následně odstředěna při 11 000 rpm po dobu 1 min. Krok byl opakován s novým podílem PE pufru. Získaná DNA byla zpočátku uchovávána při teplotě + 4 °C, po provedení všech experimentů při -20 °C.

#### **2.7.4 Optimální podmínky PCR a příprava reakčních směsí**

Primery byly prvotně rozpuštěny v množství PCR vody uvedeného výrobcem na koncentraci 100 µM. Z těchto roztoků byly připraveny pracovní roztoky o koncentraci 10 µM, které byly uchovávány v množství 100 µl. V jednotlivých i multiplex reakcích bylo pracováno

v celkovém objemu 25  $\mu$ l. Všechny reagenty byly pipetovány do sterilní zkumavky typu Eppendorf. První pipetovanou složkou byla PCR voda, dále pufr, primery, dNTP mix a polymeráza. Směs byla důkladně promíchána a patřičný podíl pipetován do reakčních PCR zkumavek. Poslední přidávanou složkou byla DNA, která byla izolována podle postupu uvedeného v kapitole 2.7.3, a to v množství 0,5 nebo 1  $\mu$ l. V každé reakci byla použita patřičná pozitivní kontrola v podobě DNA kmene, který pocházel z české sbírky mikroorganismů, nebo izolátu, předem identifikovaného na základě makroskopických a mikroskopických znaků. Současně byla vždy provedena negativní kontrola, kde místo DNA bylo použito stejné množství sterilní PCR vody. Komponenty pro přípravu byly s výjimkou DNA skladovány při teplotě -20 °C. Rozmrazeny byly vždy na dobu nezbytně nutnou před vlastní přípravou směsi a v co možná nejkratším časovém intervalu byly umístěny zpět do -20 °C.

Kombinace primerů použitých v multiplex PCR byla zvolena tak, aby se rozdíl poskytovaných produktů lišil minimálně o 100 pb. Toto opatření zajišťovalo spolehlivé hodnocení výsledků i v případě, že by docházelo k odlišným produktům reakce v rámci jednotlivých kmenů plísní. Na základě tohoto uvážení byly zoptimalizovány tři multiplexní a jedna samostatná PCR.

### 2.7.5 Identifikace rodu *Fusarium* a průkaz *Tri5* genu

Finální koncentrace jednotlivých složek reakční směsi byla následující: One Taq standard reakční pufr s 10% obsahem One Taq GC reakčního pufru 2x, 4,5 mM Mg<sup>2+</sup>, 100  $\mu$ M dNTP mix, 0,1  $\mu$ M primer FusITsF a FusITsG, 0,4  $\mu$ M primer Tox5F a Tox5R, 2 U One Taq polymeráza a 1  $\mu$ l DNA. Optimální podmínky „Touchdown“ PCR jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6 Optimální podmínky multiplex PCR pro identifikaci rodu *Fusarium* a průkaz *Tri5* genu

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Úvodní denaturace	96	1 min	
	94	3 min	
Denaturace	95	30 s	10
Annealing	65-60	45 s	Teplota - 0,5 °C/cyklus
Syntéza	72	1 min	
Denaturace	95	30 s	20
Annealing	60	1 min	
Syntéza	72	1 min	
Závěrečná syntéza	72	10 min	

### 2.7.6 Identifikace *F. avenaceum/tricinatum*, *F. graminearum* a *F. sporotrichioides*

Jednotlivé složky byly použity v následující konečné koncentraci: One Taq standard reakční pufr s 10% obsahem One Taq GC reakčního pufru 2x, 4 mM Mg<sup>2+</sup>, 200 μM dNTP mix, 0,2 μM primer Fa-U17F a Fa-U17R, 0,3 μM primer FG16F a FG16R, 0,2 μM primer FSPOF1 a LANSOR1, 2 U One Taq polymeráza a 0,5 μl DNA. Optimální podmínky „Touchdown“ PCR jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7 Optimální podmínky multiplex PCR pro identifikaci *F. avenaceum/tricinatum*, *F. graminearum* a *F. sporotrichioides*

Krok	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Úvodní denaturace	96	1 min	
	94	3 min	
Denaturace	95	30 s	10
Annealing	67-62	45 s	Teplota -0,5 °C/cyklus
Syntéza	72	1 min	
Denaturace	95	30 s	25
Annealing	60	1 min	
Syntéza	72	1 min	
Závěrečná syntéza	72	10 min	

### 2.7.7 Identifikace *F. poae* a *F. langsethiae*

V tomto případě byly použity složky o koncentraci: One Taq standard reakční pufr s 10% obsahem One Taq GC reakčního pufru 2x, 4 mM Mg<sup>2+</sup>, 200 μM dNTP mix, 0,2 μM primer FP82F a FP82R, 0,2 μM primer FLANGF3 a LANSPOR1, 2 U One Taq polymeráza a 0,5 μl DNA. Optimální podmínky „Touchdown“ PCR jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8 Optimální podmínky multiplex PCR pro identifikaci *F. poae* a *F. langsethiae*

Krok	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Úvodní denaturace	96	1 min	
	94	3 min	
Denaturace	95	30 s	10
Annealing	67-62	45 s	Teplota -0,5 °C/cyklus
Syntéza	72	1 min	
Denaturace	95	30 s	25
Annealing	60	1 min	
Syntéza	72	1 min	
Závěrečná syntéza	72	10 min	

### 2.7.8 Specifická identifikace *F. tricinctum*

V této samostatné reakci bylo pracováno s následujícími finálními koncentracemi: One Taq standard reakční pufr 1x, 1,8 mM Mg<sup>2+</sup>, 0,2 mM dNTP mix, 0,2 mM primer Tri1 a Tri2, 1 U One Tag polymeráza a 0,5 µl DNA. Optimální podmínky reakce jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 9 Optimální podmínky PCR pro identifikaci *F. tricinctum*

Krok	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Úvodní denaturace	94	2 min 30 s	
Denaturace	95	30 s	30
Annealing	65	30 s	
Syntéza	72	55 s	
Závěrečná syntéza	72	3 min	

### 2.7.9 Elektroforetická separace produktů PCR

Pro separaci úseků DNA byl zvolen 1,5% agarózový gel v 1x TBE pufru s obsahem ethidium bromidu o koncentraci 0,5 µg/ml. Patřičné množství agarózy bylo naváženo do 1x TBE pufru, promícháno a přivedeno k varu v mikrovlnné troubě (2 min, při výkonu 600 W). Po ochlazení gelu na přibližnou teplotu 60 °C bylo přidáno potřebné množství ethidium bromidu a promícháno. Gel byl umístěn do elektroforetické vany, vložen hřebínek pro vytvoření jamek a ponechán při laboratorní teplotě do úplného ztuhnutí.

Pro vlastní elektroforezu bylo použito 10 µl produktu, smíchaného s 2 µl vkladacího pufru. Spolu s produktem byl separován DNA marker, který byl dávkován v množství 5 µl. Separace probíhala za podmínek 100 V po dobu 50 min v 1x TBE pufru. Vizualizace produktu byla uskutečněna pomocí UV záření (254 nm). Velikosti jednotlivých PCR produktů jsou uvedeny v tabulce 3.

### 2.7.10 Produkce a extrakce mykotoxinů

Kultury plísní, u kterých byla prokázána přítomnost *Tri5* genu, a tedy schopnost produkce trichothecenových mykotoxinů byly za účelem produkce mykotoxinů kultivovány podle prací Shi *et al.*, (2017), Kokkonen *et al.*, (2010) a Alvarez *et al.*, (2009).

Z kultur kultivovaných na PDA po dobu 7 dní při 25 °C v termostatu byl korkovrtem o průměru 6 cm vyražen kus agarů s myceliem a sterilně přenesen do kultivačního média. Pro kultivaci bylo zvoleno 10 ml bramboro-glukózového bujonu, sladinového bujonu a 10 g komerčně dostupné rýže (úprava rýže viz kapitola 2.6.10.). V případě produkce trichothecenů skupiny B probíhala kultivace při 25 °C v termostatu, v případě skupiny A při 15 °C v termostatu, v obou případech po dobu 4 týdnů. Zaočkování bylo provedeno v dubletu. Od

každého kultivačního média byla současně připravena negativní kontrola. V čase po ukončení kultivace až do dalšího zpracování byly kultury uchovávány při -20 °C.

Extrakce mykotoxinů byla provedena dle prací He *et al.*, (2017) a Covarelli *et al.*, (2015). V případě tekutých médií bylo nejprve filtrací přes perlan oděleno mycelium. Z filtrátu bylo odpipetováno 1 ml média a přidány 3 ml ethylacetátu. Směs byla třepána při 200 rpm/min po dobu 10 min. Organická vrstva byla oddělena a ke zbytku byl přidán nový podíl ethylacetátu. Extrakce byla provedena celkem třikrát, přičemž organická vrstva byla ze všech extrakcí zpracována v jednom podílu. V případě sledování produkce mykotoxinů na rýži bylo pro extrakci naváženo přibližné množství 2,5 g rýže včetně mycelia, přidáno 10 ml extrakčního činidla (acetonitril:voda:kyselina mravenčí; 84:16:1) a třepáno při 200 rpm/min po dobu 120 min. Získaný extrakt byl odpipetován od pevného podílu.

Rozpouštědlo bylo následně odpařeno pod proudem dusíku do sucha a zbylý extrakt skladován při -20°C. Před analýzou byl analyt opětovně rozpuštěn v 1 ml acetonitrilu a přefiltrován přes PTFE filtr.

### 2.7.11 Analýza mykotoxinů

Analýza mykotoxinů byla provedena pomocí HPLC/MS. Kromě trichothecenových mykotoxinů byl do analýzy zařazen i mykotoxin zearalenon (ZON), který může být produkován některými druhy fuzárií zodpovědné za vznik fuzariózy klasů (Wegulo *et al.*, 2015). Nejprve byla provedena přímá infuze analytů do hmotnostního spektrometru za podmínek uvedených v tabulce 10. Následně byla metoda optimalizována (podmínky viz tabulka 11). Sledované ionty a retenční časy látek jsou uvedeny v tabulce 12.

Tabulka 10 Parametry pro přímou infuzi analytů do hmotnostního spektrometru

<b>Parametr</b>	<b>Hodnota</b>
Typ ionizace	Elektrosprej (ESI, ESI <sup>+</sup> )
Napětí na kapiláře	- (+) 4500 V
Kolizní plyn	medium
Plyny podporující rozprašování a sušení mobilní fáze	„ion source gas“ 1: 20 psi „ion source gas“ 2: 0 psi „curtain gas“ 10 psi
Průtok	7 µl/min
Vstupní potenciál	-10 V

Tabulka 11 Optimální podmínky pro HPLC/MS analýzu

Parametr	Hodnota
<b>HPLC</b>	
Složení mobilní fáze	A: Deionizovaná voda + 0,05 mM NH <sub>4</sub> COOH + 0,1 % HCOOH B: Acetonitril
Gradient mobilní fáze	0 min: 15 % B, 3 min: 100 % B
Průtok mobilní fáze	0,5 ml/min
Objem nástřiku	5 µl
Teplota kolony	30 °C
<b>MS</b>	
Typ ionizace; skenování	ESI <sup>-</sup> , ESI <sup>+</sup> ; selektivní záznam iontu (SIM)
Napětí na kapiláře	- (+) 4500 V
Kolizní plyn	medium
Plyny podporující rozprašování a sušení mobilní fáze	„ion source gas“ 1: 40 psi „ion source gas“ 2: 50 psi „curtain gas“ 20 psi
Doba skenování	50 ms

Tabulka 12 Retenční časy, sledované adukty a deklasterační potenciály analyzovaných mykotoxinů

Mykotoxin	Retenční čas [min]	Adukt	m/z	DP [V]
<b>ESI<sup>-</sup></b>				
NIV	1,68	[M+HCOO] <sup>-</sup>	357	-30
DON	2,25	[M+HCOO] <sup>-</sup>	341	-30
D3G	2,00	[M+HCOO] <sup>-</sup>	503	-90
HT-2	3,57	[M+HCOO] <sup>-</sup>	469	-60
T-2	4,01	[M+HCOO] <sup>-</sup>	511	-60
ZON	4,16	[M - H] <sup>-</sup>	317	-115
<b>ESI<sup>+</sup></b>				
DON	2,25	[M+H] <sup>+</sup>	297	-70
D3G	2,00	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	476	-70
HT-2	3,57	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	442	-70
T-2	4,01	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	484	-70
ZON	4,16	[M+H] <sup>+</sup>	319	-70

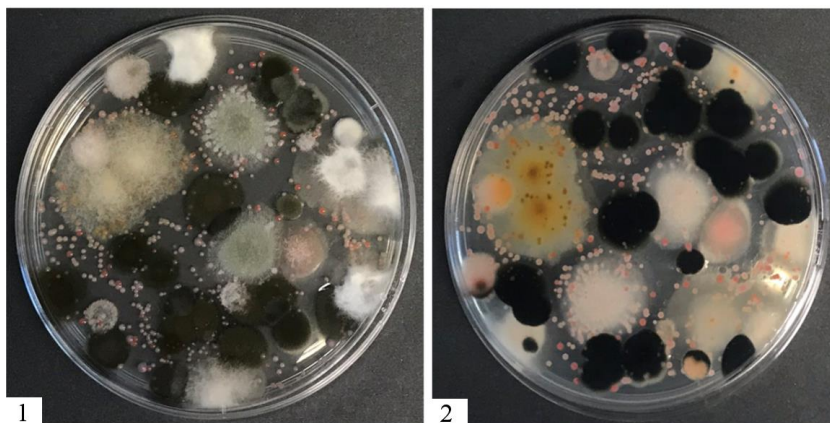


### 3 VÝSLEDKY

#### 3.1 Stanovení celkového počtu plísní a izolace rodu *Fusarium*

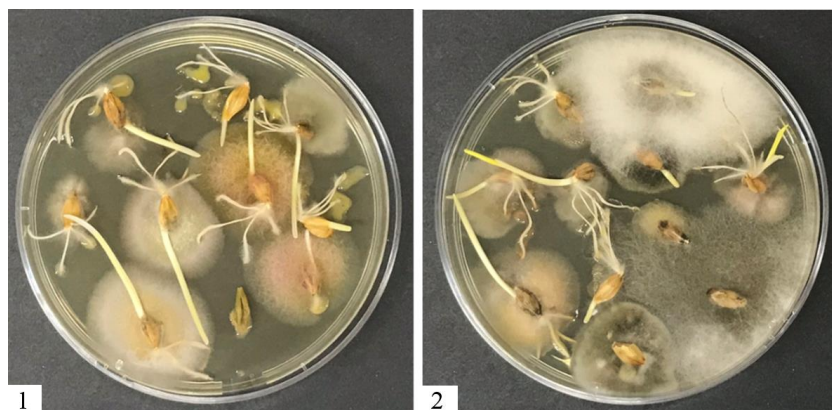
Dohromady bylo zpracováno 27 vzorků sladovnického ječmene, původem z Výzkumného pivovarského a sladařského ústavu v Brně. Celkové počty plísní, které byly na základě výsledků měření aktivity vody a dle normy ČSN ISO 21527-2 vyjádřeny na živné půdě DG18 jsou uvedeny v příloze D.

Ve vzorcích ječmene se kromě rodu *Fusarium* vyskytovala i doprovodná mikroflóra v podobě jiných rodů plísní a kvasinek. Z tohoto důvodu byla fuzária izolována na základě posouzení makroskopických znaků. Izolovány byly kolonie, které rostly v podobě bílého nebo krémového až světle hnědého mycelia (viz obrázek 5). Izolace byla ve většině případů provedena z agaru DG18, méně často z půdy DRBC. MALT agar, který byl v prvním případě použit za účelem zvýšené možnosti záchytu fuzárií, byl pro zpracování dalších vzorků vyřazen. Důvodem byl nárůst nespécifikovaného bakteriálního druhu, který byl doprovázen tvorbou slizu po 48hodinové kultivaci. Pravděpodobně se jednalo o rod *Bacillus*, jehož růst byl na půdách DG18 a DRBC inhibován.



Obrázek 5 II. ředění vzorku č. 23 na DG18 po kultivaci 7 dní při 25 °C (1 líc, 2 rub). Izolovány byly suspektní kolonie s růstem v podobě bílého a krémově zbarveného mycelia. (Foto autor).

V případě, že nedošlo k nárůstu plísní na dvou výše zmiňovaných půdách, byla pro cílenou izolaci zvolena kontaktní metoda na PDA, přičemž suspektní kolonie rodu *Fusarium* byly vybírány stejným způsobem (viz obrázek 6). V tomto případě byla bakteriální kontaminace částečně omezena použitým desinfekčním prostředkem.



Obrázek 6 Kontaktní metoda izolace. 1: vzorek 27, 2: vzorek 13. Kultivace 3 dny při 25 °C na PDA. (Foto autor).

Suspektní kolonie rodu *Fusarium* byly, za účelem opětovného makroskopického posouzení, kultivovány na agaru MALT. V některých případech došlo k izolaci kultur, které dle makroskopických znaků nepatřily do rodu *Fusarium*. Důvodem byla vzájemná podobnost některých plísní na agaru DG18, která byla odlišena až na zmiňovaném MALT agaru. Někdy bylo prvotně docíleno izolace směsné kultury, která byla podrobena nové izolaci.

Dvěma výše uvedenými postupy bylo celkem vyizolováno 131 suspektních kolonií rodu *Fusarium*, u kterých byla provedena podrobnější identifikace.

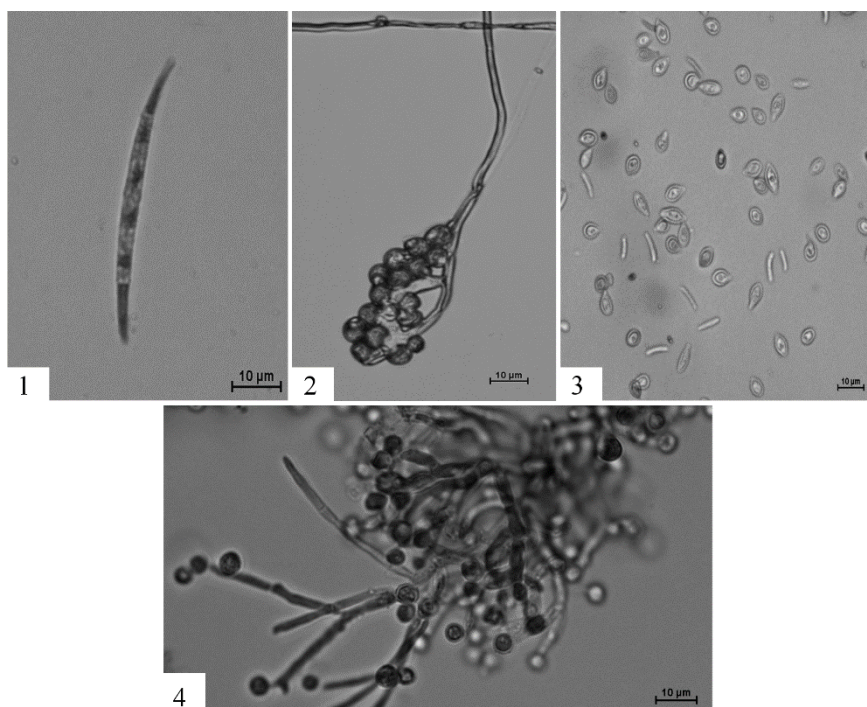
### 3.2 Identifikace na základě morfologických znaků

Vzhledem k tomu, že pro plánovanou identifikaci fuzárií pomocí PCR, nebyly dostupné všechny kmeny pocházející z oficiálních sbírek mikroorganismů v ČR, byly izoláty podrobeny prvotní identifikaci na základě makroskopických a mikroskopických znaků. Předběžná identifikace druhu byla následně ověřena pomocí druhově specifické PCR, přičemž v některých případech byly identifikované izoláty použity jako pozitivní kontroly pro další analýzy.

Tímto způsobem bylo identifikováno *F. langsethiae*, na jehož přítomnost upozornil práškovitý vzhled kolonií již po izolaci na agar MALT. Po inokulaci na SNA a provedení mikroskopického preparátu do laktofenolové modře byly pozorovány charakteristické mikrokonidie tvaru kapky, monofialidy (viz obrázek 7), absence větvenovitých mikrokonidií, makrokonidií a chlamydospór. Obdobně bylo určeno *F. poae*, které se vyznačovalo charakteristickým nasládlým pachem již během izolace z DG18. Mikroskopický preparát, provedený z SNA, byl téměř totožný s výše popsaným u *F. langsethiae*, rozdíl obou kultur spočíval v rychlosti růstu a tvorbě mycelia. *F. poae* vytvářelo v porovnání s *F. langsethiae* bohaté vzdušné mycelium, které se za stejných podmínek kultivace rychleji rozrůstalo. Obrázek 7 zobrazuje fialidy s mikrokonidiemi druhu *F. poae* pozorovaných *in situ*.

Vzhledem k tomu, že se počátek optimalizace podmínek PCR pro druhovou identifikaci *F. avenaceum/tricinatum* potýkal s problémy amplifikace DNA sbírkového kmene *F. avenaceum* CCM F-8015, byla mezi izoláty věnována pozornost i tomuto druhu. Pro hodnocení morfologických znaků byly v tomto případě vybírány ty izoláty, u kterých nebyla prokázána přítomnost *Tri5* genu. Makrokonidie suspektního izolátu *F. avenaceum* byly štíhlé, tří až pěti septované se zakulacenou apikální a bazální buňkou, která byla mírně zahnutá (viz obrázek 7). Spolu s makrokonidiiemi byly v preparátu připraveného z SNA pozorovány oválné mikrokonidie, které byly bez sept nebo maximálně s jednou přehrádkou. Přítomné mikrokonidie indikovaly možný druh *F. arthrosporioides*.

Z izolátů bez přítomnosti *Tri5* genu bylo dále identifikováno *F. tricinctum*. V preparátu, připraveného po kultivaci na SNA bylo pozorováno značné množství mikrokonidií oválných tvarů, dále tvarů citronů a hrušek (viz obrázek 7).



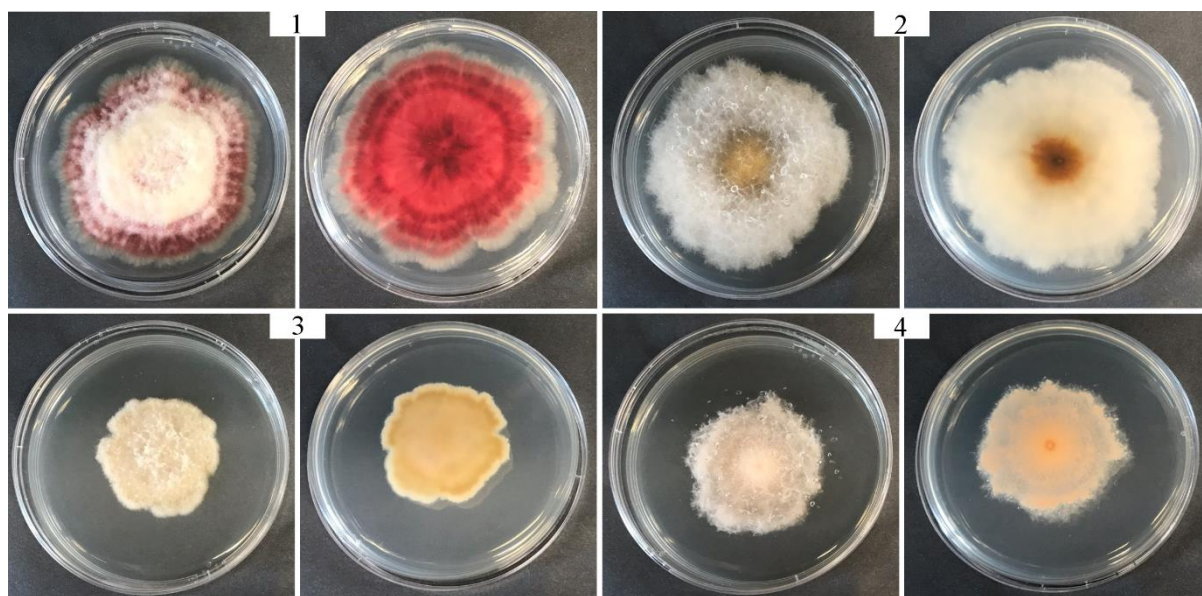
Obrázek 7 Mikroskopické znaky izolátů rodu *Fusarium*. 1 makrokonidie *F. avenaceum* v preparátu z CLA, 2 mikrokonidie *in situ* *F. poae* na SNA, 3 mikrokonidie *F. tricinctum* v preparátu z SNA, 4 monofialidy s mikrokonidiiemi *F. langsethiae* v preparátu z SNA. Zvětšení 40 x 10 (400x). (Foto autor).

Při hodnocení makroskopických znaků bylo pozorováno, že izoláty i sbírkové kultury neprodukují pigment, který je pro ně podle obecného popisu charakteristický. Ačkoli je morfologie variabilní a měla by být hodnocena jako sekundární charakter, je produkován pigment nebo charakter růstu prvním znakem, který napomáhá identifikaci.

Při hledání příčiny nestandardního růstu bylo pro srovnání použito kultivační médium, respektive PDA firmy Oxoid (Velká Británie). Kultury byly zaočkovány paralelně na PDA



(Oxoid, Velká Británie) a PDA (Himedia, Indie) a kultivovány za podmínek uvedených v kapitole 2.7.2. Po kultivaci byl pozorován rozdíl v rychlosti růstu a produkci pigmentu, jak je možné vidět na obrázku 8. Složení PDA (Oxoid, Velká Británie) je dle výrobce zcela identické s PDA (Himedia, Indie) (složení viz kapitola 2.6.3.). Obě kultivační média se ale pravděpodobně liší kvalitou použitých vstupních surovin, neboť základem pro výrobu je extrakt získaný z brambor.



Obrázek 8 Rozdílné makroskopické znaky na PDA. 1 a 3 *F. graminearum* CCM F-683, 2 a 4 *F. tricinctum* (izolát 2). Horní řada PDA (Oxoid, Velká Británie), dolní řada PDA (Himedia, Indie). Vlevo líc, vpravo rub kolonie. Kultivace: laboratorní teplota, parapet okna, 8 dní. (Foto autor).

### 3.3 Optimalizace PCR podmínek

Amplifikace DNA příčnými primery byla prvotně provedena v samostatné reakci. Následně bylo přistoupeno k optimalizaci podmínek pro multiplex PCR. Optimalizace byla provedena dle obecného protokolu pro „Touchdown“ PCR (Korbie a Mattick 2008) a obecného protokolu pro multiplex PCR (Henegariu *et al.*, 1997) a spočívala v úpravě podmínek času, počtu cyklů v jednotlivých fázích a změn v koncentraci reakční směsi.

#### 3.3.1 Identifikace plísní rodu *Fusarium* a průkaz *Tri5* genu

Pro identifikaci rodu *Fusarium* byl zvolen primer ITS1 a ITS2 navržený Ramana *et al.*, (2011), citovaném autory Gong *et al.*, (2014) a Yli-Matilla *et al.*, (2017). Podmínky PCR, zvoleny dle prvotní publikace Ramana *et al.*, (2011), nevyžadovaly optimalizaci. Byl proveden teplotní gradient, ve kterém bylo zjištěno, že optimální teplota annealingu (58 °C) je shodná s teplotou uvedenou autory práce. Po ověření amplifikace DNA plísní rodu *Fusarium* bylo provedeno ověření specifity primeru vůči plísním odlišných rodů, které mohou být spolu s fuzáriemi potenciálně izolovány z obilovin. Bylo zjištěno, že uvedený primer poskytuje

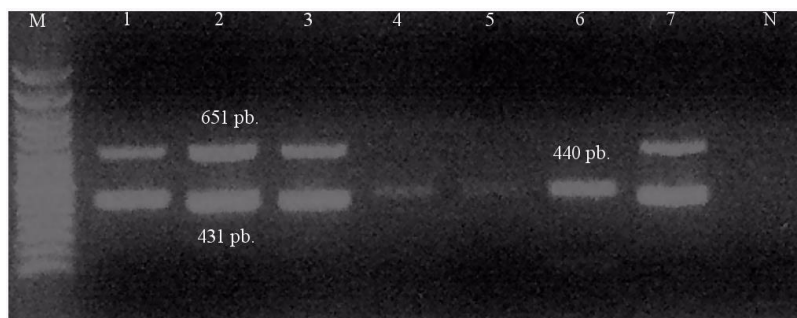
produkt o stejné velikosti párů bazí s různými rody plísní (viz tabulka 13), a proto byl pro analýzy neznámých izolátů vyřazen.

Dalším primerem pro rodovou identifikaci byl ItsF-ItsR navržený autory Bluhm *et al.*, (2002), použitým autory Naef a Défago (2006), kteří ve své práci využili metodu „Step Down“ PCR s teplotou annealingu 64-60 °C, měnící se v intervalu pěti cyklů. V této práci byla od počátku zvolena metoda „Touchdown“ PCR s teplotou annealingu 70-60 °C snižující se o 1 °C s každým cyklem na konečných 60 °C. Za těchto podmínek byla provedena amplifikace DNA sbírkových plísní rodu *Fusarium* a ověření specifity primeru jako v předchozím případě. Produkt reakce o velikosti 431 pb., byl získán pouze s plísněmi rodu *Fusarium*, nikoli s dalšími testovanými rody plísní. Velikost poskytovaného produktu odpovídala u fuzárií patřících do genetického komplexu *sambucinum* velikosti uvedené Bluhm *et al.*, (2002). Kmeny patřících do odlišných genetických komplexů (především *Fusarium tricinctum* species komplex) poskytly produkt reakce o přibližné velikosti 440 pb.

Pro identifikaci kmenů rodu *Fusarium* se schopností produkce trichothecenových mykotoxinů byl zvolen primer Tox5F/Tox5R, prokazující přítomnost *Tri5* genu, který je prvním genem v biochemické cestě syntézy trichothecenů typu A i B (viz obrázky 3 a 4).

Po ověření amplifikace DNA v samostatné reakci za identických podmínek jako v případě ItsF-ItsR bylo přistoupeno k optimalizaci multiplex PCR. Pro optimalizaci byla zpočátku zvolena DNA *Fusarium sporotrichioides* CCM F-3212. Po nastavení podmínek opakování cyklů a času dle standardního protokolu pro multiplex PCR bylo navýšeno množství pufru, koncentrace MgCl<sub>2</sub>, množství enzymu polymerázy a z důvodu slabého produktu určujícího přítomnost nebo nepřítomnost *Tri5* genu bylo nutné upravit vzájemné koncentrace obou primerů.

Po zkoušce metody s ostatními sbírkovými kmeny fuzárií nebylo zpočátku zcela možné správně vyhodnotit pozitivní/negativní reakci určující přítomnost *Tri5* genu. Z tohoto důvodu byl do reakce dodatečně přidán G/C One Taq standard reakční pufr za současného snížení teploty fáze annealingu v rozmezí 65-60 °C, měnící se o 0,5 °C s každým cyklem. Konečné optimalizované podmínky jsou uvedeny v tabulce 6 a znázorněny na obrázku 9.



Obrázek 9 Optimalizované podmínky amplifikace úseku ITS a průkaz *Tri5* genu. 1-7 amplifikace ITS a *Tri5* genu izolátů rodu *Fusarium*, M: DNA marker 1500-200 pb., N: negativní kontrola.

U některých izolátů (později identifikovaných jako *F. tricinctum*) byl amplifikovaný produkt v porovnání s ostatními slabší intenzity, tak jak je možné pozorovat na obrázku 9 pod označením 4 a 5. Nicméně, i tak bylo možné pozitivní reakci amplifikace úseku ITS správně vyhodnotit.

### 3.3.2 Identifikace *F. avenaceum/tricinctum*, *F. graminearum* a *F. sporotrichioides*

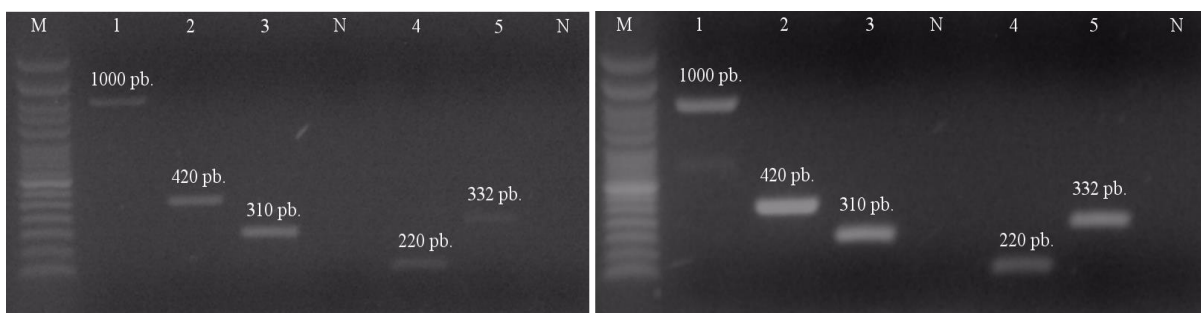
V tomto případě bylo pracováno dle Nicholson *et al.*, (2004), kteří využili druhově specifické primery pro identifikaci plísní rodu *Fusarium* (viz tabulka 3) za podmínek „Touchdown“ PCR. Podobně jako v předchozím případě byla nejprve ověřena amplifikace příslušné DNA v samostatné reakci při teplotě annealingu 72-62 °C, snižující se s každým cyklem na konečných 62 °C. Pro optimalizaci byly využity DNA plísní *F. graminearum* CCF-1626, *F. sporotrichioides* CCF-3212 a izolát *F. avenaceum*, respektive *F. arthrosporioides*, který byl prvotně identifikován dle makroskopických a mikroskopických znaků (viz kapitola 3.2.), neboť sbírková DNA kmene *F. avenaceum* CCM-8015 nebyla zpočátku v samostatné reakci zcela amplifikována.

K optimalizaci multiplex podmínek bylo přistupováno stejným způsobem jako v kapitole 3.3.1. Konečné optimalizované podmínky jsou uvedeny v kapitole 2.7.6. Hlavní úpravy reakční směsi spočívaly v koncentraci primeru Fg16F/R, specifického pro *F. graminearum*, který byl vzhledem k ostatním koncentračně zvýhodněn. Pro zvýšení intenzity výsledků byl počáteční celkový počet cyklů reakce zvýšen ze 30 na 35 (viz obrázek 10). Amplifikace *F. graminearum* i *F. sporotrichioides* poskytla očekávané produkty reakce, a sice 420 pb. pro *F. graminearum* a 332 pb. pro *F. sporotrichioides*. V případě izolátů *F. avenaceum* bylo namísto očekávaného produktu o velikosti 345 pb., dosaženo produktu o velikosti 1000 pb. Po optimalizaci byla specifita primerů ověřena s kmeny *F. poae* (izolát 1) a *F. langsethiae* (izolát 21), jejichž DNA nebyla za těchto podmínek amplifikována.

### 3.3.3 Identifikace *F. poae* a *F. langsethiae*

Podobně jako v kapitole 3.3.2. bylo využito „Touchdown“ PCR dle Nicholson *et al.*, (2004). V tomto případě bylo opět pracováno s DNA získaných z izolátů ječmene, identifikovaných na základě makroskopických a mikroskopických znaků (viz kapitola 3.2.). Důvodem byla absence *F. langsethiae* v obou dostupných sbírkách mikroorganismů v ČR a počáteční problémy amplifikace DNA s použitými kmenem *F. poae* CCF M-584. Poté, co se amplifikace DNA tohoto kmene nepodařila za podmínek navržených autory Nicholson *et al.*, (2004), byl kmen podroben makroskopickému a mikroskopickému vyšetření. Tak jak je uvedeno v kapitole 3.4., byl tento druh později pomocí PCR reklasifikován na *F. sporotrichioides*.

DNA obou izolátů poskytla očekávané produkty reakce, a sice 330 pb. s primerem FLANGF3/LANSPOR1 specifickým pro *F. langsethiae* a 220 pb. s primerem FP82F/R, specifickým pro *F. poae*. Optimalizace multiplex podmínek byla i v tomto případě provedena podobně jako v kapitole 3.3.1., přičemž pro zvýšení intenzity produktů byl počet cyklů navýšen z původních 30 na 35 (viz obrázek 10). Optimalizované multiplex podmínky jsou uvedeny v tabulce 8. Stejně jako v předchozím případě byla specifita primerů ověřena vůči kmenům, které byly použity jako pozitivní kontroly v kapitole 3.3.2., přičemž k pozitivním reakcím u těchto kmenů nedošlo.



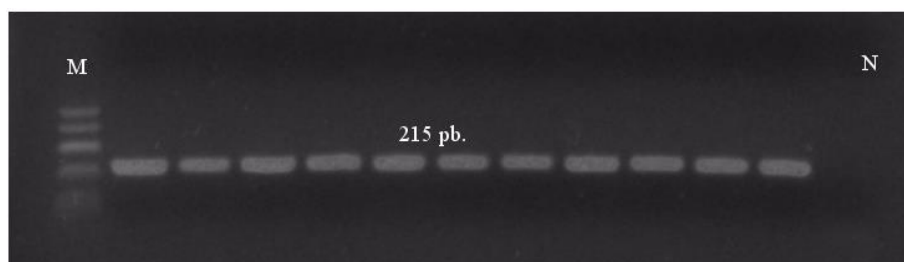
Obrázek 10 Optimalizované podmínky PCR pro druhovou identifikaci. Vlevo 30 cyklů, vpravo 35 cyklů.  
1: *F. avenaceum/tricinatum*; 2: *F. graminearum*, 3: *F. sporotrichioides*, 4: *F. poae*, 5: *F. langsethiae*.  
M: DNA marker 200-1500 pb., N: negativní kontrola

Jak vyplývá z kapitol výše, optimalizace PCR pro druhovou identifikaci rodu *Fusarium* byla provedena tak, aby mohly být obě směsi analyzovány současně, tedy za identických reakčních podmínek.

### 3.3.4 Specifická identifikace *F. tricinctum*

V tomto případě bylo prvotně pracováno za obecných PCR podmínek dle návrhu autora příslušného primeru (Kulik, 2008). V rámci optimalizace byl autorem navrhovaný počet cyklů (35) snížen na konečných 30, čímž došlo ke snížení časové náročnosti zhruba o půl hodiny.

První kulturou, která byla podrobena této identifikaci byl izolát 2, jehož mikroskopické znaky zcela odpovídaly popisu *F. tricinctum* (viz kapitola 3.2.). Po reakci byl pozorován očekávaný produkt reakce, a sice 215 pb. (viz obrázek 11).



Obrázek 11 Optimální podmínky PCR pro identifikaci *F. tricinctum*. M: DNA marker 100-500 pb., N: negativní kontrola.

Po optimalizaci podmínek byla ověřena specifita primeru s kmeny *F. avenaceum* CCM F-8015, *F. sporotrichioides* CCF-3212, *F. poae* (izolát 1), *F. langsethiae* (izolát 21) jejichž reakce byla negativní.

### 3.4 Identifikace plísni rodu *Fusarium* a ověření přítomnosti *Tri5* genu

Zjištění přítomnosti *Tri5* genu a ověření amplifikace úseku ITS bylo nejprve provedeno u sbírkových plísni rodu *Fusarium*. Výsledky uvádí tabulka 13. Tabulka mimo jiné zobrazuje výsledky testu specifity primerů použitých pro průkaz úseku ITS rDNA rodu *Fusarium*.



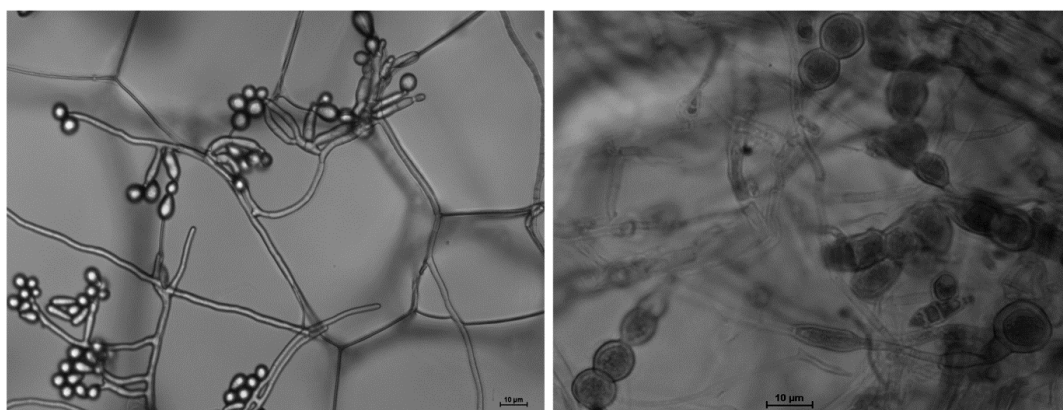
Tabulka 13 Amplifikace úseku ITS a průkaz *Tri5* genu. Symbol ✓ značí pozitivní reakci, symbol × značí negativní reakci, zkratka nt.: netestováno.

Plíseň	ITS (Ramana <i>et al.</i> , 2011)	ITS (Bluhm <i>et al.</i> , 2002)	<i>Tri5</i> gen
<i>F. culmorum</i> CCM F-163	✓	✓	✓
<i>F. culmorum</i> CCF-1839	✓	✓	×
<i>F. culmorum</i> CCF-1745	nt.	✓	✓
<i>F. graminearum</i> CCF-1626	✓	✓	✓
<i>F. graminearum</i> CCM F-683	✓	✓	✓
<i>F. austroamericanum</i> CCM 8244	✓	✓	✓
<i>F. poae</i> CCM F-584	✓	✓	✓
<i>F. poae</i> CCMF-169	✓	✓	✓
<i>F. sporotrichioides</i> CCF-3212	✓	✓	✓
<i>F. sporotrichioides</i> CCM F-352	✓	✓	✓
<i>F. equiseti</i> CCF-1747	✓	✓	✓
<i>F. avenaceum</i> CCM-8015	✓	✓	×
<i>Cladosporium</i> spp.	✓	×	×
<i>Alternaria</i> spp.	✓	×	×
<i>Penicillium purpurogenum</i> CCM F-257	✓	×	×
<i>Trichothecium roseum</i> CCM 352	×	×	×
<i>Aspergillus brasiliensis</i> CCM 8222	✓	×	×
<i>Trichoderma viridae</i> CCM F-486	✓	×	×
<i>Mucor racemosus</i> CCM 8190	✓	×	×
<i>Epicoccum nigrum</i> CCM 1811	nt.	×	×
<i>Eurotium repens</i>	nt.	×	×
<i>Verticillium</i> spp.	nt.	×	×
<i>Scopulariopsis brumptii</i> CCF 3192	nt.	×	×

Na základě výsledků byla amplifikace úseku ITS izolátů provedena pomocí primeru navrženého autory Bluhm *et al.*, (2002). Primer Its1/Its2 (Ramana *et al.*, 2011) byl po ověření specifity pro další analýzy vyřazen z důvodu amplifikace DNA plísní jiných rodů.

Vzhledem k tomu, že identifikace sbírkových kmenů byla provedena pouze na základě hodnocení makroskopických a mikroskopických znaků, byla ověřována jejich totožnost pomocí multiplex reakcí, uvedených dříve. Na základě výsledků byla identifikace potvrzena u kmenů *F. graminearum* CCM F-683, *F. sporotrichioides* CCM F-352, a *F. poae* CCM F-169. Pozitivní reakci s primerem Fg16F/R byla zaznamenána i u *F. austroamericanum* CCM 8244, neboť tento druh je členem *Fusarium graminearum* species komplex (Boutigny *et al.*, 2014). Velikost produktu byla stejná jako v případě obou sbírkových kmenů *F. graminearum* (420 pb.).

Identita nebyla potvrzena u kmene *F. poae* CCM F-584. Po vyšetření mikroskopických znaků tohoto kmene bylo v preparátu po kultivaci na SNA pozorováno značné množství chlamydospor a *in situ* monofialidy a polyfialidy, některé nesoucí vřenovité mikrokonidie (viz obrázek 12). Tento druh fuzária je dle Leslie a Summerell (2006) snadno zaměnitelný s druhy *F. sporotrichioides* nebo *F. tricinctum*, přičemž *F. poae* produkuje chlamydospory zřídka a vytváří pouze monofialidy (Leslie a Summerell, 2006). S přihlédnutím k těmto informacím, bylo *F. poae* CCM F-584 podrobena identifikaci pomocí multiplex PCR (kapitola 3.3.2.), přičemž došlo k amplifikaci jeho DNA s primerem specifickým pro identifikaci *F. sporotrichioides*. Daný kmen tak byl na základě svých makroskopických a mikroskopických znaků původně chybně identifikován a pomocí PCR reklasifikován na *F. sporotrichioides*.



Obrázek 12 Mikroskopické znaky *F. poae* CCM F-584, reklasifikované na *F. sporotrichioides*. Vlevo fialidy s mikrokonidiiemi *in situ* na SNA. Vpravo chlamydospory v preparátu z SNA. Zvětšení 40 x 10 (400x). (Foto autor).

Prvotní identifikace tohoto druhu na základě makroskopických a mikroskopických znaků byla provedena v rámci české sbírky mikroorganismů při Masarykově univerzitě, Brno. Daný kmen tak byl pod označením *F. poae* CCM-584 již zakoupen.

Z celkových 131 izolovaných kmenů ze vzorků ječmene bylo 72 identifikováno stejným způsobem jako sbírkové kmeny rodu *Fusarium*.

Počet izolátů (72), které byly analyzovány, vycházel ze dvou parametrů. Nejprve byl hodnocen makroskopický a mikroskopický vzhled kultur a současně bylo přihlédnuto, z jakého konkrétního vzorku byly získány. Jestliže bylo z jednoho vzorku izolováno větší množství fuzárií, které byly dle svých znaků identické, byl vybrán jeden zástupce, který byl ověřován pomocí PCR. Ostatní byly předběžně vyhodnoceny jako totožné s daným ověřovaným kmenem (59). Jako v předchozím případě byla nejprve provedena amplifikace úseku ITS spolu s průkazem *Tri5* genu. V případě pozitivní amplifikace ITS dle Bluhm *et al.*, (2002) byla následně provedena druhová identifikace jednotlivých izolátů (viz tabulka 14). Ta byla

primárně uskutečněna pomocí optimálních podmínek druhově-specifických multiplex PCR. Jestliže DNA nebyla v tomto případě amplifikována, byl izolát označen jako *Fusarium* spp.

Tabulka 14 Výsledky identifikace suspektních izolátů a průkaz *Tri5* genu. Symbol ✓ značí pozitivní reakci, symbol × značí negativní reakci a symbol ---- znamená izolát plísně jiného rodu než *Fusarium*.

Izolát	ITS	<i>Tri5</i> gen	Druhá identifikace
1	✓	✓	<i>F. poae</i>
2	✓	×	<i>F. avenaceum/tricinatum</i>
3	✓	✓	<i>F. poae</i>
4	✓	×	<i>Fusarium</i> spp.
5	✓	✓	<i>F. poae</i>
6	✓	✓	<i>F. sporotrichioides</i>
7	✓	✓	<i>F. poae</i>
8	✓	✓	<i>F. sporotrichioides</i>
9	✓	✓	<i>F. poae</i>
10	✓	×	<i>Fusarium</i> spp.
11	✓	✓	<i>F. langsethiae</i>
12	✓	✓	<i>F. poae</i>
13	✓	×	<i>Fusarium</i> spp.
14	✓	×	<i>F. avenaceum/tricinatum</i>
15	✓	✓	<i>F. poae</i>
16	✓	✓	<i>F. poae</i>
17	✓	×	<i>F. avenaceum/tricinatum</i>
18	✓	✓	<i>F. poae</i>
19	✓	×	<i>F. avenaceum/tricinatum</i>
20	✓	×	<i>F. avenaceum/tricinatum</i>
21	✓	✓	<i>F. langsethiae</i>
22	✓	✓	<i>F. poae</i>
23	✓	✓	<i>F. langsethiae</i>
24	✓	✓	<i>F. sporotrichioides</i>
25	✓	✓	<i>F. poae</i>
26	✓	✓	<i>F. poae</i>
27	✓	×	<i>F. avenaceum/tricinatum</i>
28	✓	×	<i>F. avenaceum/tricinatum</i>
29	✓	×	<i>F. avenaceum/tricinatum</i>
30	✓	✓	<i>F. poae</i>
31	×	×	---
32	✓	×	<i>F. avenaceum/tricinatum</i>
33	✓	✓	<i>F. poae</i>
34	✓	×	<i>F. avenaceum/tricinatum</i>
35	✓	×	<i>F. avenaceum/tricinatum</i>
36	✓	×	<i>F. avenaceum/tricinatum</i>
37	✓	✓	<i>F. poae</i>
38	✓	×	<i>F. avenaceum/tricinatum</i>
39	✓	×	<i>Fusarium</i> spp.
40	✓	✓	<i>F. poae</i>
41	✓	✓	<i>F. poae</i>
42	✓	×	<i>F. avenaceum/tricinatum</i>

Tabulka 14, pokračování. Výsledky identifikace suspektních izolátů a průkaz *Tri5* genu. Symbol ✓ značí pozitivní reakci, symbol × značí negativní reakci a symbol ---- znamená izolát plísně jiného rodu než *Fusarium*.

Izolát	ITS	<i>Tri5</i> gen	Druhá identifikace
43	✓	✓	<i>F. poae</i>
44	✓	×	<i>Fusarium</i> spp.
45	✓	×	<i>F. avenaceum/tricinatum</i>
46	✓	✓	<i>F. langsethiae</i>
47	✓	×	<i>Fusarium</i> spp.
48	✓	✓	<i>F. poae</i>
49	✓	×	<i>F. avenaceum/tricinatum</i>
50	×	×	----
51	×	×	----
52	×	×	----
53	✓	✓	<i>F. poae</i>
54	✓	✓	<i>F. poae</i>
55	×	×	----
56	✓	×	<i>F. avenaceum/tricinatum</i>
57	✓	×	<i>F. avenaceum/tricinatum</i>
58	✓	×	<i>F. avenaceum/tricinatum</i>
59	✓	×	<i>F. avenaceum/tricinatum</i>
60	✓	✓	<i>F. poae</i>
61	✓	✓	<i>F. poae</i>
62	✓	×	<i>F. avenaceum/tricinatum</i>
63	✓	✓	<i>F. poae</i>
64	✓	×	<i>Fusarium</i> spp.
65	✓	✓	<i>F. poae</i>
66	×	×	----
67	×	×	----
68	✓	×	<i>F. avenaceum/tricinatum</i>
69	✓	×	<i>Fusarium</i> spp.
70	✓	×	<i>Fusarium</i> spp.
71	✓	×	<i>Fusarium</i> spp.
72	×	×	----

Jak uvádí tabulka 14, u některých izolátů nebylo ITS amplifikováno. Jednalo se o ty kmeny, u kterých nebylo možné správně vyhodnotit mikroskopické znaky, neboť u některých z nich bylo v preparátu i po delší době kultivace pozorováno pouze mycelium, což je pro zařazení do rodu nedostačujícím kritériem. Vzhledem k tomu, že metoda byla za použití primeru navrženého autory Bluhm *et al.*, (2002) vyhodnocena jako specifická pouze pro identifikaci plísni rodu *Fusarium*, mohly být tyto izoláty spolehlivě vyhodnoceny jako plísně jiných rodů, přičemž byly pro další identifikaci vyřazeny.

U všech izolovaných kmenů, které patří k významným producentům trichothecenových mykotoxinů (*F. poae*, *F. sporotrichioides* a *F. langsethiae*) byla prokázána přítomnost

*Tri5* genu. Tento gen nebyl prokázán ani u jednoho kmene identifikovaných jako *F. avenaceum/tricinatum* nebo *Fusarium* spp.

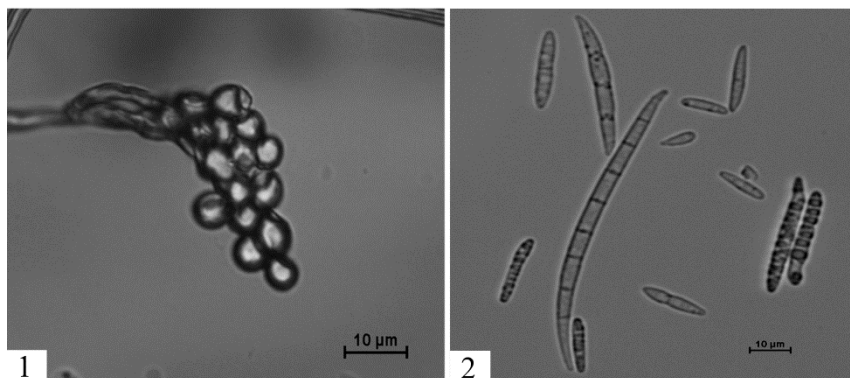
Izoláty, primárně určené jako *F. avenaceum/tricinatum*, byly podrobeny dodatečné reakci umožňující specifickou identifikaci v rámci genetického komplexu *Fusarium tricinctum* species komplex (viz tabulka 15). Všechny vyšetřované kultury tak byly na základě amplifikace s primerem Tri1/Tri2 vyhodnoceny jako *F. tricinctum*, čemuž ve většině případů nasvědčovalo předem provedené mikroskopické vyšetření. Vyjimku tvořily izoláty 14 a 27, u kterých mikroskopické znaky odpovídaly druhům *F. avenaceum* nebo *F. arthrosporioides*.

Tabulka 15 Výsledky identifikace členů *F. tricinctum* species komplex. Symbol ✓ značí pozitivní reakci, symbol × značí negativní reakci.

Izolát	FaU-17F/FaU-17R	Tri1/Tri2
2	✓	✓
4	×	✓
10	×	✓
13	×	✓
14	✓	✓
17	✓	✓
19	✓	✓
20	✓	✓
27	✓	✓
28	✓	✓
29	✓	✓
32	✓	✓
34	✓	✓
35	✓	✓
36	✓	✓
38	✓	✓
42	✓	✓
44	×	✓
45	✓	✓
49	✓	✓
56	✓	✓
57	✓	✓
58	✓	✓
59	✓	✓
62	✓	✓
68	✓	✓

Tabulka 15 mimo jiné uvádí izoláty (konkrétně čísla 4, 10, 13 a 44), které z neznámých příčin nebyly identifikovány pomocí primeru FaU-17F/FaU-17R, ačkoli byly později určeny jako *F. tricinctum*. Důvod, proč byly dodatečně testovány pomocí primeru Tri1/Tri2 byly jejich mikroskopické znaky, které odpovídaly popisu druhu *F. tricinctum*. Amplifikace s primerem FaU-17F/FaU-17R nebyla opakována, neboť izolát byl již specificky identifikován pomocí Tri1/Tri2 a provedení dalších reakcí bylo omezeno z časových důvodů.

Produkt s primerem Tri1/Tri2 byl zaznamenán i u izolátů 14 a 27, ačkoli mikroskopické znaky těchto kultur zcela neodpovídají popisu *F. tricinctum*. Porovnání konidií uvádí obrázek 13. Podle předběžných odhadů na základě vyšetření na CLA a SNA byly považovány za druhy *F. avenaceum* nebo *F. arthrosporioides*.

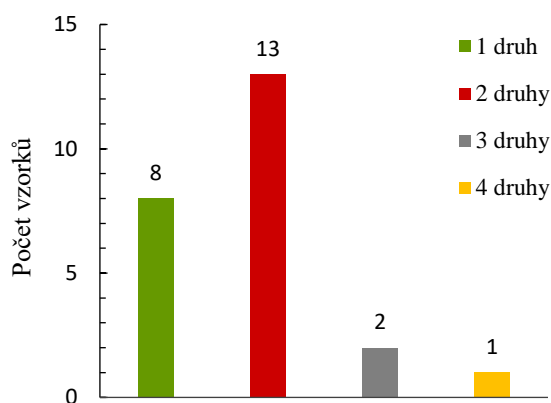


Obrázek 13 Mikroskopické znaky izolátů rodu *Fusarium*. 1: mikrokonidie *F. tricinctum* in situ na SNA (izolát 2), 2: makrokonidie a mikrokonidie izolátu 14. Zvětšení 40x10 (400x). (Foto autor).

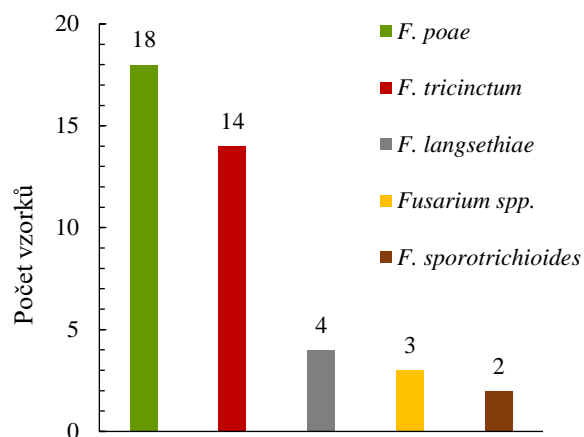
Zbývající kultury, u kterých byla zjištěna pozitivní reakce úseku ITS rDNA, ale nebyly identifikovány pomocí druhově-specifických PCR, byly také podrobeny mikroskopickému vyšetření. Na základě hodnocení makroskopických a mikroskopických znaků byl u některých proveden pokus o předběžnou druhovou identifikaci, respektive zařazení izolátu do genetického komplexu. Podle předběžných odhadů jsou zbylé izoláty členy *Fusarium fujikuroi* species komplex a *Fusarium equiseti* species komplex.

### 3.5 Hodnocení vzorků ječmene z hlediska plísni rodu *Fusarium*

Z 27 analyzovaných vzorků bylo 24 pozitivních na přítomnost plísni rodu *Fusarium*. U většiny z nich byly identifikovány 2 druhy fuzárií, méně často jeden druh, z několika vzorků byly izolovány i 3 druhy a v jednom případě až 4 druhy plísni rodu *Fusarium*. Druhová identifikace prokázala dominanci *F. poae*, které bylo přítomno v 18 vzorcích, a *F. tricinctum*, které bylo izolováno ze 14 vzorků. *F. langsethiae* bylo prokázáno ve 4 a *F. sporotrichioides* ve 2 různých vzorcích. Ani jeden vzorek ječmene nebyl pozitivní na přítomnost *F. gramineum*. Ze 3 vzorků byly izolovány druhy, jejichž identita nebyla v rámci rozsahu této práce pomocí PCR ověřena, a proto zůstaly označeny jako *Fusarium* spp. Shrnutí výše uvedeného hodnocení je uvedeno v grafech 1 a 2 a dále v tabulce 16.



Graf 2 Počet izolovaných druhů plísní rodu *Fusarium* z jednoho vzorku ječmene.



Graf 1 Zastoupení jednotlivých druhů izolovaných z 27 vzorků ječmene.

Tabulka 16 mimo jiné obsahuje informace o koncentraci T-2 a HT-2 toxinů, které byly stanoveny metodou ELISA ve Výzkumném ústavu pivovarském a sladařském v Brně. U vzorku označeného číslem 7 nebyla koncentrace těchto toxinů určena, ačkoli ječný slad získaný z tohoto vzorku byl příčinou přepěňování piva, což nasvědčuje možné přítomnosti fuzárií. Nicméně, výskyt těchto plísní nebyl po provedené izolaci zjištěn, stejně jako ve vzorcích označených čísly 10 a 21.

Tabulka 16 Druhová identifikace plísní rodu *Fusarium* v jednotlivých vzorcích ječmene. Symbol ---- značí vzorky, ze kterých nebyly plísně rodu *Fusarium* izolovány.

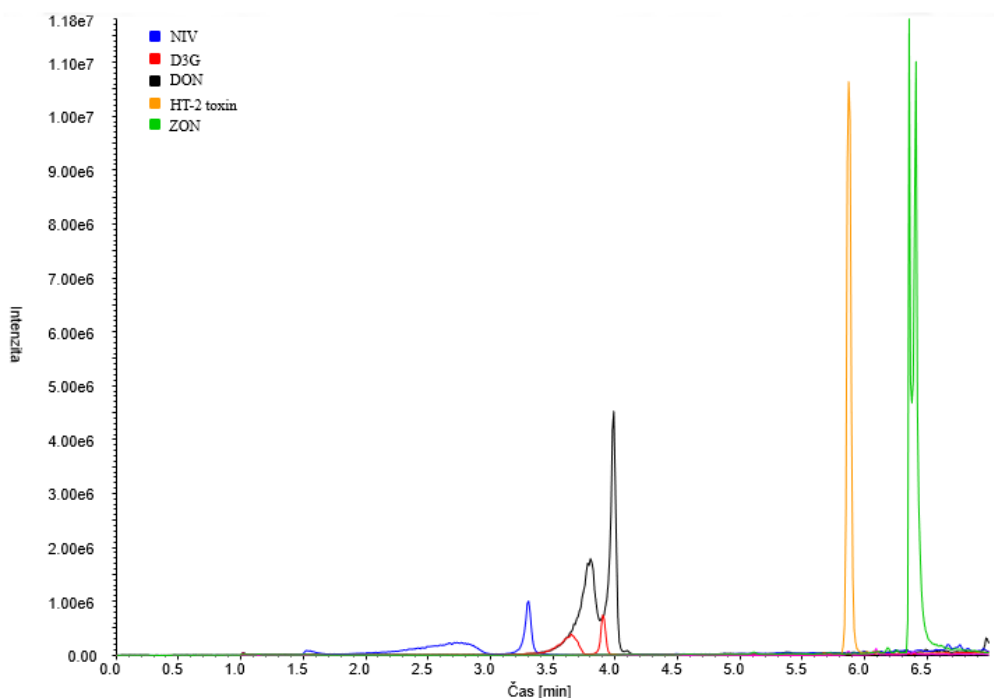
Vzorek	Identifikované druhy rodu <i>Fusarium</i>	$\Sigma$ T-2+HT-2 toxin ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
1	<i>F. poae</i> ; <i>F. langsethiae</i> ; <i>Fusarium</i> spp.	322,3
2	<i>F. tricinctum</i>	944,2
3	<i>F. poae</i>	356,6
4	<i>F. poae</i>	211,0
5	<i>F. tricinctum</i> ; <i>F. poae</i>	349,2
6	<i>F. poae</i>	3072,5
7	----	----
8	<i>F. tricinctum</i>	252,2
9	<i>Fusarium</i> spp.; <i>Fusarium</i> spp.	1169,5
10	----	<10
11	<i>F. poae</i> ; <i>Fusarium</i> spp.	312,3
12	<i>F. sporotrichioides</i>	219,9
13	<i>F. poae</i> , <i>F. tricinctum</i>	1247,0
14	<i>F. tricinctum</i>	239,6
15	<i>F. poae</i> ; <i>F. tricinctum</i>	318,4
16	<i>F. poae</i> ; <i>F. tricinctum</i>	277,7
17	<i>F. poae</i> ; <i>F. tricinctum</i>	358,8
18	<i>F. poae</i> ; <i>F. tricinctum</i>	1455,5
19	<i>F. poae</i> ; <i>F. tricinctum</i> ; <i>F. langsethiae</i>	324,5
20	<i>F. poae</i> ; <i>F. tricinctum</i>	288,8
21	----	225,1
22	<i>F. poae</i> ; <i>Fusarium</i> spp.	290,7
23	<i>F. poae</i> ; <i>F. tricinctum</i> ; <i>F. langsethiae</i> ; <i>F. sporotrichioides</i>	288,8
24	<i>F. poae</i> ; <i>F. tricinctum</i>	256,6
25	<i>F. poae</i> ; <i>F. tricinctum</i>	<10
26	<i>F. poae</i>	<10
27	<i>F. tricinctum</i> ; <i>F. langsethiae</i>	952,1

### 3.6 Optimalizace podmínek HPLC/MS pro detekci mykotoxinů

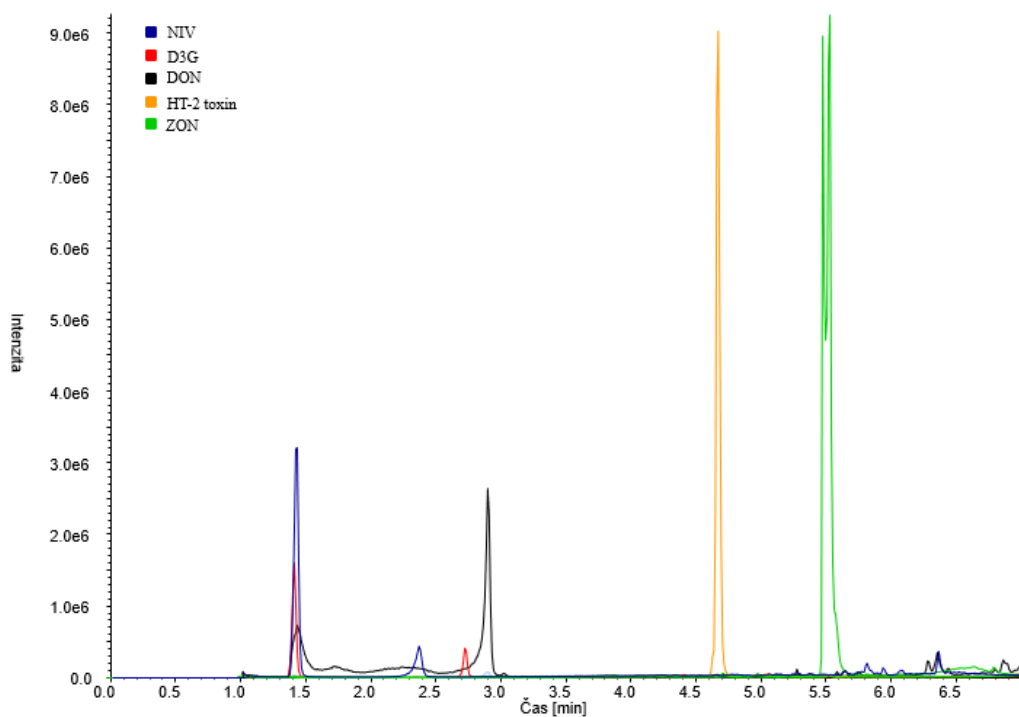
Pro optimalizaci podmínek detekce byl z jednotlivých standardů mykotoxinů připraven modelový vzorek, ve kterém koncentrace každého mykotoxinu dosahovala 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  v acetonitrilu. Ten byl prvotně použit pro přímou infuzi analytů do hmotnostního spektrometru



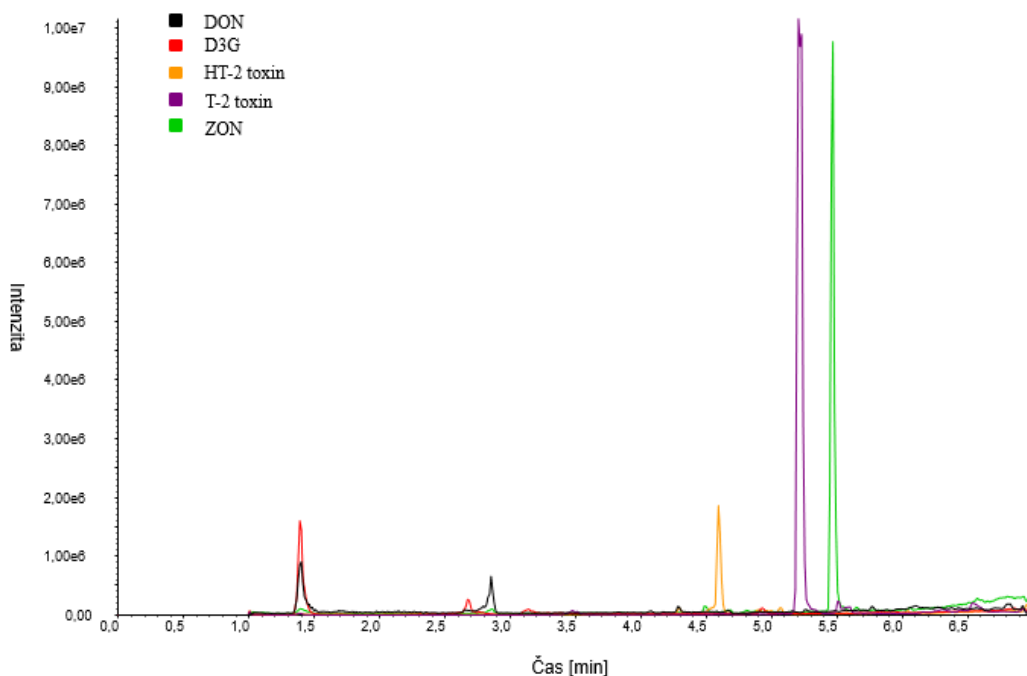
s cílem optimalizace specifických přechodů (MRM) včetně parametrů deklasteračního potenciálu (DP), kolizní energie (CE) a výstupního potenciálu kolizní cely (CXP). Následně bylo přistoupeno k optimalizaci podmínek separace, respektive složení mobilní fáze (MF). Jako organické rozpouštědlo byl nejprve zvolen metanol a dále byl testován přidavek aditiv do vodné složky v podobě kyseliny mravenčí a mravenčanu amonného. Při přidávku 0,1 % kyseliny mravenčí nedocházelo k dostatečné ionizaci sledovaných mykotoxinů, a proto byl přidán mravenčan amonný v koncentraci 5 a 1 mM. Vyšší koncentrace mravenčanu amonného způsobovala potlačení ionizace některých mykotoxinů. Postupným snižováním jeho koncentrace bylo zjištěno, že pro ionizaci analytů postačuje velmi malé množství (0,05 mM). Separace mykotoxinů za těchto podmínek je uvedena na obrázku 14, kde je možné pozorovat nežádoucí rozmývání píku deoxynivalenolu, deoxynivalenol-3-glukosidu a částečně i nivalenolu. Z tohoto důvodu byl metanol nahrazen acetonitrilem. Separace probíhající za těchto podmínek při snímání záporných iontů je uvedena na obrázku 15, separace při snímání kladných iontů na obrázku 16.



Obrázek 14 HPLC/MS separace mykotoxinů. Kolona Ascentis Express C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu$ m částice); teplota kolony 30 °C; MF: 0,05 mM  $\text{NH}_4\text{COOH}$  + 0,1 %  $\text{HCOOH}$  (A), metanol (B). Nástřik 5  $\mu$ l; skenování iontů ESI, SIM.

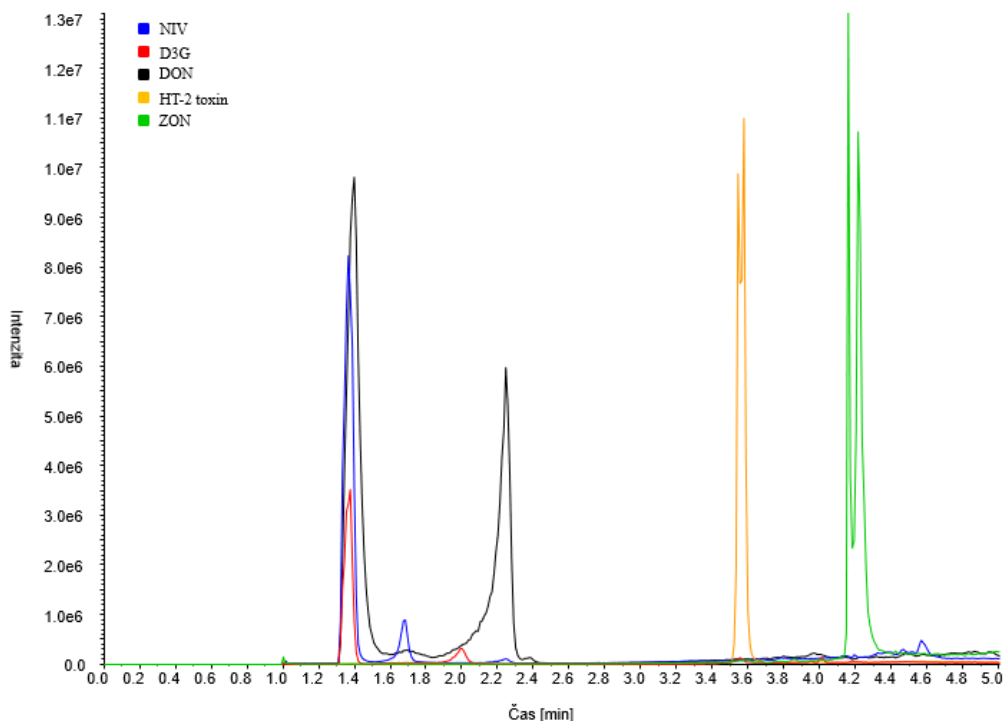


Obrázek 15 HPLC/MS separace mykotoxinů. Kolona Ascentis Express C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu$ m částice); teplota kolony 30 °C; MF: 0,05 mM  $\text{NH}_4\text{COOH}$  + 0,1 %  $\text{HCOOH}$  (A), acetonitril (B). Nástřik 5  $\mu$ l; skenování iontů  $\text{ESI}^+$ , SIM.



Obrázek 16 HPLC/MS separace mykotoxinů. Kolona Ascentis Express C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu$ m částice); teplota kolony 30 °C; MF: 0,05 mM  $\text{NH}_4\text{COOH}$  + 0,1 %  $\text{HCOOH}$  (A), acetonitril (B). Nástřik 5  $\mu$ l; skenování iontů  $\text{ESI}^+$ , SIM.

V posledním kroku optimalizace byla separace úpravou gradientu zkrácena zhruba o 1 minutu. Separace za těchto podmínek byla vyhodnocena jako optimální pro další analýzy a je uvedena na obrázku 17.



Obrázek 17 Finální separace mykotoxinů. Kolona Ascentis Express C18 (150 x 3 mm, 2,7  $\mu\text{m}$  částice); teplota kolony 30  $^{\circ}\text{C}$ ; MF: 0,05 mM  $\text{NH}_4\text{COOH}$  + 0,1 %  $\text{HCOOH}$  (A), acetonitril (B); Gradientová eluce: 15-100 % B za 3 min; nástřik 5  $\mu\text{l}$ ; skenování iontů ESI, SIM.

Dále byly optimalizovány MRM přechody pro sledování mykotoxinů při snímání záporných a kladných iontů, neboť pomocí této metody je možné dosáhnout vysoké selektivity a nízkých limitů detekce analyzovaných látek. Z technických a časových důvodů se zcela nepodařilo optimalizovat všechny parametry specifických přechodů, protože fragmentace některých aduktů byla obtížná. Za použití hodnot DP, CE a CXP, získaných po přímé infuzi analytů do hmotnostního spektrometru byla ionizační účinnost analytů nižší než v případě SIM módu. Z tohoto důvodu bylo rozhodnuto, že další analýzy budou provedeny pomocí SIM a metoda bude využita pouze pro detekci mykotoxinů, dočasně bez možnosti jejich kvantifikace.

### 3.7 Analýza mykotoxinů

Pro analýzu mykotoxinů, produkovaných plísněmi byly zvoleny kmeny *F. poae* CCM-584, reklasifikované na *F. sporotrichioides* a *F. graminearum* CCF-1626. Kultivace byla provedena při ideálních podmínkách času a teploty (viz kapitola 2.7.10.) publikovaných pro kultivaci plísní za účelem produkce trichothecenových mykotoxinů skupiny A, respektive B.

Sledován byl vliv různého složení média na produkci, přičemž přibližné množství mykotoxinů bylo porovnáváno pouze na základě výšky, respektive intenzity píků.

Dle očekávání byla u kmene *F. sporotrichioides* zaznamenána přítomnost T-2 a HT-2 toxinu. Nejvyšší a zároveň identická intenzita píků T-2 toxinu byla zaznamenána po kultivaci ve sladínovém a bramborovém bujónu. Nižší produkce bylo dosaženo po kultivaci na rýži. V případě HT-2 toxinu bylo nejvyšší množství vyprodukováno ve sladínovém bujónu a na rýži, nejméně v bramboro-glukózovém bujónu. Po kultivaci na rýži byla u tohoto kmene dodatečně zaznamenána přítomnost zearalenonu.

Kmen *F. graminearum* CCF-1626 produkoval deoxynivalenol s nejvyšší intenzitou píku po kultivaci v bramboro-glukózovém bujónu. Současně v tomto bujónu došlo k nejvyšší produkci zearalenonu, který byl mimo jiné přítomen v extraktu získaném z rýže, ale nikoli v extraktu ze sladínového bujónu. Po kultivaci na rýži byla zaznamenána druhá nejvyšší intenzita píku deoxynivalenolu, naopak jeho nejnižší intenzita byla zaznamenána v případě použití sladínového bujónu.

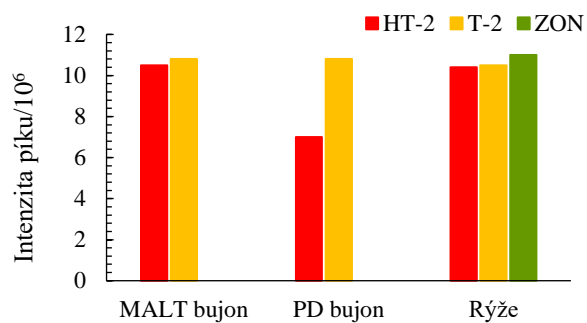
Výše uvedené výsledky jsou shrnuty v tabulkách 17 a 18 a dále v grafech 3 a 4.

Tabulka 17 Intenzity píků mykotoxinů po kultivaci *F. sporotrichioides* na různých médiích. Symbol ---- značí nepřítomnost mykotoxinu v daném médiu.

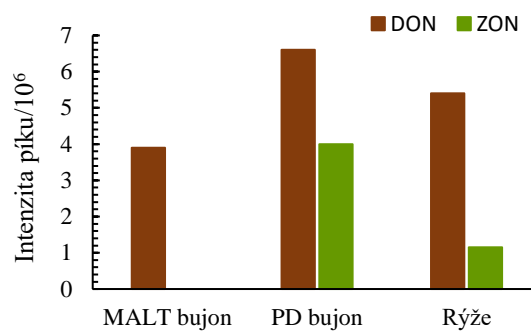
Mykotoxin	Intenzita píku		
	PD bujon	MALT bujon	Rýže
HT-2	10,5E+06	7,00E+06	10,4E+06
T-2	10,8E+06	10,8E+06	10,5E+06
ZON	----	----	11,0E+06

Tabulka 18 Intenzity píků mykotoxinů po kultivaci *F. graminearum* CCF-1626 na různých médiích. Symbol ---- značí nepřítomnost mykotoxinu v daném médiu.

Mykotoxin	Intenzita píku		
	PD bujon	MALT bujon	Rýže
DON	3,90E+06	6,60E+06	5,40E+06
ZON	----	4,00E+06	1,15E+06



Graf 3 Produkce mykotoxinů kmene *F. sporotrichioides* na různých médiích. Kultivace 4 týdny, 15 °C.



Graf 4 Produkce mykotoxinů kmene *F. graminearum* CCF-1626 na různých médiích. Kultivace 4 týdny, 25 °C.

## 4 DISKUZE

### 4.1 Izolace plísni rodu *Fusarium*

Způsob izolace fuzárií ze vzorků ječmene zvolený v této práci vycházel z požadavku Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Brně pro stanovení celkového počtu plísni. Suspektní kolonie byly izolovány po stanovení počtů, a to převážně z agaru DG18. Tento způsob ale komplikovala doprovodná mikroflóra. Až po kultivaci na agaru MALT byly některé izoláty vyhodnoceny jako plísně jiných rodů, jiné byly pro další zpracování vyřazeny až na základě posouzení mikroskopických znaků.

Doplňující izolační způsob v podobě kontaktní metody na PDA umožnil lepší orientaci v určování suspektních kolonií rodu *Fusarium*. Vzhledem k tomu, že je PDA energeticky bohatým médiem docházelo častěji k zřetelnějšímu zbarvení jednotlivých kolonií. I přesto se v některých případech nepodařilo na první pokus izolovat čistou kulturu. Jedním z důvodů byla absence inhibičních látek zabraňující růstu doprovodné bakteriální mikroflóry. Růst přítomných bakterií byl inhibován pouze z části, a to díky použitému dezinfekčnímu přípravku. Izolát tak musel být dodatečně kultivován na agaru DRBC, pomocí kterého byl bakteriální růst inhibován zcela, nicméně tím došlo k prodloužení doby izolace dané kultury ze vzorku.

Z důvodu toho, že kontaktní metoda byla použita pouze jako doplňující způsob k izolaci z agaru DG18, byl použit nízký počet vyšetřovaných zrn (10 zrn/vzorek). Jestliže by tato metoda izolace měla být v budoucnu upřednostněna, bylo by nutné použít reprezentativní množství zrn, zpravidla 100 ks suspektních obilných zrn z jednoho vzorku (Beccari *et al.*, 2016; Boutigny *et al.*, 2014). Živné médium by navíc mělo být doplněno o vhodné antibiotikum inhibující bakteriální růst, případně o látku potlačující růst rychle rostoucích vzdušných plísni, jako je např. rod *Mucor*. Po vzoru práce Beccari *et al.*, (2016) by použité PDA mohlo být obohaceno o Streptomycin sulfát a Dichloran (Beccari *et al.*, 2016).

Obě metody izolace čistých kultur s následným krokem extrakce DNA za účelem druhové identifikace mají společnou nevýhodu, a sice časovou náročnost, stejně jako nutnost analýzy velkého množství izolátů. Vhodným řešením úspory času a financí se nabízí optimalizace izolace fungální DNA, která by namísto čistého mycelia mohla být získávána ze surového vzorku obilovin, jako v publikacích autorů Schöneberg *et al.*, (2018); Sumíková *et al.*, (2017), Kulik (2008) nebo Demeke *et al.*, (2005). Tento krok by výrazně urychlil především druhovou identifikaci fuzárií při zpracování vzorků obilovin ve velkém množství. Na druhou stranu je tímto způsobem získána směsná DNA, kterou již nelze použít pro charakterizaci jednotlivých plísni z hlediska schopnosti produkce mykotoxinů.

Autoři Schöneberg *et al.*, (2018) ve své práci izolovali DNA rodu *Fusarium* ze vzorků ovsa za použití kitu Nucleospin Plant<sup>®</sup> II, který byl použit i v této práci. Oproti zpracování mycelia byla u surového vzorku zvolena delší doba inkubace za působení vyššího množství lýzačního pufru a enzymu RNázy (Schöneberg *et al.*, 2018). Pokud by bylo v budoucnu přistoupeno k tomuto kroku, tak by pravděpodobně nemuselo dojít ke změně izolačního kitu, ale pouze k úpravě podmínek při zpracování vzorků.

Při izolaci kolonií, respektive DNA je také důležité zohlednit charakter růstu jednotlivých druhů fuzárií, které mohou významně ovlivnit výsledky druhové identifikace. Kulik (2008) se ve své práci zabýval identifikací vybraných druhů rodu *Fusarium* se zaměřením na *F. tricinctum* ve vzorcích pšenice. Po analýze DNA izolované přímo ze vzorků pšenice patřičnými pufrů a roztoky bylo *F. tricinctum* prokázáno v 11 případech ze 13, přičemž po izolaci kultur a následné morfologické identifikaci byl tento druh prokázán pouze ve 3 vzorcích. Dle autora může být růst *F. tricinctum* inhibován rychle rostoucími druhy, jako je *F. poae*, následkem čehož bylo pravděpodobně dosaženo rozdílných výsledků (Kulik, 2008).

Demeke *et al.* (2005) ve své práci porovnávali izolaci DNA z kultur získaných po kultivaci kontaktní metodu na PDA spolu s izolací DNA ze surového vzorku pomocí extrakčních pufrů. Za použití kontaktní metody byl výskyt *F. graminearum* zaznamenán v 35 vzorcích, zatímco po zpracování surové směsi obilovin byl výskyt zjištěn v 50 vzorcích z 82 testovaných. Autoři tento významný rozdíl přisuzují pravděpodobné růstové kompetici mezi izoláty, rozdílné životaschopnosti přítomných plísní nebo možnému působení desinfekčního prostředku, který mohl mimo jiné inhibovat růst tohoto druhu fuzária (Demeke *et al.*, 2005).

Obdobný problém se týká i *F. langsethiae*, jež může být z důvodu omezené produkce vzdušného mycelia a pomalého růstu inhibováno ostatními druhy, jako je *F. poae* nebo *F. culmorum*. Jeho izolace je tak zatížena možnou chybou (Terzi *et al.*, 2014; Imathiu *et al.*, 2013). Beccari *et al.*, (2016) diskutují své výsledky analýzy ječmene s ohledem na nízký výskyt *F. langsethiae* také jako možný vliv izolace, neboť autoři použili kontaktní metodu izolace na PDA (Beccari *et al.*, 2016). Kmeny *F. langsethiae*, získané v naší práci byly téměř všech případech izolovány z DG18, kde vlivem nízké aktivity vody média dochází k potlačení rychlého rozrůstání mycelia ostatních plísní. Jeden kmen byl izolován z PDA po použití kontaktní metody. Jednalo se o vzorek 27, kde byla vedle *F. langsethiae* zjištěna přítomnost *F. tricinctum*. V tomto vzorku nebylo prokázáno *F. poae*, které by mohlo jeho izolaci ovlivnit.

## 4.2 Optimalizace podmínek PCR

Zoptimalizovaná multiplex PCR umožňuje specifickou detekci plísni rodu *Fusarium* včetně toxinogenních kmenů schopných produkce trichothecenových mykotoxinů, a to na základě pozitivního průkazu *Tri5* genu. Pro detekci plísni rodu *Fusarium* byl zvolen úsek ITS rDNA. Sbírkové kmeny, které byly použity pro optimalizaci podmínek, stejně jako reálné izoláty poskytly očekávaný produkt reakce. Dle tvrzení některých autorů může být amplifikace úseku ITS v rámci rodu *Fusarium* problematická. Jedná se o kmeny *F. avenaceum*, *F. arthrosporioides*, *F. tricinctum*, *F. langsethiae* nebo *F. sporotrichioides* (Nayaka *et al.*, 2011; Yli-Matilla *et al.*, 2002). U všech sbírkových kmenů včetně izolátů ze vzorků nebyly v rámci práce zaznamenány problémy s amplifikací tohoto úseku. Kmeny, identifikované jako *F. tricinctum*, v některých případech poskytly, v porovnání s ostatními druhy, slabší produkty reakce. Nicméně i za těchto okolností bylo možné vyhodnotit pozitivní reakci a správně tak určit, že se jedná o izolát plísně, patřící do rodu *Fusarium*.

Pro spolehlivé vyhodnocení pozitivní reakce průkazu *Tri5* genu bylo nutné optimalizovat vzájemné koncentrace použitých primerů. Jak uvádí Bluhm *et al.*, (2002) amplifikace sekvence ITS, která je v genomu přítomna v mnoha kopiích komplikuje amplifikaci genu, přítomného pouze v jedné kopii (Bluhm *et al.*, 2002), kterou v tomto případě představuje *Tri5* gen.

Metodu by bylo možné rozšířit o průkaz genu *fum5*, který je klíčovým genem v biochemické syntéze fumonisinů (Bluhm *et al.*, 2002). Sekvence pro průkaz tohoto genu již byla navržena autory Bluhm *et al.*, (2002). Primer byl navíc použit za podobných podmínek v porovnání s podmínkami reakce uvedených v této práci a poskytované produkty mají dostatečně rozdílné velikosti (Naef a Défago, 2006; Bluhm *et al.*, 2002). Mohla by tak být vytvořena multiplexní metoda, poskytující širší spektrum informací o jednotlivých izolovaných kmenech, respektive o jejich schopnosti produkovat různé typy mykotoxinů. Tyto informace mimo jiné pomáhají při následné druhové identifikaci dané plísně. U neznámého kmene s pozitivním genem *fum5* lze předpokládat, že se jedná o člena *Fusarium fujikuroi* species komplex, kam se mimo jiné řadí druhy *F. proliferatum* nebo *F. verticillioides* (Aoki *et al.*, 2014).

Po optimalizaci druhově-specifické PCR nebyl u použitého primeru Fa-U17F/R pozorován původně očekávaný produkt reakce 345 pb., ale 1000 pb. Tento rozdíl lze pravděpodobně vysvětlit tím, že primer Fa-U17F/R (Turner *et al.*, 1998) má zcela identickou sekvenci jako primer FaF/R (Doohan *et al.*, 1998), s produktem o velikosti 920 pb. I přes to



velikost produktu zcela nesouhlasí. Tento rozdíl by mohl být způsoben genetickou variabilitou mezi kmeny. Např. Yli-Matilla *et al.*, 2018 uvádí u primeru JiAF/R specifického pro identifikaci *F. avenaceum* produkt o velikosti 300 pb., ačkoli autor, který primer navrhl (Turner *et al.*, 1998) uvádí produkt o velikosti 220 pb. (Yli-Matilla *et al.*, 2018). Goertz *et al.* (2010) ve své práci publikují výsledek pro JiAF/R v rozmezí 220-300 pb. (Goertz *et al.*, 2010). Je tedy možné, že v případě primeru Fa-U17F/R je velikost ovlivněna genetickou variabilitou *Fusarium tricinctum species complex*, kam se mimo jiné řadí i *F. avenaceum*.

Také v případě druhové identifikace se nabízí možnost rozšíření metody. I z tohoto důvodu byly použité primery rozděleny do dvou skupin. Pro budoucí využití by mohla být metoda rozšířena o specifickou identifikaci druhů *F. culmorum* nebo *F. equiseti*. Již v rámci této práce probíhal pokus o zavedení specifické detekce uvedených druhů, které se ale nepodařilo realizovat. Pracováno bylo dle Nicholson *et al.* (2004), tak jako při identifikaci ostatních fuzárií. Dále bude potřeba optimalizovat podmínky pro specifickou detekci *F. avenaceum* a *F. acuminatum*, neboť i ty se amplifikují s primerem Fa-U17F/R (Naef a Défago, 2006; Demeke *et al.*, 2005), a navíc jsou vzájemně morfologicky podobné (Leslie a Summerell, 2006; Nelson *et al.*, 1998). Oba druhy jsou členy *Fusarium tricinctum species complex* a je tedy důležité zvolit primer, který je spolehlivě odliší. Příkladem je již výše zmíněný primer JiAF/R, specifický pro detekci *F. avenaceum* (Yli-Matilla *et al.*, 2004; Turner *et al.*, 1998) a FAC-F/R, jenž je specifickým pro detekci *F. acuminatum* (Demeke *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2002).

Primer JiAF/R je sice specifickým pro *F. avenaceum* a dokáže odlišit geneticky úzce příbuzné *F. tricinctum*, nicméně produkt o stejné velikosti poskytuje i s kmeny *F. arthrosporioides* a *F. anguioides* (Yli-Matilla *et al.*, 2018). Pro budoucí analýzy je třeba zvážit, do jaké míry bude identifikace jednotlivých plísní probíhat. Všechny 3 kultury jsou geneticky úzce příbuzné, dělené na 3 klastry ve společném komplexu *F. avenaceum*. Podle popisu, uvedeného Yli-Matilla *et al.*, (2018) mají všechny společný znak, a sice produkci štíhlých, často pěti septovaných makrokonidií. Liší se ve schopnosti produkce mikrokonidií a chlamydospor (Yli-Matilla *et al.*, 2018). Při zpracování většího množství vzorků s cílem identifikace různých druhů fuzárií bude pravděpodobně dostačující identifikace *F. avenaceum* pomocí tohoto primeru. Jestliže by některé práce měly být v budoucnu zaměřeny na identifikaci členů *Fusarium avenaceum* komplex nabízí se využití metody navržené Yli-Matilla *et al.*, (2004), podle které je možné spolehlivě odlišit kmeny *F. avenaceum* a *F. tricinctum* včetně kmenů *F. arthrosporioides* (Yli-Matilla *et al.*, 2004).

### 4.3 Identifikace plísni rodu *Fusarium* a ověření přítomnosti *Tri5* genu

Všechna fuzária izolovaná ze vzorků ječmene a identifikovaná jako *F. poae*, *F. langsethiae* nebo *F. sporotrichioides*, byla pozitivní na přítomnost *Tri5* genu. Demeke *et al.* (2005) tento gen prokázali u 9 z 10 izolovaných kmenů *F. poae* a u 7 z 10 izolovaných kmenů *F. sporotrichioides*. Výsledky jsou tedy téměř shodné s výsledky naší práce. Autoři se ve své studii nezabývali identifikací *F. langsethiae*, na druhou stranu byl *Tri5* gen prokázán u několika izolátů *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. equiseti* a *F. acuminatum*. Kmeny byly získány ze směsi obilovin zahrnující ječmen, pšenici a kukuřici (Demeke *et al.*, 2005). I to je v souladu s výsledky předložené práce, neboť u většiny testovaných sbírkových kmenů těchto druhů fuzárií byl *Tri5* gen rovněž prokázán. Ramana *et al.* (2011) ve své práci uvádí 15 z 85 blíže nspecifikovaných izolátů plísni rodu *Fusarium*, u kterých byl prokázán *Tri5* gen. U všech pozitivních byla schopnost produkce trichothecenových mykotoxinů potvrzena na základě výsledků z analýzy pomocí tenkovrstvé chromatografie. V tomto případě se jednalo o izoláty získané ze vzorků rýže (Ramana *et al.*, 2011). Priyanka *et al.* (2015) analyzovaly 177 vzorků, které se skládaly z kukuřice, rýže a čiroku, přičemž pomocí PCR a průkazu *Tri5* genu detekovali toxinogenní plísně rodu *Fusarium* v uvedených vzorcích. Ty byly prokázány celkem ve 23 vzorcích, z čehož více než polovinu (17) tvořila kukuřice (Priyanka *et al.* 2015).

Vědecké práce z posledních let se častěji, než průkazem *Tri5* genu zabývají jeho expresí (Han *et al.*, 2018), nebo v rámci kmenů schopných produkce trichothecenových mykotoxinů sledují jejich chemotyp (Covarelli *et al.*, 2015). Práce zaměřené především na druhovou identifikaci fuzárií izolovaných z obilovin většinou nesledují schopnost jednotlivých kultur produkovat mykotoxiny, ale jsou doplněny o informace týkající se detekce a kvantifikace vybraných mykotoxinů v daném vzorku (Beccari *et al.*, 2018; Sumíková *et al.*, 2017, Beccari *et al.*, 2016).

Jedním z výsledků druhově-specifické identifikace v rámci naší práce je reklasifikace kmene *F. poae* na *F. sporotrichioides*. Reklasifikace druhů pomocí PCR byla zaznamenána i v pracích jiných autorů. Yli-Matilla *et al.* (2004) uvádí rozdílné výsledky v porovnání mikroskopické a genetické identifikace druhů *F. graminearum* a *F. culmorum*, stejně jako druhů *F. tricinctum*, *F. poae* a *F. sporotrichioides* (Yli-Matilla *et al.* 2004). Jedná se o druhy, které jsou vzájemně snadno zaměnitelné (Leslie a Sumerell, 2006). I *F. langsethiae* bývalo dříve často identifikováno jako *F. poae* (Yli-Matilla *et al.*, 2002), v některých případech jako *F. sporotrichioides* (Imathiu *et al.*, 2012).

V práci byl jako pozitivní kontrola pro druhovou identifikaci *F. avenaceum/tricinatum* použit izolát 27, který byl na základě tvaru makrokonidií primárně posouzen jako *F. avenaceum*, respektive *F. arthrosporioides*. Nicméně, jak je uvedeno v tabulce 12, daný izolát byl později identifikován jako *F. tricinctum*, ačkoli mikroskopické znaky neodpovídají popisu *F. tricinctum*. Podobné mikroskopické znaky a stejné výsledky identifikace byly zaznamenány i u izolátu 14. Kulik (2008) ve své práci pomocí druhově-specifického primeru reklasifikoval izolát *F. acuminatum* na *F. tricinctum* a uvádí, že některé kmeny *F. tricinctum* jsou morfologicky podobné právě k *F. acuminatum*. *F. acuminatum* je mimo jiné morfologicky podobné k *F. avenaceum* (Leslie a Summerell, 2006). Dalším reklasifikovaným izolátem bylo *F. nurragi*, celým názvem *Fusarium avenaceum* subspecies *nurragi* (Kulik *et al.*, 2008). Ačkoli se jedná o poddruh *F. avenaceum*, mohou být vzájemně snadno odlišeny (Leslie a Summerell, 2006). Dodatečnou sekvenací DNA, která byla autorem provedena, byla u *F. nurragi* zjištěna 99% shoda s druhem *F. tricinctum* (Kulik, 2008).

Uvedené informace, týkající se členů *Fusarium tricinctum* species komplex, ukazují, že identifikace jednotlivých druhů v rámci tohoto komplexu není jednoduchá. Další práce by mohly být úzce zaměřeny na morfologickou, případně genetickou diverzitu těchto druhů. Studie tohoto typu by ale pravděpodobně musely být provedeny s pomocí sekvenace DNA, která je poměrně finančně náročná.

#### **4.4 Hodnocení vzorků ječmene z hlediska výskytu plísní rodu *Fusarium***

Porovnávání hodnocení vzorků obilovin ve vztahu k výskytu plísní rodu *Fusarium* je závislé na řadě faktorů. Jak bylo již uvedeno dříve, výskyt jednotlivých druhů je silně ovlivněn zejména klimatickými podmínkami prostředí, dále použitou odrůdou, předplodinou nebo aplikací ochranných prostředků (Wenda-Piesik *et al.*, 2017; Terzi *et al.*, 2014). Níže uvedené odstavce uvádí práce autorů, kteří se zabývali podobnou tematikou. Ze studií vyplývá, že na území České republiky, ale i na jiných místech Evropy je s ohledem na rok pěstování dané obiloviny, hlášeno rozdílné zastoupení fuzárií. Vzorky ječmene analyzované v této práci byly sklizeny v roce 2018. Jednalo se o různé odrůdy ječmene jarního.

Na základě výsledků byla vyhodnocena dominance *F. poae*, což je v souladu s některými dalšími studiemi. Bezděková *et al.*, (2016) se ve své práci zabývali výskytem fuzárií ve sladovnickém ječmeni s ohledem na lokalitu, rok pěstění a ošetření fungicidy. Nejčastěji izolovaným druhem bylo *F. poae*. Dalšími detekovanými druhy byly *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* a *F. tricinctum*, přičemž v závislosti na lokalitě se *F. poae* ve vzorcích vyskytovalo nejvíce spolu s *F. graminearum* (Žabčice) nebo

s *F. culmorum* (Kroměříž). Podle autorů bylo *F. tricinctum* izolováno pouze v jednom případě, a tedy pravděpodobně není nebezpečným patogenem pro ječmen (Bezděková *et al.*, 2016). To není v souladu s výsledky předložené práce, neboť v našem případě bylo *F. tricinctum* druhým nečastěji izolovaným druhem, ihned za *F. poae*.

Na území České republiky je častěji výskyt fuzárií sledován ve vzorcích pšenice než ječmene. Nicméně, i v tomto případě je od roku 2012 dominantním druhem *F. poae*, které v tomto roce dosáhlo vyššího zastoupení oproti *F. graminearum* (Sumíková *et al.*, 2017). Ve vzorcích, které dosahovaly nejvyšších koncentrací mykotoxinů enniantinů a beauvericinu bylo *F. poae* často detekováno ve směsi s *F. avenaceum*. Autoři ve své práci nesledují výskyt *F. tricinctum*, *F. sporotrichioides* bylo detekováno pouze ojediněle v roce 2014 a *F. langsethiae* bylo zaznamenáno především v roce 2015 (Sumíková *et al.*, 2017). Je důležité zmínit, že autoři práce použili primer FaF/R (Doohan *et al.*, 1998) za účelem specifické identifikace *F. avenaceum*. Jak již bylo uvedeno dříve, tento primer neodliší druhy *F. avenaceum*, *F. tricinctum* a *F. acuminatum* (Demeke *et al.*, 2005; Turner *et al.*, 1998). Výsledky uvádějící zastoupení *F. avenaceum* tak mohou být, dle našich výsledků identifikace, nadhodnoceny. Chrpová *et al.* (2016) uvádějí jednoznačnou dominanci *F. poae* ve vzorcích pšenice v roce 2012 a 2013, přičemž ještě v roce 2011 bylo dominantním druhem *F. graminearum*. *F. sporotrichioides* bylo detekováno pouze ojediněle a *F. langsethiae* pouze v jednom z 270 vyšetřovaných vzorků. V práci není zmíněn výskyt *F. tricinctum*, přičemž identifikace *F. avenaceum* byla jako v předchozím případě uskutečněna pomocí primeru FaF/R (Chrpová *et al.*, 2016). Skutečnost, že na našem území došlo za poslední roky k dominanci *F. poae* souvisí s tím, že jsou tato období charakterizována počasím, které není vhodné pro výskyt a šíření *F. graminearum* (Sumíková *et al.*, 2017; Chrpová *et al.*, 2016).

Ani v publikacích dostupných z jiných zemí není zaznamenáno významné zastoupení druhu *F. tricinctum*. Beccari *et al.*, (2018) ve svých vzorcích sladovnického ječmene v období 2013-2014 detekovali především *F. poae* (37 % vzorků), *F. avenaceum* (23 %) a *F. graminearum* (22 %). *F. tricinctum* bylo přítomno pouze v 7 %. Ve většině vzorků (58 %) byl prokázán pouze jeden druh, ve 36 % 2 různé druhy, z čehož 6 % tvořila směs *F. poae* s *F. tricinctum* (Beccari *et al.*, 2018). V naší práci byla směs 2 druhů prokázána ve 13 vzorcích a většina z nich (9) představovala směs *F. poae* a *F. tricinctum*.

V té samé lokalitě, ale v období 2012-2013 Beccari *et al.*, (2016) uvádí dominanci *F. avenaceum* (63 %), dále přítomnost *F. graminearum* (19 %), načež následovalo *F. poae* pouze v 5% zastoupení. Mimo jiné bylo detekováno *F. sporotrichioides* (4 %) a ojediněle *F. langsethiae* (1 %). *F. tricinctum* nebylo identifikováno ani v jednom případě. Ze

vzorků byl většinou izolován pouze jeden druh fuzária (60 %), méně často dva druhy (37 %) (Beccari *et al.*, 2016). Xue *et al.*, (2019), kteří se zabývali sledováním výskytu plísní rodu *Fusarium* v různých obilovinách po dobu 17 let, uvádí dominanci druhu *F. poae* (42% zastoupení vzhledem k ostatním druhům) a *F. graminearum* (40% zastoupení). 4-9 % tvořily druhy *F. avenaceum*, *F. sporotrichioides* a *F. equiseti*. *F. tricinctum* tvořilo pouze 1 % ze všech izolovaných fuzárií a *F. langsethiae* nebylo izolováno ani v jednom případě. Je důležité zmínit, že identifikace fuzárií byla provedena pouze na základě hodnocení makroskopických a mikroskopických znaků a izolace byla uskutečněna kontaktní metodou na PDA (Xue *et al.*, 2019).

Zvýšené zastoupení druhu *F. tricinctum* ve vzorcích sladovnického ječmene bylo zaznamenáno Beccari *et al.*, (2017) v experimentu zkoumajícího vliv teploty během celého ročního období na výskyt fuzarióz klasů ječmene během let 2011-2013. K dominanci *F. tricinctum* oproti ostatním fuzáriím došlo v roce 2012, který se podle autorů oproti ostatním rokům vyznačoval delším počtem dní, kdy teploty během zimního období dosahovaly pod bod mrazu. Navíc bylo předešlé letní období charakterizováno nízkým počtem dní, kdy teploty dosahovaly teplot v rozmezí 30–35 °C. *F. poae* bylo naopak v tomto roce zastoupeno v nejnižším počtu za celé sledované období. K jeho dominanci došlo v roce 2011. Tento rok byl charakterizován vysokými teplotami během kvetení s nízkým počtem srážek. Zima byla mírná, přičemž předešlé léto bylo hodnoceno jako nadprůměrné, teploty se po mnoho dní pohybovaly v rozmezí 30-35 °C. *F. tricinctum* nebylo v tomto roce ve vzorcích přítomno (Beccari *et al.*, 2017).

Z výsledků výše uvedené studie se zdá být patrné, že *F. poae* a *F. tricinctum* pro napadení ječmene vyžadují rozdílné teploty nejen během kvetení, ale i v zimě, která je důležitým obdobím pro přezimování plísní. Výsledky naší práce nejsou v souladu s tímto závěrem, neboť v tomto případě byla téměř polovina vzorků (11 z 27) napadena *F. poae* a *F. tricinctum* současně.

Z dostupných informací o zastoupení T-2 a HT-2 toxinu lze předpovídat, v jakých vzorcích jsou pravděpodobně přítomny *F. langsethiae* nebo *F. sporotrichioides*, neboť tyto druhy jsou v Evropě považovány za hlavní producenty těchto mykotoxinů (Sumíková *et al.*, 2017). Na druhou stranu, autoři Nazari *et al.*, (2019) uvádí nepřímý vztah mezi množstvím DNA *F. langsethiae* a obsahem T-2 a HT-2 toxinu ve vzorcích pšenice, ačkoli v pracích jiných autorů byla mezi těmito parametry zaznamenána silná korelace. Přímý vztah byl naopak

zaznamenán mezi koncentrací těchto toxinů a množstvím DNA *F. sporotrichioides* (Nazari *et al.*, 2019).

Výsledky naší práce, respektive identifikované druhy fuzárií, se ve většině případů neshodují s uvedeným obsahem toxinů, zjištěných metodou ELISA. Ve vzorcích se třemi nejvyššími koncentracemi T-2 a HT-2 toxinů (3072,5 µg/kg, 1455,5 µg/kg a 1169,5 µg/kg) byly zjištěny pouze druhy, které nejsou jejich produkce schopné. Jedná se o *F. poae*, *F. tricinctum* a dva blíže nespecifikované druhy, označené jako *Fusarium* spp., u kterých nebyl prokázán *Tri5* gen. *F. poae* je některými autory označované za producenta tohoto typu mykotoxinů. Nicméně, jak vyplývá z některých studií, kmeny *F. poae* postrádají geny, klíčové pro jejich syntézu. Proto je syntéza trichothecenů typu A u tohoto druhu zakončena produkty diacetoxyascirpenolu a neosolaniolu (Nazari *et al.*, 2019; Vanheule *et al.*, 2017). Edwards *et al.*, (2009) uvádí, že pouze některé izoláty *F. poae* jsou schopné produkce T-2 a HT-2 toxinů v nízké koncentraci (Edwards *et al.*, 2009).

Není jasné, proč ze vzorků s vysokým obsahem T-2 a HT-2 toxinů nebyly izolovány druhy *F. langsethiae* nebo *F. sporotrichioides*. Jedno z možných vysvětlení se týká problematiky izolace, která byla diskutována v kapitole 4.1. Ta postihuje především *F. langsethiae*, nicméně může mít vliv i na výskyt jiných druhů fuzárií. Proto by v rámci dalších prací měl být využit výše uvedený názor a fungální DNA by měla být extrahována přímo ze vzorku ječmene. Navíc, *F. sporotrichioides* je schopné několikanásobně vyšší produkce T-2 a HT-2 toxinů v porovnání s *F. langsethiae* (Nazari *et al.*, 2019; Nazari *et al.*, 2014). Je tedy možné, že ve vzorcích stojí za produkcí těchto toxinů právě *F. sporotrichioides*, které se nepodařilo vyizolovat. Jeho výskyt byl zaznamenán pouze ve 2 případech, (s koncentracemi toxinů 219,9 µg/kg a 288,8 µg/kg) a je v souladu s ostatními pracemi, které uvádí poměrně nízkou přítomnost *F. sporotrichioides* ve vzorcích ječmene (Beccari *et al.*, 2018; Beccari *et al.*, 2016).

Ve vzorku č. 7, u kterého bylo zjištěno přepěňování piva, nebyl výskyt plísni rodu *Fusarium* potvrzen. Izolace byla provedena roztěrem i kontaktní metodou, přičemž v obou případech byla zaznamenána pouze přítomnost plísni rodu *Mucor* a *Aspergillus*. I v tomto případě, by měla být analýza opakována s DNA, izolované přímo ze vzorku.

#### **4.5 Optimalizace podmínek HPLC/MS pro detekci mykotoxinů**

V rámci předložené práce se podařilo optimalizovat podmínky detekce mykotoxinů deoxynivalenolu, deoxynivalenol-3-glukosidu, nivalenolu, T-2 a HT-2 toxinů a zearalenonu. Optimalizace podmínek spočívala především v úpravě složení a gradientu mobilní fáze.

Monitorování látek probíhalo jak při snímání kladných, tak i záporných iontů. U většiny analytů byla zaznamenána vyšší odezva v režimu snímání záporných iontů, kde docházelo k tvorbě aduktových iontů s mravenčanem. Pouze ionizace T-2 toxinu byla efektivnější při snímání kladných iontů. V rámci optimalizace složení mobilní fáze bylo zjištěno, že použitý mravenčan amonný je efektivní pouze při koncentraci 0,5 mM. Vyšší množství mělo za následek snížení účinnosti ionizace analyzovaných látek.

I přesto, že byla provedena přímá infuze analytů do hmotnostního spektrometru s cílem optimalizace MRM přechodů pro kvantitativní analýzu mykotoxinů, nepodařilo se dosáhnout potřebné citlivosti z důvodu nesnadné fragmentace sledovaných aduktů. Zaměření budoucích prací by se tedy mohlo týkat této problematiky. Pro podporu fragmentace analytů by mohla být vyzkoušena záměna přidávaného pufru do mobilní fáze za octan amonný, tak jak bylo zvoleno autory Sumíková *et al.*, (2017) nebo Kai *et al.*, (2016), přičemž jeho koncentrace v mobilní fázi dosahovala 5 mM, respektive 10 mM.

#### **4.6 Analýza mykotoxinů**

Pro sledování produkce vybraných trichothecenových mykotoxinů a zearalenonu byla zvolena kultivační média s odlišným složením. Vybrané kmeny plísní *F. sporotrichioides* a *F. graminearum* reprezentovaly zástupce producentů trichothecenů typu A, respektive B.

Z technických a časových důvodů se nepodařilo optimalizovat metodu kvantifikace sledovaných analytů, a proto bylo jejich množství vyjádřeno pouze na základě odečtení intenzity píků. Pro budoucí práce se zaměřením na sledování faktorů ovlivňujících produkci mykotoxinů bude nejprve nutné dokončit optimalizaci metody.

Významný vliv použitého kultivačního média na produkci mykotoxinů byl u *F. sporotrichioides* zaznamenán v případě HT-2 toxinu. Zatímco po kultivaci na rýži a sladínovém bujónu bylo dosaženo stejné intenzity píků, po kultivaci v PD bujónu jeho intenzita poklesla. Autoři Shi *et al.*, (2017) se ve své práci zabývali vlivem kultivačního média na produkci trichothecenových mykotoxinů při použití PDA, rýže a kukuřice. Studie byla zaměřena na sledování procentuálního zastoupení jednotlivých trichothecenů v rámci skupiny A a B při teplotě kultivace 25 °C po dobu 21 dní (Shi *et al.*, 2017). V našem případě byla kultivace provedena při 15 °C po dobu 4 týdnů. V případě trichothecenů skupiny A obecně docházelo k nejvyšší produkci na kukuřici, dále na rýži a nejméně na PDA (Shi *et al.*, 2017). Tyto výsledky jsou částečně v souladu s výsledky zjištěnými v rámci naší práce, neboť po kultivaci plísně v PD bujónu byl zaznamenán pokles intenzity píku HT-2 toxinu.

V případě deoxynivalenolu docházelo u *F. graminearum* k nejvyšší produkci na rýži, dále na kukuřici a nejméně na PDA. Na rýži bylo mimo jiné dosaženo nejvyšší koncentrace zearalenonu, produkovaného kmenem *F. culmorum* a *F. graminearum* při 25 °C (Shi *et al.*, 2017). To není v souladu s našim zjištěním, protože v PD bujónu došlo k nejvyšší produkci obou výše uvedených mykotoxinů, přičemž na rýži došlo k výrazně nižší produkci zearalenonu v porovnání s PD bujónem.

Poněkud překvapujícím výsledkem je přítomnost zearalenonu po kultivaci *F. sporotrichioides* na rýži. Pík v tomto případě dosáhl nejvyšší intenzity v porovnání s píky reprezentující T-2 a HT-2 toxin. Dle Leslie a Summerell (2006) jsou kmeny *F. sporotrichioides* schopné syntézy zearalenonu, ale tento druh je uváděn jako jeden z hlavních producentů T-2 a HT-2 toxinu (Beccari *et al.*, 2018; Sumíková *et al.*, 2017; Nazari *et al.*, 2016).

Většina vědeckých prací, zabývajících se vlivem vnějších faktorů (teplota a aktivita vody) na produkci mykotoxinů, využívá kultivaci fuzárií na rýži nebo zrn obilí. Rýže je často využívána pro zjištění chemotypu daného druhu plísně (Covarelli *et al.* 2015; Alvarez *et al.*, 2009). Kokonnen *et al.*, (2010) uvádí, že použitá obilná zrna simulují přirozené prostředí plísní rodu *Fusarium*, a je tedy možné v závislosti na různých vnějších podmínkách lépe předpovídat produkci mykotoxinů po napadení rostliny (Kokonnen *et al.*, 2010). Nicméně použití tekutého bujónu umožňuje lepší kontrolu a případnou změnu obsahu jednotlivých složek (Vanheule *et al.*, 2017). Volba kultivačního média pro budoucí hodnocení vnějších vlivů bude závislá na tom, jaké parametry budou v rámci práce sledovány.



## 5 ZÁVĚR

Práce představila optimální podmínky multiplexní „Touchdown“ PCR pro specifickou identifikaci toxinogenních plísní rodu *Fusarium* izolovaných z ječmene. Identifikace je založena na amplifikaci úseku ITS ribozomální DNA a průkazu *Tri5* genu, který je prvním genem biochemické syntézy trichothecenových mykotoxinů. V rámci druhově-specifické identifikace došlo k optimalizaci multiplexních „Touchdown“ PCR metod, umožňujících detekci několika významných fytopatogenních druhů rodu *Fusarium*, konkrétně členy *F. tricinctum* species komplex, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides*, *F. poae* a *F. langsethiae*. Dodatečně byla optimalizována samostatná tradiční PCR metoda pro specifickou detekci *F. tricinctum*. Druhová identifikace byla provedena včetně sledování makroskopických a mikroskopických znaků jednotlivých kultur, neboť se oba způsoby identifikace vzájemně vhodně doplňují. Právě díky mikroskopickým znakům byly identifikovány druhy, které mohly být využity jako pozitivní kontroly v PCR pro další analýzy. Na druhou stranu, pomocí PCR došlo k reklasifikaci kmene *F. sporotrichioides*, který byl prvotně považován za kmen *F. poae*.

V analyzovaných vzorcích ječmene byla zjištěna dominance druhu *F. poae*, která byla v posledních letech zaznamenána i v pracech jiných autorů, včetně studií prováděných v České republice. Druhým nejčastěji identifikovaným druhem bylo *F. tricinctum*, jehož frekvence výskytu je v rozporu s obdobnými pracemi z posledních let. Dalšími, méně často přítomnými plísněmi rodu *Fusarium*, bylo *F. langsethiae* a *F. sporotrichioides*. U všech izolovaných kmenů *F. poae*, *F. sporotrichioides* a *F. langsethiae* byl prokázán *Tri5* gen.

Jedním z cílů práce byl pokus o zavedení metody detekce a kvantifikace trichothecenových mykotoxinů pomocí HPLC/MS. Z technických a časových důvodů bylo dosaženo pouze možnosti detekce vybraných trichothecenů. Jejich kvantifikace zůstává předmětem zájmu budoucích prací.

## 6 CITOVANÁ LITERATURA

ABEDI-TIZAKI, M. a D. ZAFARI. Nucleotide polymorphisms and protein structure changes in the Fg16 gene of *Fusarium graminearum sensu stricto*. *Meta Gene*. 2016, **9**, 62-69.

ALVAREZ, C. L., M. P. AZCARATE a V. F. PINTO. Toxigenic potential of *Fusarium graminearum sensu stricto* isolates from wheat in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*. 2009, **135**(2), 131-135.

AOKI, T., K. O'DONNELL a D. M. GEISER. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *The Journal of General Plant Pathology*. 2014, **80**(3), 189–201.

ASLAM, S., A. TAHIR, M. F. ASLAM, M. W. ALAM, A. A. SHEDAYI a S. SADIA. Recent advances in molecular techniques for the identification of phytopathogenic fungi – a mini review. *Journal of Plant Interactions*. 2017, **12**(1), 493–504.

BECCARI, G., A. PRODI, F. TINI, U. BONCIARELLI, A. ONOFRI, S. OUESLATI, M. LIMAYMA a L. COVARELLI. Changes in the *Fusarium* Head Blight Complex of Malting Barley in a Three-Year Field Experiment in Italy. *Toxins*. 2017, **120**(9), 1-18.

BECCARI, G., L. CAPRONI, F. TINI, S. UHLIG a L. COVARELLI. Presence of *Fusarium* Species and other Toxigenic Fungi in Malting Barley and Multi-Mycotoxin Analysis by Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016, **64**(21), 4390-4399.

BECCARI, G., M. T. SENATORE, F. TINI a M. SULYOK. Fungal community, *Fusarium* head blight complex and secondary metabolites associated with malting barley grains harvested in Umbria, central Italy. *International Journal of Food Microbiology*. 2018, **273**, 33-42.

BĚLÁKOVÁ, S., K. BENEŠOVÁ, J. ČÁSLAVSKÝ, Z. SVOBODA a R. MIKULÍKOVÁ. The occurrence of the selected fusarium mycotoxins in Czech malting barley. *Food Control*. 2014, **37**, 93-98.

BERTHILLER, F., C. BRERA, M. H. IHA, et al. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2015-2016. *World Mycotoxin Journal*. 2017, **10**(1), 5-29.

BEZDĚKOVÁ, K., I. ŠAFRÁNKOVÁ a J. VÍCHOVÁ. Occurrence of *Fusarium* spp. on malting barely grains in the Czech Republic during 2011-2013. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* 2016, **64**(5). 1441-1451.

- BLUHM, B. H., J. E. FLAHERTY, M. A. COUSIN a P. WOLOSHUK. Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay for the Differential Detection of Trichothecene- and Fumonisin-Producing Species of *Fusarium* in Cornmeal. *Journal of Food Protection*. 2002, **65**(12), 1955–1961.
- BOLECHOVÁ, M., K. BENEŠOVÁ, S. BĚLÁKOVÁ, J. ČÁSLAVSKÝ, M. POSPÍCHALOVÁ a R. MIKULÍKOVÁ. Determination of seventeen mycotoxins in barley and malt in the Czech Republic. *Food Control*. 2015, **47**, 108-113.
- BOUTIGNY, A., T. J. WARD, N. BALLOIS, G. IANCU a R. IOOS. Diversity of the *Fusarium graminearum* species complex on French cereals. *The European Journal of Plant Pathology*. 2014, **138**(1), 133–148.
- BROEKAERT, N., M. DEVREESE, S. DE BAERE, P. DE BACKER a S. CROUBELS. Modified *Fusarium* mycotoxins unmasked: From occurrence in cereals to animal and human excretion. *Food and Chemical Toxicology*. 2015, **80**, 17–31.
- COVARELLI, L., G. BECCARI, A. PRODI, S. GENEROTTI, F. ETRUSCHI, C. JUAN, E. FERRER a J. MAÑES. *Fusarium* species, chemotype characterisation and trichothecene contamination of durum and soft wheat in an area of central Italy. *The Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2015, **95**(3), 540–551.
- ČSN ISO 21527-2. *Mikrobiologie potravin a krmiv-Horizontální metoda stanovení počtu kvasinek a plísní – Část 2: Technika počítání kolonií u výrobků s aktivitou vody nižší nebo rovnou 0,95*. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2009.
- DAVARI, M., A. D. VAN DIEPENINGEN, A. BABAI-AHARI, M. ARZANLOU, M. J. NAJAFZADEH, T. A. J. VAN DER LEE a G. SYBREN DE HOOG. Rapid identification of *Fusarium graminearum* species complex using Rolling Circle Amplification (RCA). *Journal of Microbiological Methods*. 2012, **89**(1), 63–70.
- DEMEKE, T., R. M. CLEAR, S. K. PATRICK a D. GABA. Species-specific PCR-based assays for the detection of *Fusarium* species and a comparison with the whole seed agar plate method and trichothecene analysis. *International Journal of Food Microbiology*. 2005, **103**(3), 271–284.
- DOOHAN, F. M., D. W. PARRY, P. JENKINSON a P. NICHOLSON. The use of species-specific PCR-based assays to analyse *Fusarium* ear blight of wheat. *Plant pathology*. 1998, **47**(2), 197–205.

- DOPORUČENÍ KOMISE ze dne 27. března 2013 ohledně přítomnosti toxinů T-2 a HT-2 v obilovinách a výrobcích z obilovin.: Úřední věstník Evropské Unie, 2013, ročník 91, číslo 12.*
- DWEBBA, C. C., S. FIGLAN, H. A. SHIMELIS, T. E. MOTAUNG, S. SYDENHAM, L. MWADZINGENI a T. J. TSILO. *Fusarium* head blight of wheat: Pathogenesis and control strategies. *Crop Protection*. 2017, **91**, 114-122.
- EDWARDS, S. G., B. BARRIER-GUILLOT, P-E. CLASEN, V. HIETANIEMI a H. PETTERSSON. Emerging issues of HT-2 and T-2 toxins in European cereal production. *World Mycotoxin Journal*. 2009, **2**(2), 173-179.
- GARMENDIA, G., M. UMPIERREZ-FAILACHE, T. J. WARD a S. VERO. Development of a PCR-RFLP method based on the transcription elongation factor 1-a gene to differentiate *Fusarium graminearum* from other species within the *Fusarium graminearum* species complex. *Food Microbiology*. 2018, **70**, 28-32.
- GOERTZ, A., S. ZUEHLKE, M. SPITELLER, U. STEINER, H. W. DEHNE, C. WAALWIJK, I. DE VRIES a E. C. OERKE. *Fusarium* species and mycotoxin profiles on commercial maize hybrids in Germany. *European Journal of Plant Pathology*. 2010, **128**, 101-111.
- GONG, L., Y. JIANG a F. CHEN. Molecular strategies for detection and quantification of mycotoxin-producing *Fusarium* species: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2015, **95**(9), 1767–1776.
- GOSWAMI, R. S., Y. DONG a Z. K. PUNJA. Host range and mycotoxin production by *Fusarium equiseti* isolates originating from ginseng fields. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 2008, **30**(1), 155-160.
- HABLER, K. a M. RYCHLIK. Multi-mycotoxin stable isotope dilution LC-MS/MS method for *Fusarium* toxins in cereals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2016, **408**(1), 307-317.
- HABLER, K., K. HOFER, C. GEIßINGER, J. SCHÜLER, R. HÜCKELHOVEN, M. HESS, M. GASTL a M. RYCHLIK. Fate of *Fusarium* Toxins during the Malting Process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016, **64**(6), 1377-1384.
- HAN, Z., Y. SHEN, D. DI MAVUNGU, D. ZHANG, D. NIE, K. JIANG, S. DE SAEGER a Z. ZHAO. Relationship between environmental conditions, TRI5 gene expression and deoxynivalenol production in stored *Lentinula edodes* infected with *Fusarium graminearum*. *World Mycotoxin Journal*. 2018, **11**(2), 177-186.

- HAVRÁNKOVÁ, H. a J. OVESNÁ. Geny biosyntézy trichothecenů u rodu *Fusarium*. *Chemické listy*. 2012, **106**(9), 818-825.
- HE, W., Q. YUAN, Y. ZHANG, M-W. GUO, A-D. GONG, J-B. ZHANG, A-B. WU, T. HUANG, B. QU, H-P. LI, Y-C. LIAO. Aerobic De-Epoxydation of Trichothecene Mycotoxins by a Soil Bacterial Consortium Isolated Using In Situ Soil Enrichment. *Toxins*. 2016, **227**(8), 1-16.
- HENEGARIU, O., N. A. HEEREMA, S. R. DLOUHY, G. H. VANCE a P. H. VOGT. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *Bio Techniques*. 1997, **23**(3), 504-511.
- CHRPOVÁ, J., V. ŠÍP, T. SUMÍKOVÁ, J. SALAVA, J. PALICOVÁ, L. ŠTOČKOVÁ, Z. DŽUMAN a J. HAJŠLOVÁ. Occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in wheat grain collected in the Czech Republic. *World Mycotoxin Journal*. 2016, **9**(2), 317-327.
- IMATHIU, S. M., S.G. EDWARDS, R.V. RAY a M.A. BACK. *Fusarium langsethiae* – a HT-2 and T-2 Toxins Producer that Needs More Attention. *Journal of phytopatology*. 2013, **161**, 1-10.
- JANSSEN, E. M., C. LIU a H. J. VAN DER FELLS-KLERX. *Fusarium* infection and trichothecenes in barley and its comparison with wheat. *World Mycotoxin Journal*. 2018, **11**(1), 33-46.
- JUODEIKIENE, G., E. BARTKIENE, D. CERNAUSKAS, D. CIZEIKIENE, D. ZADEIKE, V. LELE a V. BARTKEVICS. Antifungal activity of lactic acid bacteria and their application for *Fusarium* mycotoxin reduction in malting wheat grains. *LWT – Food Science and Technology*. 2018, **89**, 307–314.
- KAI, S., N. KOSUGE, M. WAKI, M. MIYAZAWA a H. KANAZAWA. Analysis of *Fusarium* Toxins in Processed Grain product Using High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Chromatography*. 2016, **37**, 79-85.
- KIM, D., G. KIM, H. KIM, J. KIM, S. J. JEON, Ch. W. LEE, H.B. LEE a S.H. YUN. Characterization of Nivalenol-Producing *Fusarium culmorum* Isolates Obtained from the Air at a Rice Paddy Field in Korea. *The Plant Pathology Journal*. 2016, **32**(3), 182-189.
- KNUTSEN, A. K., M. TORP a A. HOLST-JENSEN. Phylogenetic analyses of the *Fusarium poae*, *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae* species complex based on partial

- sequences of the translation elongation factor-1 alpha gene. *International Journal of Food Microbiology*. 2004, **95**(3), 287–295.
- KOKKONEN, M., L. OJALA, P. PARIKKA a M. JESTOI. Mycotoxin production of selected *Fusarium* species at different culture conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 2010, **143**(1-2), 17-25.
- KONSTANTINOVA, P. a T. YLI-MATTILA. IGS–RFLP analysis and development of molecular markers for identification of *Fusarium poae*, *Fusarium langsethiae*, *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium kyushuense*. *International Journal of Food Microbiology*. 2004, **95**(3), 321–331.
- KORBIE, D. J. a J. S. MATTICK. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature: Protocols*. 2008, **9**(3), 1452-1456.
- KULIK, T. Detection of *Fusarium tricinctum* from cereal grain using PCR assay. *Journal of applied genetics*. 2008, **49**(3), 305-311.
- KUZDRALIŃSKI, A., A. KOT, H. SZCZERBA, M. NOWAK a M. MUSZYŃSKA. A Review of Conventional PCR Assays for the Detection of Selected Phytopathogens of Wheat. *The Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2017, **27**(3), 175–189.
- LESLIE, J. F. a B. A. SUMMERELL. *The fusarium laboratory manual*. 1. Ames, Iowa: Blackwell Pub., 2006. ISBN 978-0-8138-1919-8.
- MALÍŘ, F., V. OSTRÝ a kolektiv autorů. *Vláknité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka*. 1. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2003. ISBN 80-7013-395-3.
- MARÍN, P., A. MORETTI, A. RITIENI, M. JURADO, C. VÁZQUEZ a M. T. GONZÁLEZ-JAÉN. Phylogenetic analyses and toxigenic profiles of *Fusarium equiseti* and *Fusarium acuminatum* isolated from cereals from Southern Europe. *Food Microbiology*. 2012, **31**(2), 229-237.
- MATNY, O. N. *Fusarium* Head Blight and Crown Rot on Wheat & Barley: Losses and Health Risks. *Advances in Plants & Agriculture Research*. 2015, **2**(1) 114-122.
- MCCORMICK, S. P., A. M. STANLEY, N. A. STOVER a N. J. ALEXANDER. Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins*. 2011, **3**(7), 802-814.

MERHEJ, J., F. RICHARD-FORGET a CH. BARREAU. Regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium*: recent advances and new insights. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013, **91**(3), 519–528.

MORCIA, C., E. RATTOTTI, A. M. STANCA, G. TUMINO, V. ROSSI, S. RAVAGLIA, CH. GERMEIER, M. HERRMANN, I. POLIŠENSKÁ a V. TERZI. *Fusarium* genetic traceability: Role for mycotoxin control in small grain cereals agro-food chains. *Journal of Cereal Science*. 2013, **57**(2), 175-182.

MORCIA, C., G. TUMINO, R. GHIZZONI, F.W. BADECK, V.M.T. LATTANZIO, M. PASCALE a V. TERZI. Occurrence of *Fusarium langsethiae* and T-2 and HT-2 Toxins in Italian Malting Barley. *Toxins*. 2016, **247**(8), 1-15.

NAEF, A. a G. DÉFAGO. Population structure of plant-pathogenic *Fusarium* species in overwintered stalk residues from Bt-transformed and non-transformed maize crops. *European Journal of Plant Pathology*. 2006, **116**(2), 129–143.

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 401/2006 ze dne 23. února 2006, kterým se stanoví metody odběru vzorků a metody analýzy pro úřední kontrolu množství mykotoxinů v potravinách. In: Úřední věstník Evropské unie, 2006, ročník 70, číslo 12.

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách. In: Úřední věstník Evropské Unie, 2006, ročník 364, číslo 5.

NATHANAIL, A. V., B. GIBSON, L. HAN, K. PELTONEN, V. OLLILAINEN, M. JESTOI, V. BARTKEVICS a A. LAITILA. The lager yeast *Saccharomyces pastorianus* removes and transforms *Fusarium* trichothecene mycotoxins during fermentation of brewer's wort. *Food Chemistry*. 2016, **203**, 448–455.

NAYAKA, S. CH., E. G. WULFF, A. C. UDAYASHANKAR, B. P. NANDINI, S. R. NIRANJANA, C. N. MORTENSEN a H. S. PRAKASH. Prospects of molecular markers in *Fusarium* species diversity. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, **90**(5), 1625–1639.

NAZARI, L., E. PATTORI, S. SOMMA, V. MANSTRETTA, C. WAALWIJK, A. MORETTI, G. MECA a V. ROSSI. Infection incidence, kernel colonisation, and mycotoxin accumulation in durum wheat inoculated with *Fusarium sporotrichioides*, *F. langsethiae* or *F. poae* at different growth stages. *European Journal of Plant Pathology*. 2019, **153**, 715–729.

- NELSON, P. E, T. A. TOUSSON a W. F. O. MARASAS. *Fusarium species: An Illustrated Manual for Identification*. 1. Pennsylvania: The Pennsylvania State University, 1983. ISBN 0-271-00349-9.
- NICOLAISEN, M., S. SUPRONIENÉ, L. K. NIELSEN, I. LAZZARO, N. H. SPLIID a A. F. JUSTESEN. Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. *Journal of Microbiological Methods*. 2009, **76**(3), 234-240.
- NIESSEN, M., L. a R. F. VOGEL. Group Specific PCR-Detection of Potential Trichothecene-Producing *Fusarium*-Species in Pure Cultures and Cereal Samples. *Systematic and applied microbiology*. 1998, **21**(4), 618-631.
- NICHOLSON, P., D. R. SIMPSON, A. H. WILSON, E. CHANDLER a M. THOMSETT. Detection and differentiation of trichothecene and enniatin-producing *Fusarium* species on small-grain cereals. *European Journal of Plant Pathology*. 2004, **110**(5-6), 503–514.
- NICHOLSON, P., D. R. SIMPSON, G. WESTON, H. N. REZANOOR, A. K. LEES, D. W. PARRY a D. JOYCE. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 1998, **53**(1), 17-37.
- O'DONNELL, K., A. P. ROONEY, R. H. PROCTOR, et al. Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. *Fungal Genetics and Biology*. 2013, **52**, 20–31.
- O'DONNELL, K., T. J. WARD, V. A. R. G. ROBERT, P. W. CROUS, D. M. GEISER a S. KANG. DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions. *Phytoparasitica*. 2015, **43**(5), 583–595.
- OKUNGBOWA, F. I. a H. O. SHITTU. *Fusarium* wilts: an overview. *Environmental Research Journal*. 2012, **6**(2), 83-102.
- PASQUALI, M., M. BEYER, A. LOGRIECO, K. AUDENAERT, V. BALMAS, R. BASLER, A. L. BOUTIGNY, J. CHRPOVÁ, E. CZEMBOR, T. GAGKAEVA, M. T. GONZÁLEZ-JAÉN, I. S. HOFQAARD, N. D. KÖYCÜ, L. HOFFMAN, J. LEVÍC, P. MARIN, T. MIEDANER, Q. MIQHELI, A. MORETTI, M. E. MÜLLER, F. MUNAUT, P. PARIKKA, M. PALLEZ-BARTHEL, J. PIEC, J. SCAUFLAIRE, B. SCHERM, S. STANKOVIĆ, U. THRANE, S. UHLIG, A. VANHEULE, T. YLLI-MATILLA a S. VOGELSGANG.



A European Database of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* Trichothecene Genotypes. *Frontiers in Microbiology*. 2016, **7**, 1-11.

PARRY, D. W. a P. NICHOLSON. Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. *Plant Pathology*. 1996, **45**(2), 383-391.

PATTORI, E., H. RAMDIAL, R. K. LATCHOO, F. N. HOSEIN a S. N. RAMPERSAD. Phylogeny and Haplotype Analysis of Fungi within the *Fusarium incarnatum – equiseti* Species Complex. *Phytopatology*. 2017, **107**(1), 109-120.

PAZDERŮ, K., Z. VEPŘÍKOVÁ, P. KONVALINA, E. PROKINOVÁ, D. JANOVSKÁ, A. ŠKEŘÍKOVÁ a H. HONSOVÁ. Changes in the content of various *Fusarium* mycotoxins forms in germinating winter wheat and spring barley kernels. *Plant Soil Environment*. 2016, **62**(1), 42-46.

PIERRON, A., S. MIMOUN, L. S. MURATE, N. LOISEAU, Y. LIPPI, A-P. F. L. BRACARENSE, G. SCHATZMAYR, J. W. HE, T. ZHOU, W-D. MOLL a I. P. OSWALD. Microbial biotransformation of DON: molecular basis for reduced toxicity. *Nature: Scientific Reports*. 2016, **6**(1), 5-29.

PRIYANKA, S. R., M. VENKATARAMANA, K. BALAKRISHNA, H. S. MURALI a H. V. BATRA. Development and evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of major mycotoxigenic fungi from cereals. *Journal of Food Science and Technology*. 2015, **52**(1), 486–492.

PRZEMIENIECKI, S. W., T. P. KUROWSKI a K. KORZEKWA. Chemotypes and geographic distribution of the *Fusarium graminearum* species complex. *Environmental biotechnology*. 2014, **10**(2), 45-59.

RAMANA, M. V., K. BALAKRISHNA, H. CH. SRIPATHY MURALI a H. V. BATRA. Multiplex PCR-based strategy to detect contamination with mycotoxigenic *Fusarium* species in rice and finger millet collected from southern India. *The Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2011, **91**(9), 1666–1673.

RAMDIAL, H., R. K. LATCHOO, F. N. HOSEIN a S. N. RAMPERSAD. Phylogeny and Haplotype Analysis of Fungi Within the *Fusarium incarnatum-equiseti* Species Complex. *Phytopathology*. 2017, **107**(1), 109-120.

REJCZAK, T. a T. TUZIMSKI. A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. *Open Chemistry*. 2015, **13**, 980–1010.

- SHAHI, S., S. Z. VAHED, N. FATHI a S. SHARIFI. Polymerase chain reaction (PCR)-based methods: Promising molecular tools in dentistry. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, **117**, 983–992.
- SHANAKHAT, H., A. SORRENTINO, A. RAIOLA, A. ROMANO, P. MASI a S. CAVELLA. Current methods formycotoxins analysis and innovative strategies for their reduction in cereals: an overview. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2018, **98**(11), 4003–4013.
- SHI, W., Y. TAN, S. WANG, D. M. GARDINER, S. DE SAEGER, Y. LIAO, CH. WANG, Y. FAN, Z. WANG, A. WU. Mycotoxigenic Potentials of *Fusarium* Species in Various Culture Matrices Revealed by Mycotoxin Profiling. *Toxins*. 2017, **9**(6), 1-15.
- SUMÍKOVÁ, T., J. CHRPOVÁ, Z. DŽUMAN, J. SALAVA., L. ŠTĚRBOVÁ, J. PALICOVÁ, P. SLAVÍKOVÁ, M. STRÁNSKÁ-ZACHARIÁŠOVÁ a J. HAJŠLOVÁ. Mycotoxins content and its association with changing patterns of *Fusarium* pathogens in wheat in the Czech Republic. *World Mycotoxin Journal*. 2017, **10**(2), 143-151.
- TAHERI, P. Cereal diseases caused by *Fusarium graminearum*: from biology of the pathogen to oxidative burst-related host defense responses. *European Journal of Plant Pathology*. 2018, **152**(11), 1-20.
- TAMURA, M., N. MOCHIZUKI, Y. NAGATOMI, K. HARAYAMA, A. TORIBA a K. HAYAKAWA. A Method for Simultaneous Determination of 20 *Fusarium* Toxins in Cereals by High-Resolution Liquid Chromatography-Orbitrap Mass Spectrometry with a Pentafluorophenyl Column. *Toxins*. 2015, **7**(5), 1664-1682.
- TERZI, V., G. TUMINO, A. M. STANCA a C. MORCIA. Reducing the incidence of cereal head infection and mycotoxins in small grain cereal species. *Journal of Cereal Science*. 2014, **59**, 284-293.
- TIAN, Y., Y. TAN, N. LIU, Y. LIAO, CH. SUN, S. WANG a A. WU. Functional Agents to Biologically Control Deoxynivalenol Contamination in Cereal Grains. *Frontiers in Microbiology*. 2016, **7**, 1-8.
- TURNER, A. S., A. K. LEES, H. N. REZANOOR a P. NICHOLSON. Refinement of PCR-detection of *Fusarium avenaceum* and evidence from DNA marker studies for phenetic relatedness to *Fusarium tricinctum*. *Plant Pathology*. 1998, **47**(3), 278–288.
- UHLIG, S., M. JESTOI a P. PARIKKA. *Fusarium avenaceum* — The North European situation. *International Journal of Food Microbiology*. 2007, **119**(1-2), 17–24.

- VAN DIEPENINGEN, A. D., A. M. S. AL-HATMI, B. BRANKOVICS a G. SYBREN DE HOOG. Taxonomy and Clinical Spectra of *Fusarium* Species: Where Do We Stand in 2014? *Current Clinical Microbiology Reports*. 2014, **1**(1-2), 10-18.
- VANHEULE, A., M. DE BOEVRE, A. MORETTI, et al. Genetic Divergence and Chemotype Diversity in the *Fusarium* Head Blight Pathogen *Fusarium poae*. *Toxins*. 2017, **255**(9), 1-19.
- WEGULO, S. N., P. S. BAENZIGER, J. H. NOPSA, W. W. BOCKUS a H. HALLEN-ADAMS. Management of *Fusarium* head blight of wheat and barley. *Crop Protection*. 2015, **73**, 100-107.
- WENDA-PIESIK, A., G. LEMAŃCZYK, M. TWARUŻEK, A. BŁAJET-KOSICKA, M. KAZEK a J. GRAJEWSKI. *Fusarium* head blight incidence and detection of *Fusarium* toxins in wheat in relation to agronomic factors. *The European Journal of Plant Pathology*. 2017, **149**(3), 515–531.
- WILLIAMS, K. J., J. I. DENNIS, C. SMYL a H. WALLWORK. The application of species-specific assays based on the polymerase chain reaction to analyse *Fusarium* crown rot of durum wheat. *Australasian Plant Pathology*. 2002, **31**, 118-127.
- WILSON, A., D. SIMPSON, E. CHANDLER, P. JENNINGS a P. NICHOLSON. Development of PCR assays for the detection and differentiation of *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae*. *FEMS Microbiology Letters*. 2004, **233**(1), 69–76.
- WILSON, N. M., N. MCMASTER, D. GANTULGA, C. SOYARS, S. P. MCCORMICK, K. KNOTT, R. S. SENGER a D. G. SCHMALE. Modification of the Mycotoxin Deoxynivalenol Using Microorganisms Isolated from Environmental Samples. *Toxins*. 2017, **9**(4), 1-11.
- XUE, A. G., Y. CHEN, K. SEIFERT, W. GUO, B. A. BLACKWELL, L. J. HARRIS a D. P. OVERY. Prevalence of *Fusarium* species causing head blight of spring wheat, barley and oat in Ontario during 2001-2017. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/07060661.2019.1582560>
- YLI-MATILLA, T., S. C. NAYAKA, M. VENKATAMARANA a E. YÖRÜK. Multiplex Detection of *Fusarium* Species. MORETTI, A. a A. SUSCA. *Mycotoxigenic Fungi: Methods in Molecular Biology*. 1542. New York: Humana Press, 2017, 269-291. ISBN 978-1-4939-6705-6.

YLI-MATILLA, T., S. PAAVEN-HUHTALA, P. PARIKKA, P. KONSTANTINOVA a T. Y. GAGKAEVA. Molecular and morphological diversity of *Fusarium* species in Finland and north-western Russia. *European Journal of Plant Pathology*. 2004, **110**, 573-585.

YLI-MATTILA, T. Ecology and Evolution of toxigenic *Fusarium* species in cereals in northern Europe and Asia. *Journal of Plant Pathology*. 2010, **92**(1), 7-18.

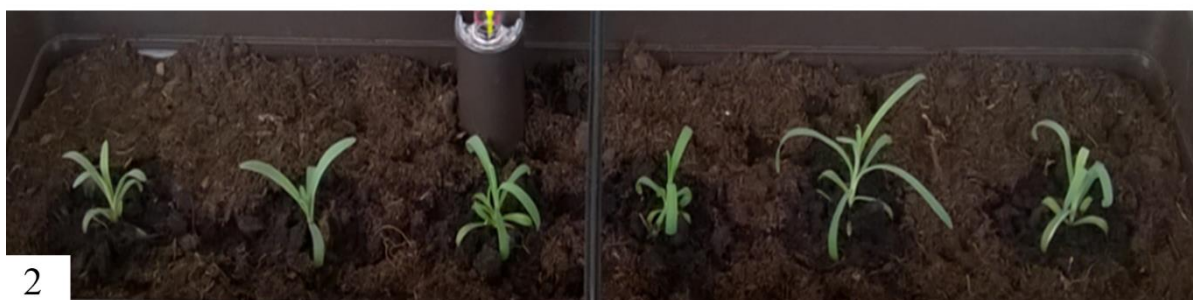
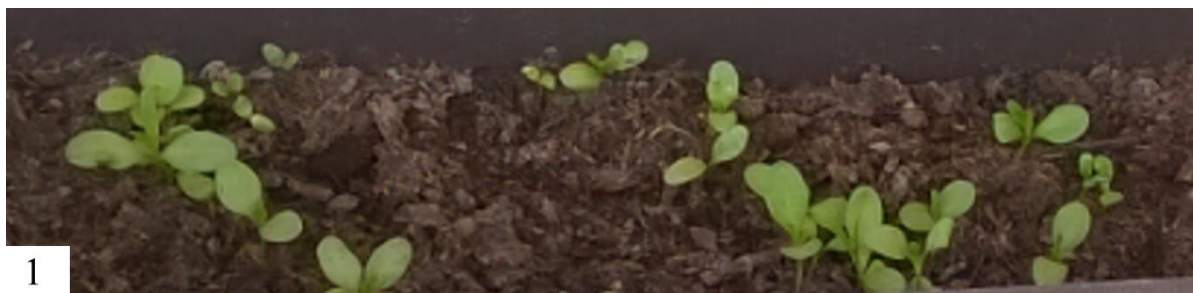
YLI-MATTILA, T., S. PAAVANEN-HUHTALA, S. A. BULAT, I. A. ALEKHINA a H. I. NIRENBERG. Molecular, morphological and phylogenetic analysis of the *Fusarium avenaceum*/*F. arthrosporioides*/*F. tricinctum* species complex – a polyphasic approach. *Mycological Research*. 2002, **106**(6), 655-669.

YLI-MATTILA, T., T. HUSSIEN, O. GAVRILOVA a T. GAGKAEVA. Morphological and Molecular Variation Between *Fusarium avenaceum*, *Fusarium arthrosporioides* and *Fusarium anguioides* Strains. *Pathogens*. 2018, **94**(7), 1-15.

## 7 PŘÍLOHY

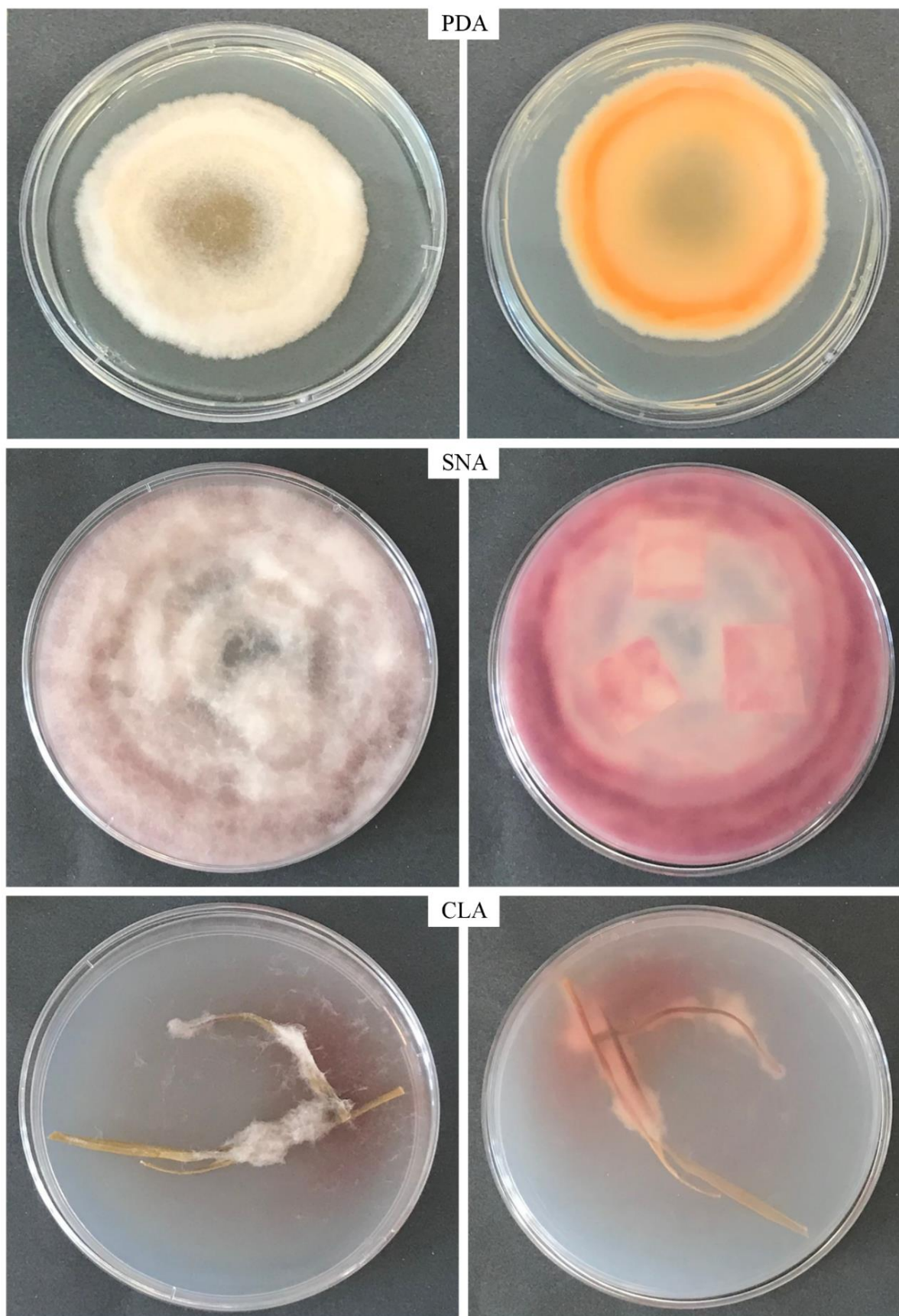
Příloha A Rostliny Hvozdík karafiát ( <i>Dianthus caryophyllus</i> ).....	94
Příloha B Makroskopické znaky plísni rodu <i>Fusarium</i> na různých kultivačních médiích. ....	95
Příloha C Mikroskopické znaky vybraných plísni rodu <i>Fusarium</i> .. ....	105
Příloha D Vyjádření celkových počtů plísni dle české technické normy ČSN ISO 21527-2.....	108

Příloha A Rostliny Hvozdík karafiát (*Dianthus caryophyllus*). 1: Vzešlé semenáčky, 2: Rostlinky po prvním přesazení, 3: Rostlinky před prvním stříhem listů (přibližné stáří 5 měsíců).

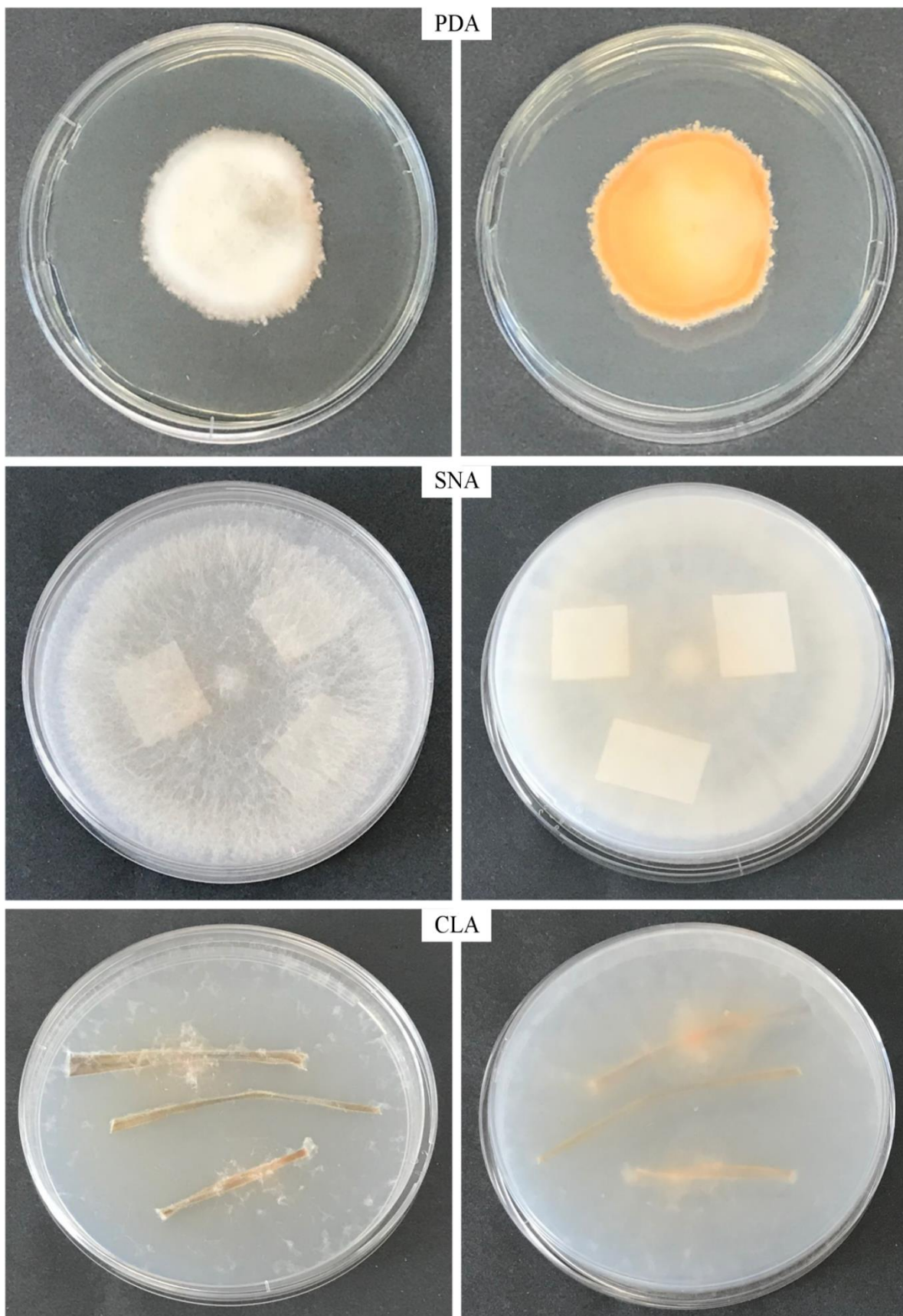




Příloha B Makroskopické znaky plísňí rodu *Fusarium* na různých kultivačních médiích.

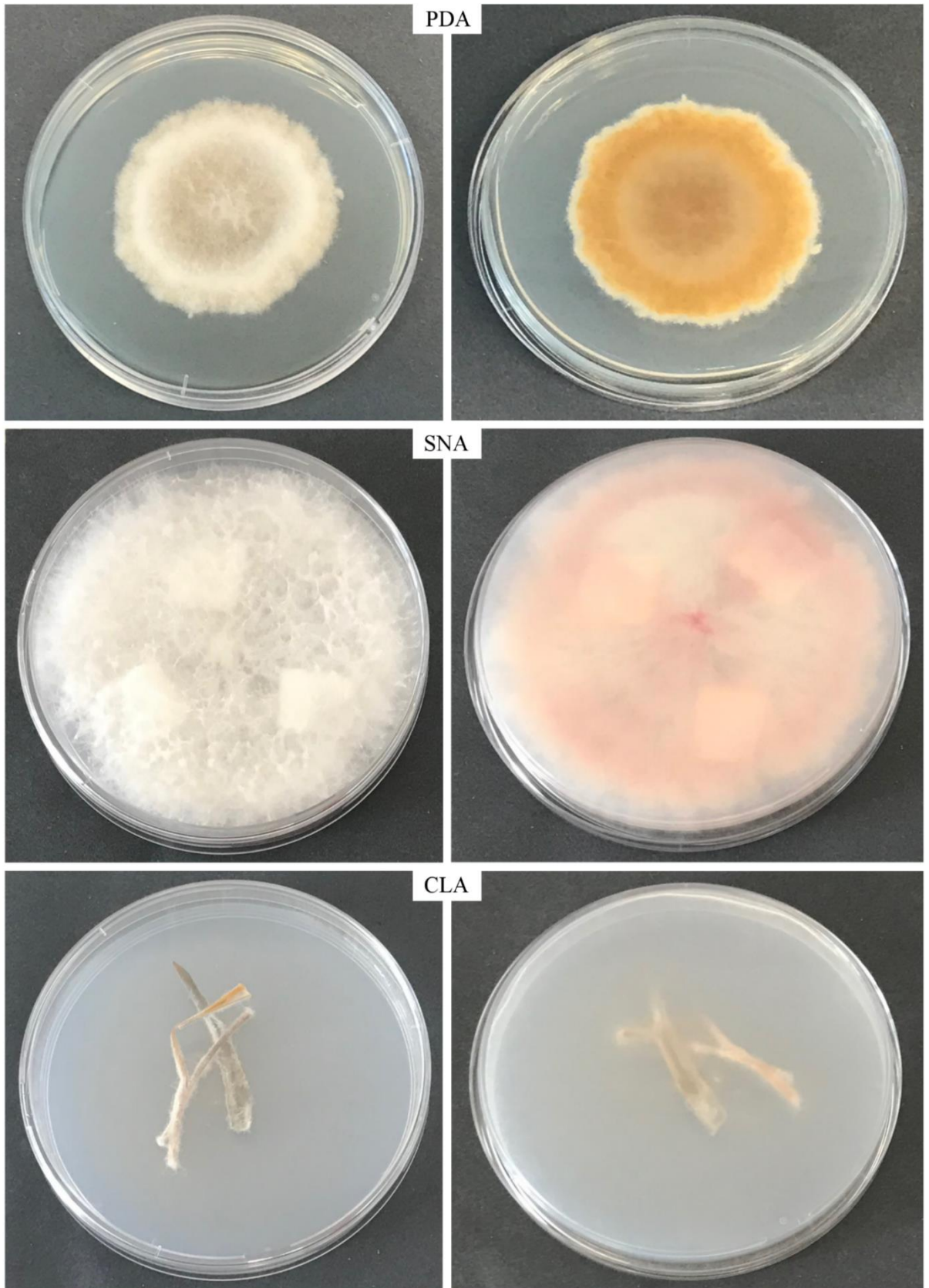


*Fusarium culmorum* CCM F-163. Kultivace: PDA 10 dní, SNA a CLA 14 dní, laboratorní teplota, okenní parapet. Vlevo líc, vpravo rub kolonie. (Foto autor).

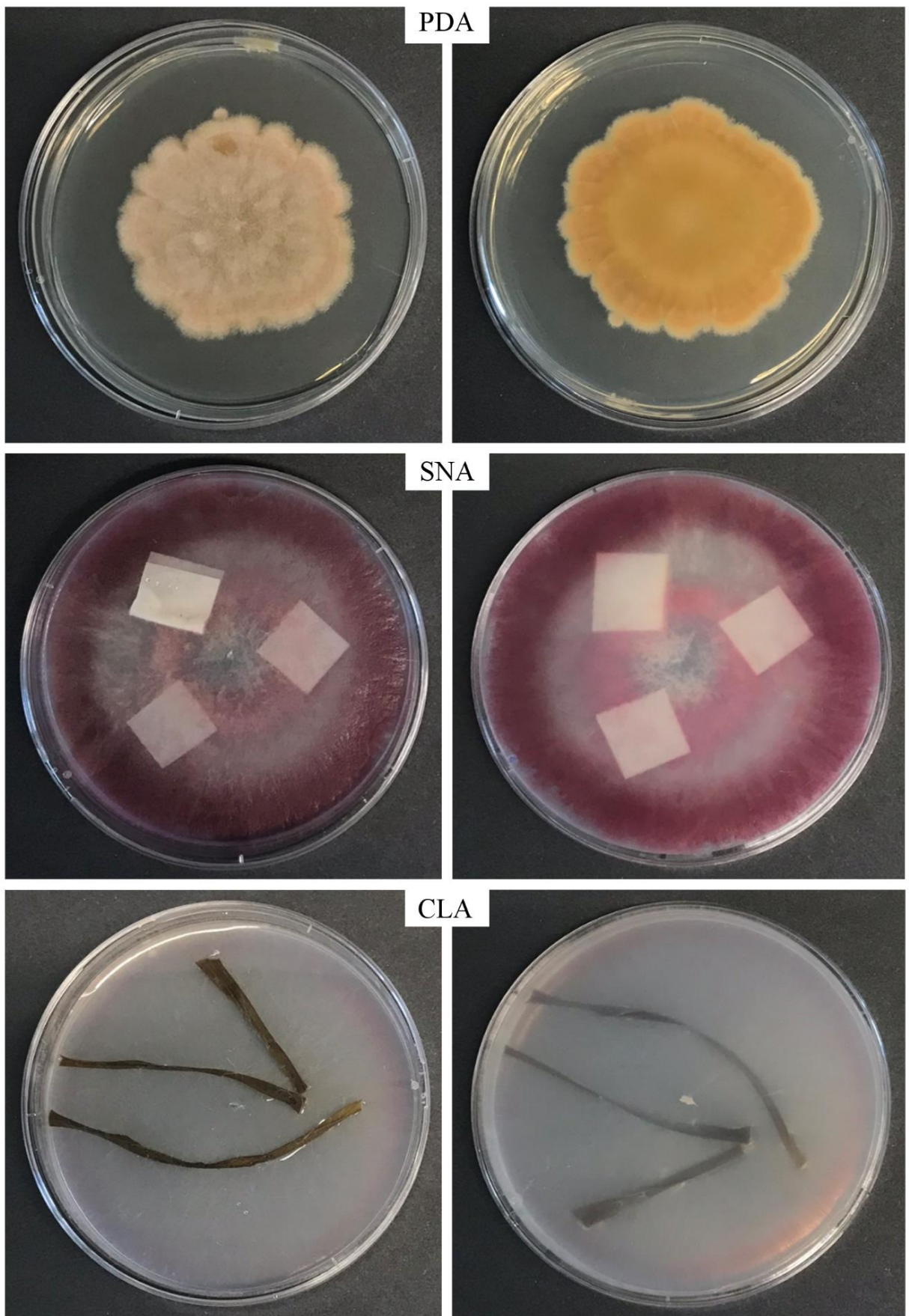


*Fusarium avenaceum* CCM F-8015. Kultivace: PDA 10 dní, SNA a CLA 14 dní, laboratorní teplota, okenní parapet. Vlevo líc, vpravo rub kolonie. (Foto autor).



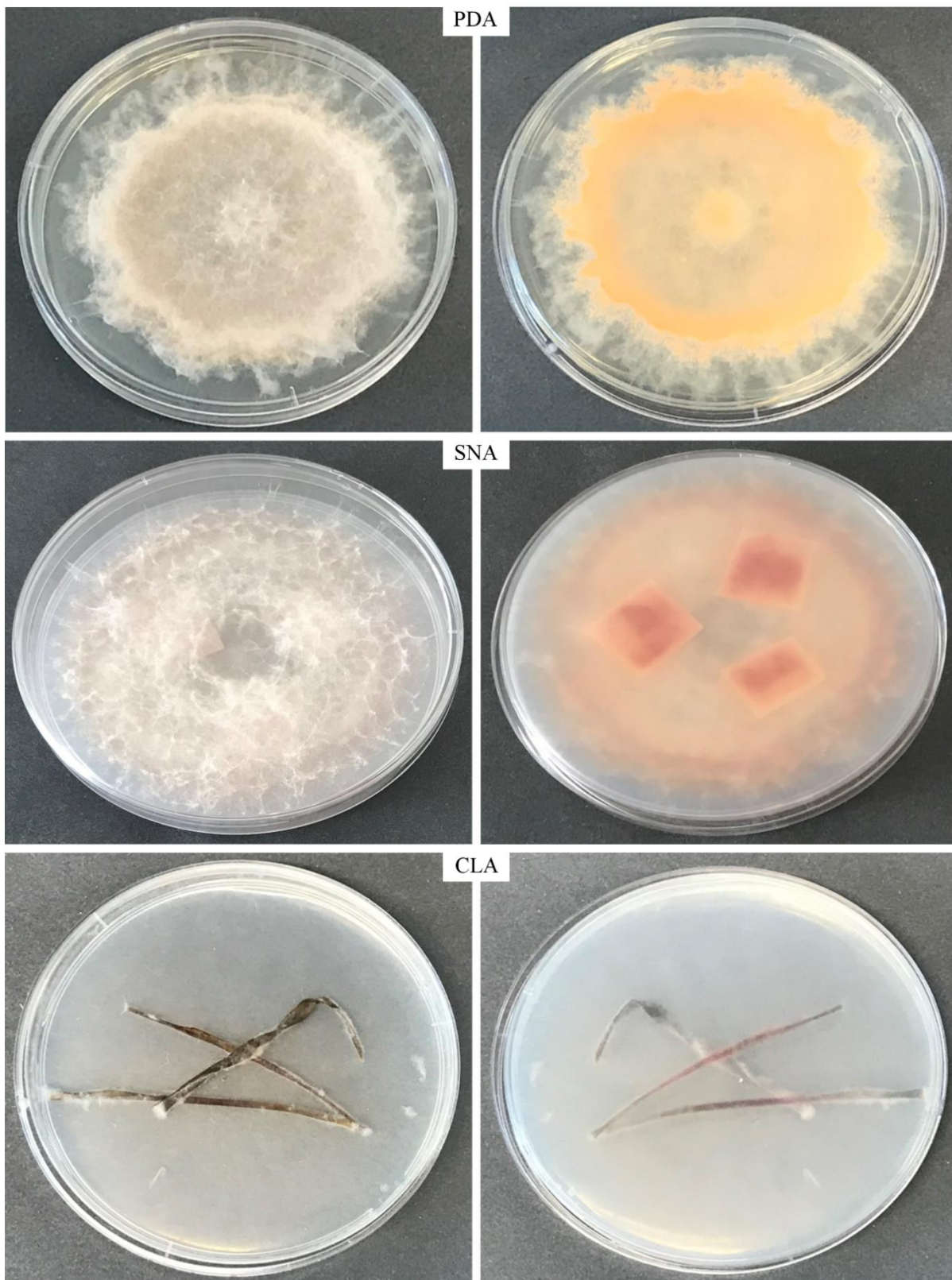


*Fusarium graminearum* CCF-1626. Kultivace: PDA 10 dní, SNA a CLA 14 dní, laboratorní teplota, okenní parapet. Vlevo líc, vpravo rub kolonie. (Foto autor).

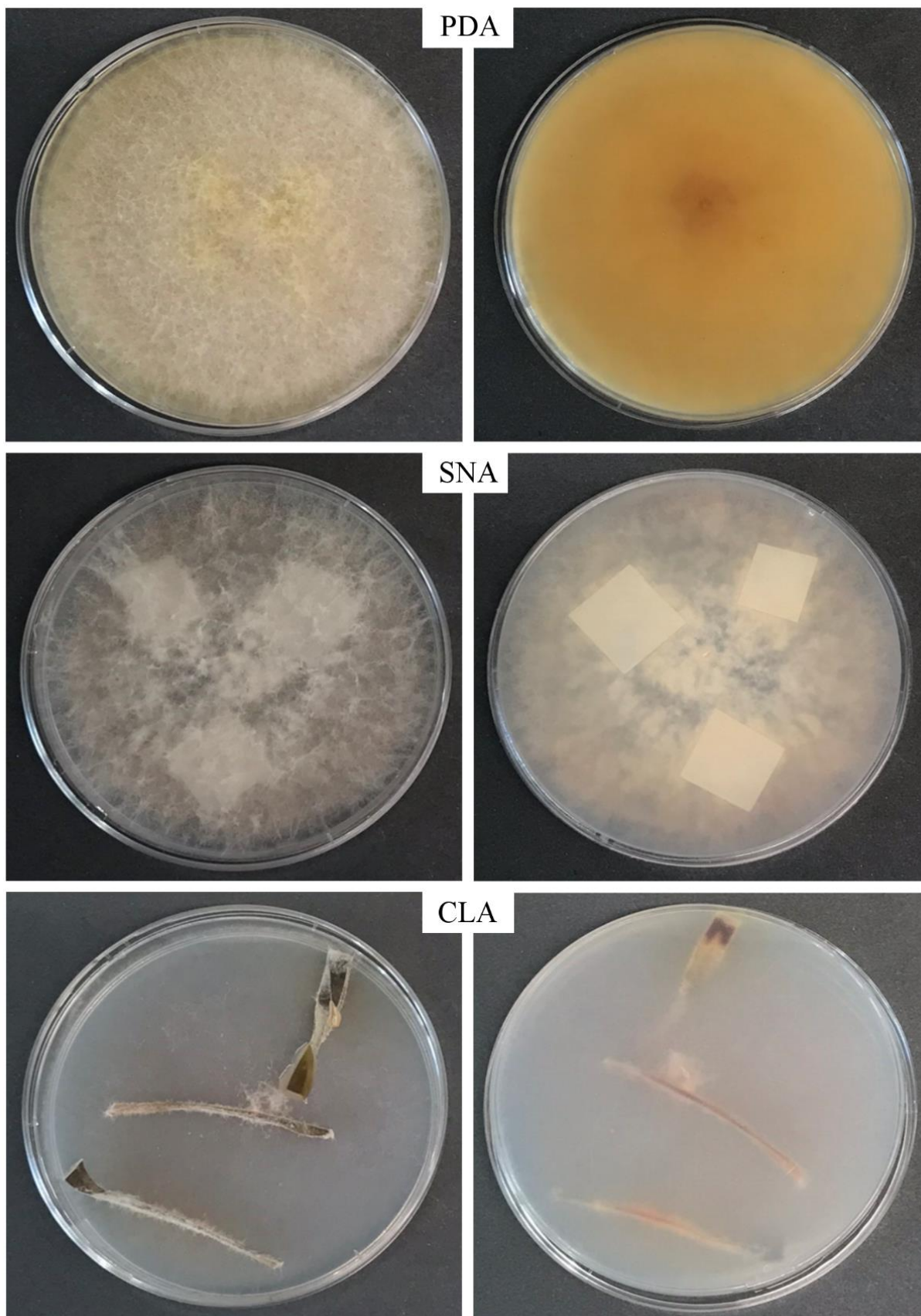


*Fusarium graminearum* CCM F-683. Kultivace 14 dní, laboratorní teplota, okenní parapet. Vlevo líc, vpravo rub kolonie. (Foto autor).



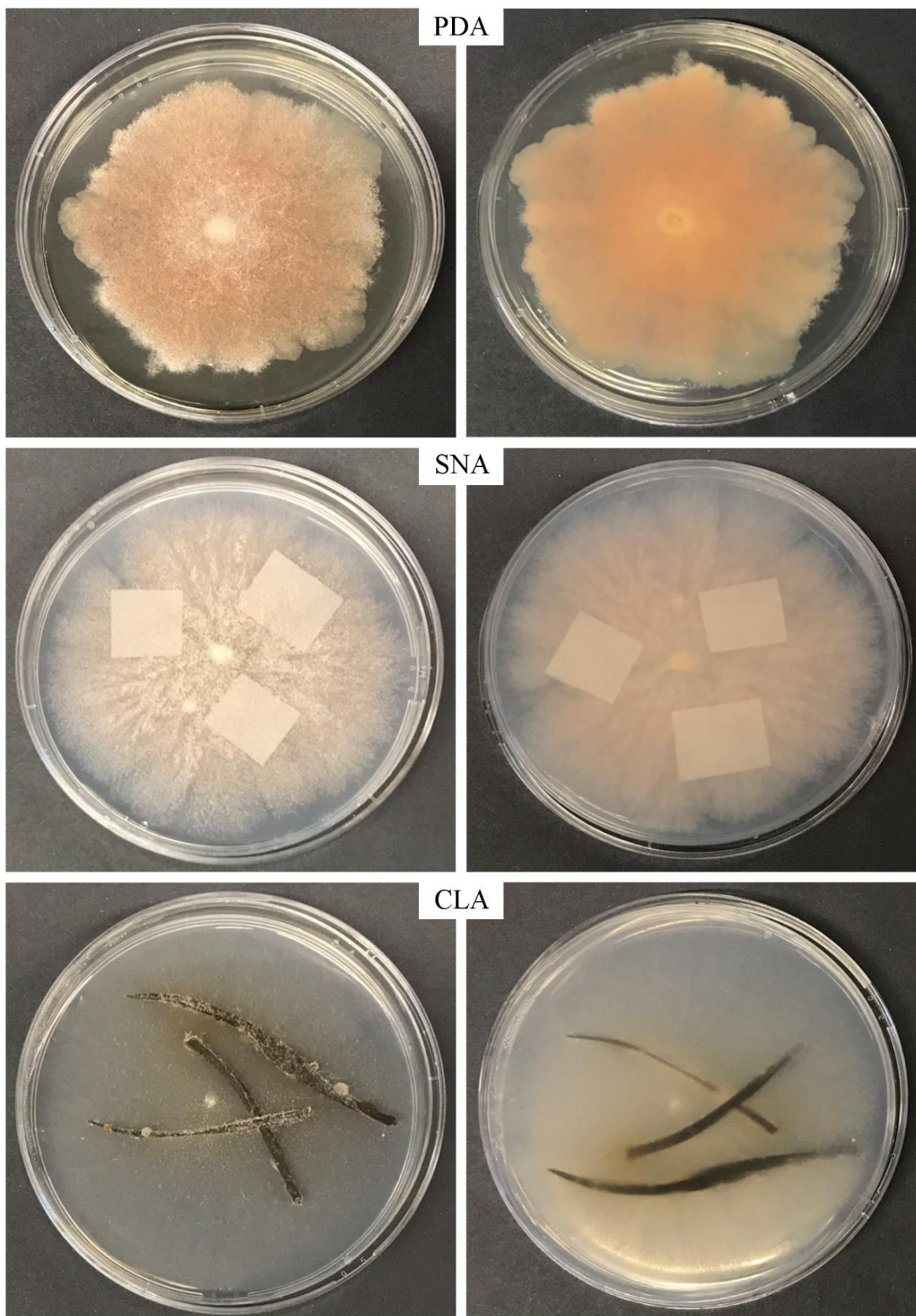


*Fusarium poae* CCM F-584, reklasifikované na *F. sporotrichioides*. Kultivace: PDA 10 dní, SNA a CLA 14 dní, laboratorní teplota, okenní parapet. Vlevo líc, vpravo rub kolonie. (Foto autor).

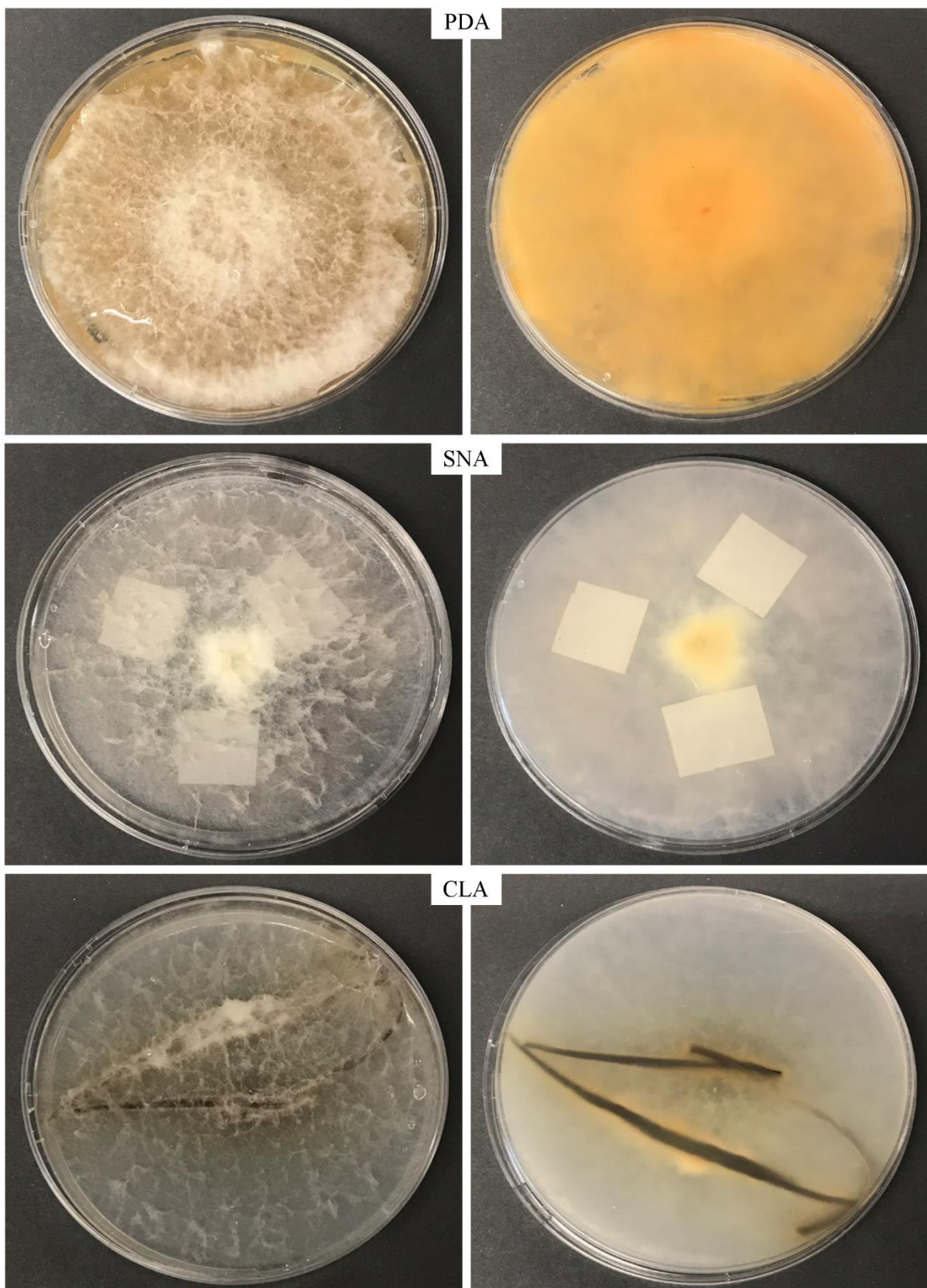


*Fusarium equiseti* CCF-1747. Kultivace 14 dní, laboratorní teplota, okenní parapet. Vlevo líc, vpravo rub kolonie.  
(Foto autor).



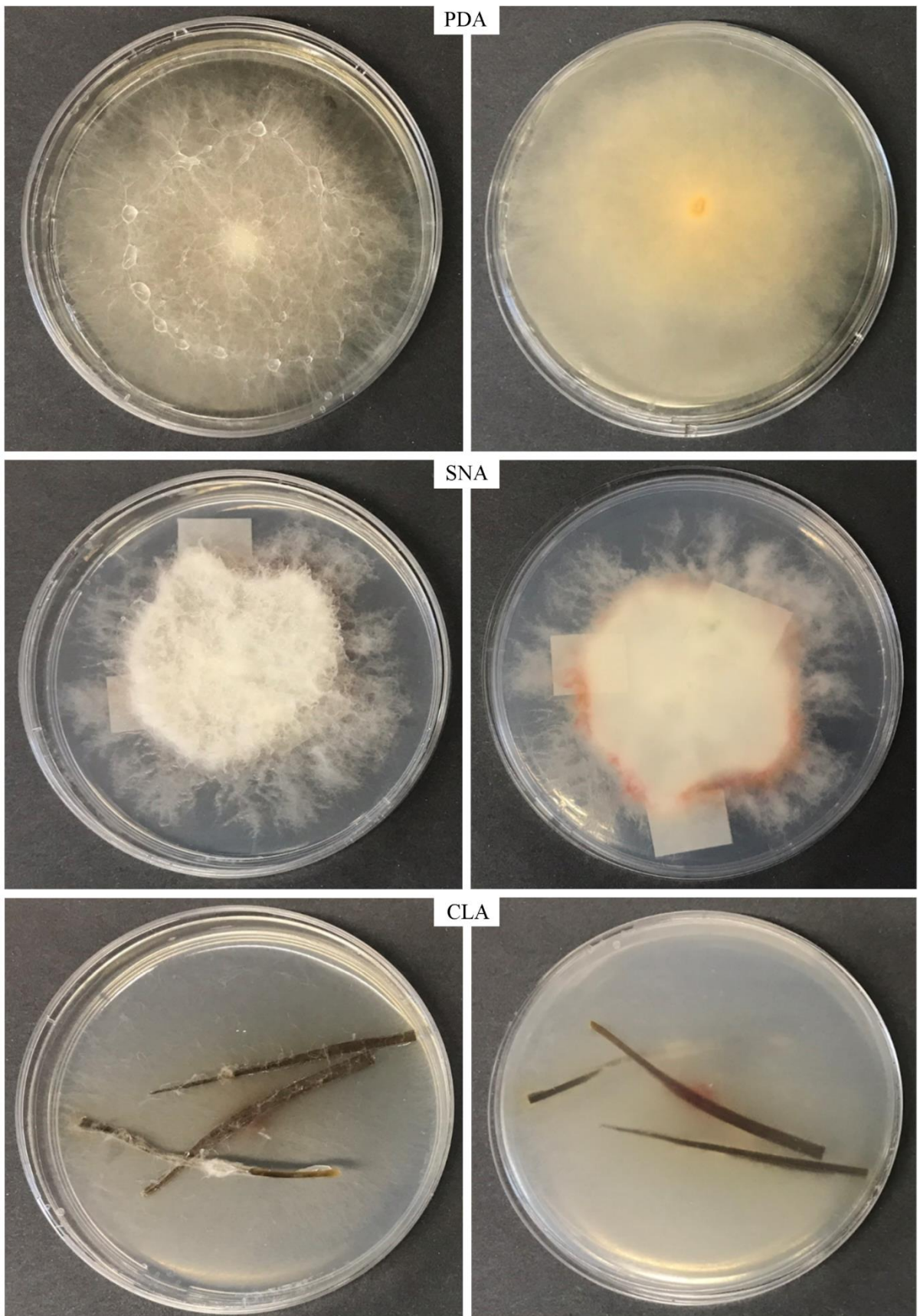


*Fusarium langsethiae* (izolát 21). Kultivace 14 dní, laboratorní teplota, okenní parapet. Vlevo líc, vpravo rub kolonie. (Foto autor).

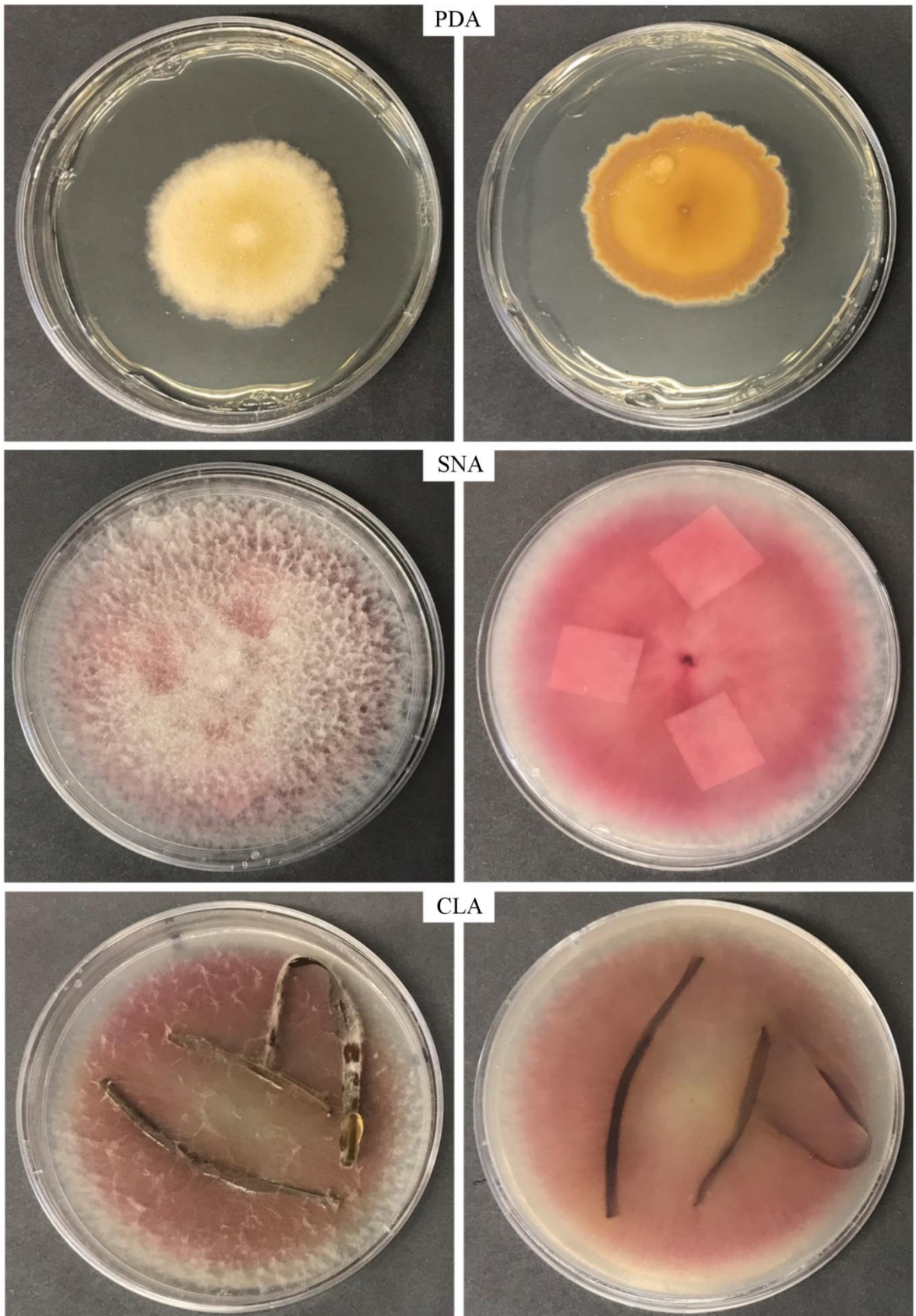


*Fusarium poae* (izolát 1). Kultivace 14 dní, laboratorní teplota, okenní parapet. Vlevo líc, vpravo rub kolonie.  
(Foto autor).





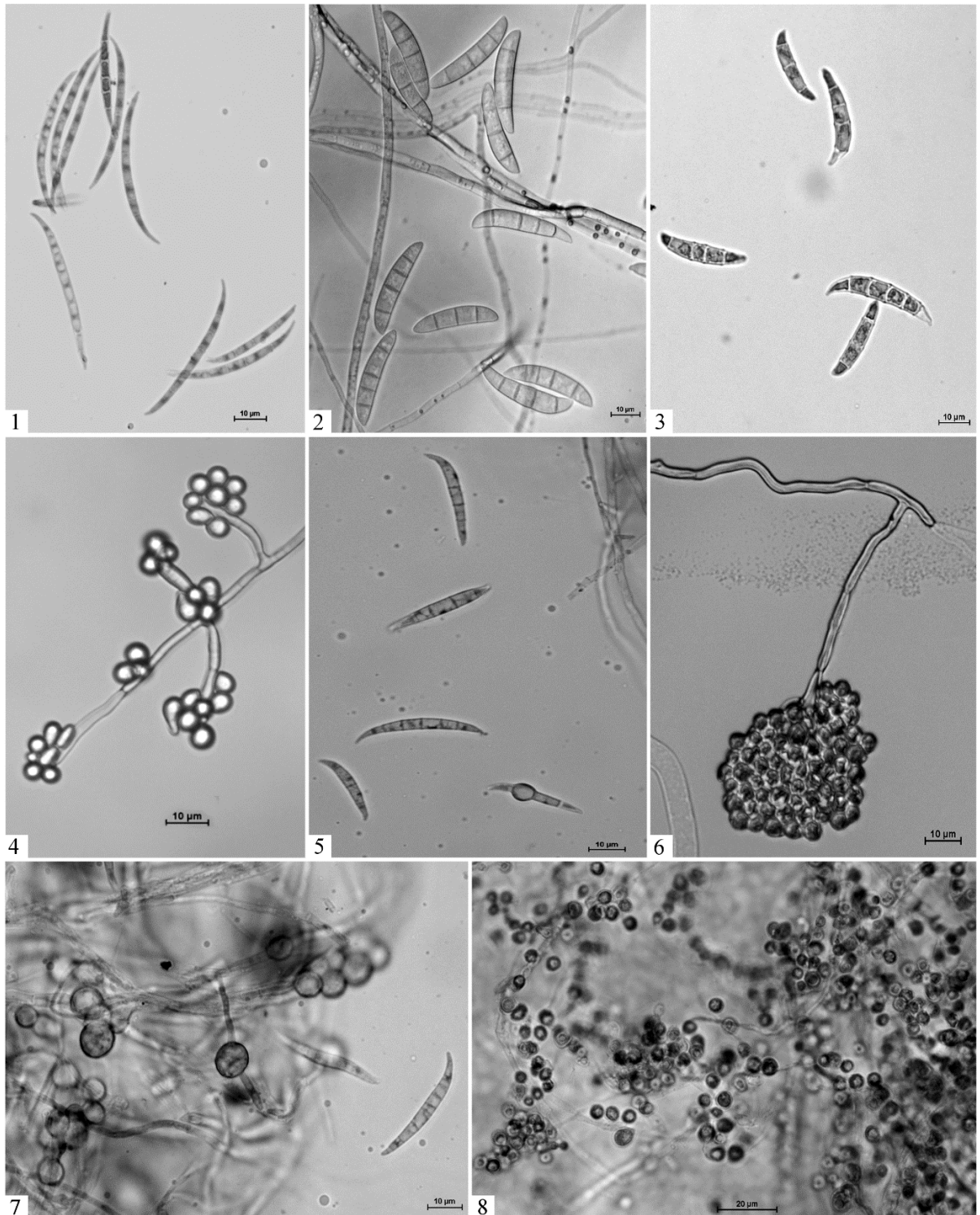
*Fusarium tricinctum* (izolát 2). Kultivace 13 dní, laboratorní teplota, okenní parapet. Vlevo líc, vpravo rub kolonie. (Foto autor).



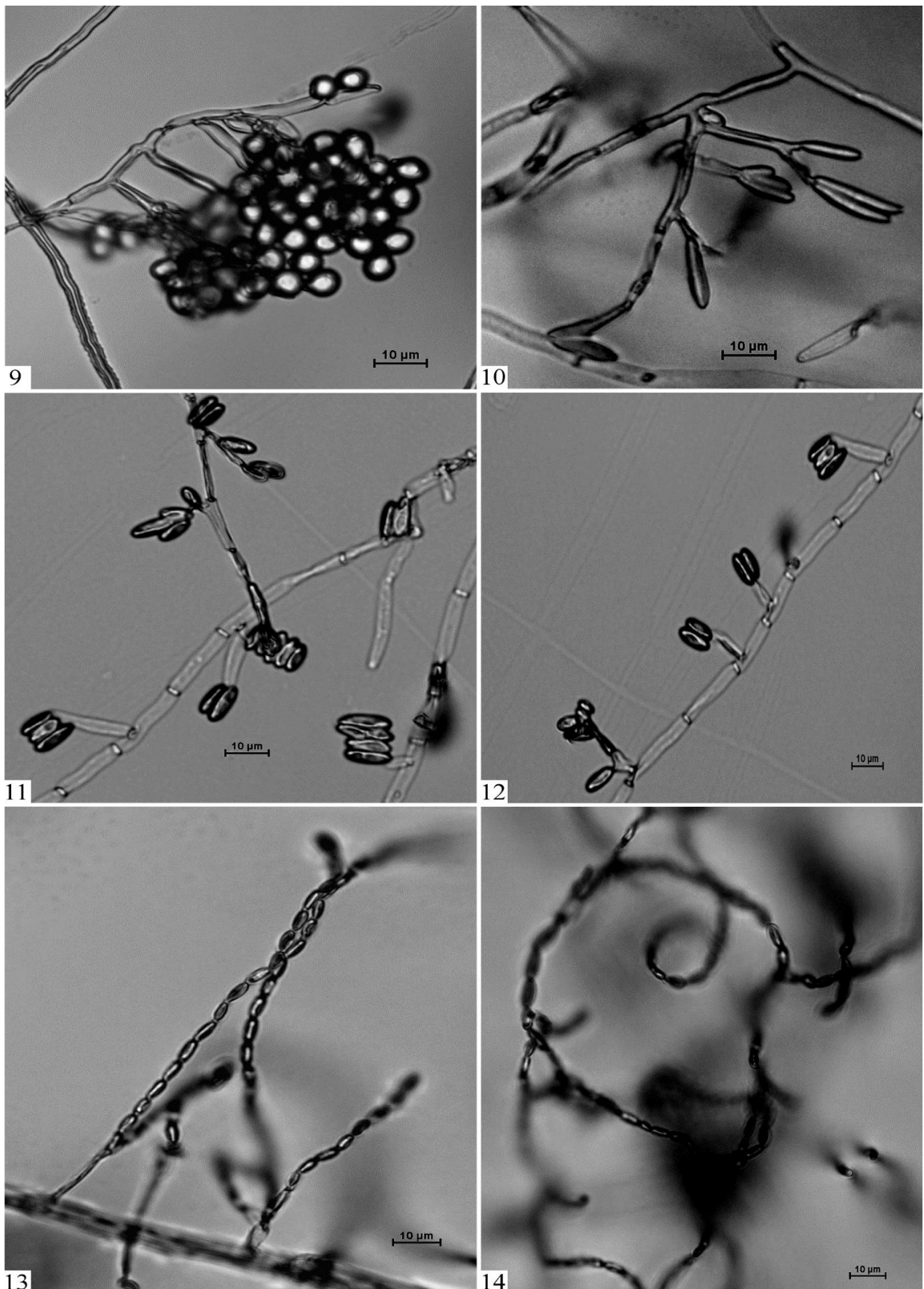
*Fusarium tricinctum* (izolát 14). Kultivace 13 dní, laboratorní teplota, okenní parapet. Vlevo líc, vpravo rub kolonie. (Foto autor).



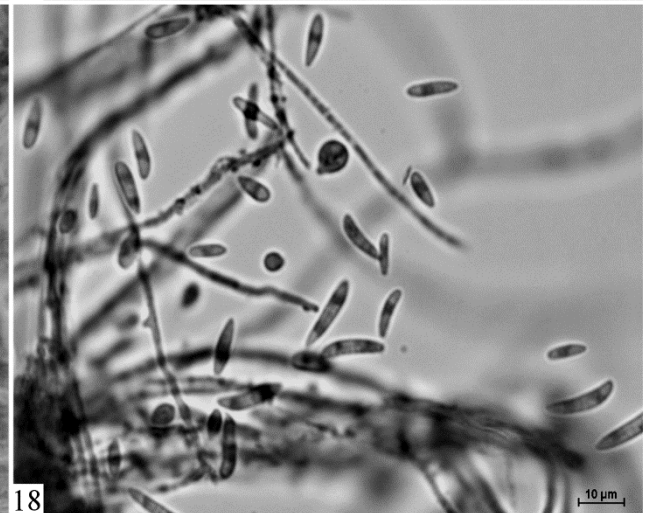
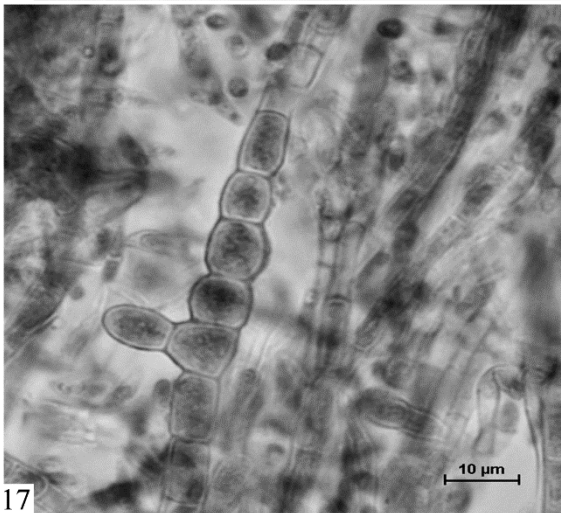
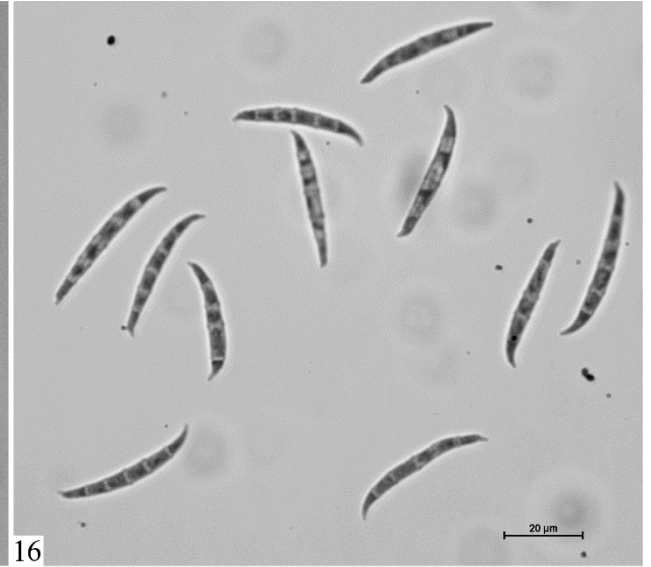
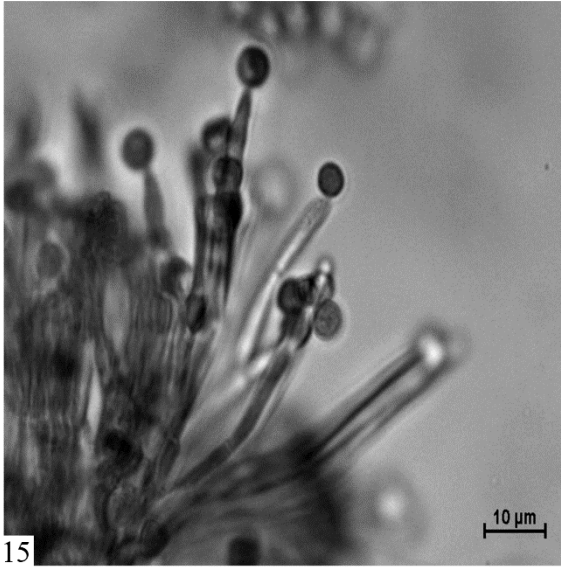
Příloha C Mikroskopické znaky vybraných plísní rodu *Fusarium*. Doba kultivace se pohybovala v rozmezí 2-4 týdnů na okenním parapetu při laboratorní teplotě. Všechny byly mikroskopovány se zvětšením 40 x 10 (400x) (Foto autor).



1: makrokonidie *F. avenaceum* CCM-8015 v preparátu z CLA; 2: makrokonidie *F. culmorum* CCF-1839 *in situ* na CLA; 3: makrokonidie *F. culmorum* CCF-1839 v preparátu z CLA; 4: fialidy s mikrokonidii *F. poae* CCM F-584 pomocí PCR reklasifikované na *F. sporotrichioides in situ* na SNA; 5: makrokonidie *F. equiseti* CCF-1747 v preparátu z CLA; 6: fialidy s mikrokonidii *in situ* *F. poae* (izolát 1); 7: chlamydospory a makrokonidie *F. equiseti* CCF-1747; 8: mikrokonidie *F. poae* CCM F-169 v preparátu z SNA.






9: mikrokonidie *F. tricinctum* (izolát 2) *in situ* na SNA; 10: mikrokonidie *F. tricinctum* (izolát 14) *in situ* na SNA; 11, 12: monofialidy a polyfialidy s mikrokonidii izolátu 64. Pravděpodobně se jedná o druh *F. subglutinans*, člen *Fusarium fujikuroi* species komplex.; 13, 14 mikrokonidie izolátu 39 *in situ* na SNA. Pravděpodobně se jedná o druh *F. verticillioides*, člen *Fusarium fujikuroi* species komplex.





15: monofialidy s mikrokonidiemi *F. langsethiae* (izolát 21) v preparátu z SNA; 16: makrokonidie *F. graminearum* CCM F-683 v preparátu z CLA; 17: chlamydospory *F. sporotrichioides* CCF-3212 v preparátu z SNA; 18: mikrokonidie *F. sporotrichioides* CCF-3212 v preparátu z SNA.

Příloha D Vyjádření celkových počtů plísní dle české technické normy ČSN ISO 21527-2. Barevně označené počty kolonií představují kolonie zahrnuté do vyjádření výsledků v podobě kolonie tvořících jednotky (KTJ)/g.

Vzorek	aw (25 °C)		Počty kolonií plísní DG18				KTJ/g
			II. ředění		III. Ředění		
1	0,495	0,488	11	14	2	2	1,3E+03
2	0,449	0,454	8	2	0	0	5,0E+02
3	0,494	0,487	3	17	0	1	1,7E+03
4	0,470	0,476	0	0	0	0	<1,0E+02
5	0,481	0,480	9	12	3	2	1,1E+03
6	0,471	0,468	4	10	0	0	1,0E+03
7	0,523	0,524	3	2	1	1	<1,0E+02
8	0,508	0,505	1	0	1	0	<1,0E+02
9	0,516	0,514	2	0	0	0	<1,0E+02
10	0,566	0,567	0	0	1	0	<1,0E+02
11	0,464	0,461	1	0	1	0	<1,0E+02
12	0,466	0,471	1	1	0	0	<1,0E+02
13	0,548	0,549	2	7	0	0	7,0E+02
14	0,452	0,446	8	3	0	0	3,0E+02
15	0,543	0,537	3	6	2	0	6,0E+02
16	0,533	0,532	5	2	1	0	2,0E+02
17	0,494	0,494	0	0	0	0	<1,0E+02
18	0,462	0,465	17	13	2	1	1,5E+03
19	0,564	0,566	5	7	0	0	6,0E+02
20	0,532	0,528	36	30	8	8	3,7E+03
21	0,539	0,543	11	3	0	0	1,1E+03
22	0,472	0,472	11	3	1	0	1,1E+03
23	0,559	0,555	30	33	8	8	3,6E+03
24	0,544	0,548	7	7	5	0	6,3E+02
25	0,449	0,453	26	18	2	0	2,2E+03
26	0,550	0,548	8	3	1	1	8,0E+02
27	0,489	0,489	7	10	1	13	1,4E+03

 Počet N plísní (vyjádření standardních počtů)  
 Odhad počtů N<sub>E</sub> plísní (vyjádření nízkých počtů)  
 Počet N' plísní (zvláštní případ, kdy je pro výpočet k dispozici jedna miska, která obsahuje více než 10 kolonií, ale méně než 150)

 Fuzária byla dodatečně vyizolována klíčením na PDA  
 Fuzária nebyla vyizolována