

Reakce odrůd jarního ječmene vůči síťovité skvrnitosti v lokalitě Kroměříž (2003–2004) a detekce tohoto patogena pomocí specifických märkrů

Ing. Mgr. Věra Minaříková, Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s.r.o.
Mgr. et Mgr. Leona Leišová, Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha-Ruzyně

Hnědé skvrny na ječmenech mohou být způsobeny mnohými přičinami: může se např. jednat o skvrny způsobené fyziologickými procesy a změnami v rostlině, ale také původcem mohou být mnohé druhy houbových patogenů. Nejčastějšími z nich jsou síťovitá a hnědá skvrnitost (analogie v angličtině jsou net a spot blotch), přičemž pod společným „spot“ jsou obvykle zahrnuti dva houbový původci: jedním z nich je *Drechslera teres* f.sp. *maculata* a druhým *Drechslera sorokiniana* (*Helminthosporium sativum*). Klasická síťovitá skvrnitost je způsobována houbou *Drechslera teres* f. sp. *teres* (*Helminthosporium teres* a *Pyrenophora teres* (Died.) Drechs.). Čtveriči podobných houbových patogenů uzavírá pruhovitost ječná, kterou podmiňuje *Drechslera graminea* (*Helminthosporium gramineum*). Ta je od výše uvedených listových onemocnění nejsnadněji rozpoznatelná – protáhlé symptomy vedou po celé délce listové čepele a jednoznačně vycházejí už z pochvy. Později způsobuje rozštěpení listové čepele. Pokud napadne rostlinu ječmene v rané fázi, ta obvykle nevymetá. Podobné jsou symptomy síťovité skvrnitosti s tím rozdílem, že houba nekrotizuje listové pletivo i napříč pries nervaturu (vytváří sítku) a zásadně se její symptomy objevují nejčastěji v horní třetině listové čepele. Ostatní uvedení původci způsobují většinou oválné a nepravidelné skvrny na listech.

Podle symptomů lze tedy předběžně určit původce, bez mikroskopického rozlišení konidii to ale nikdy nemůžeme učinit s naprostou jistotou. Existují však metody, které vycházejí z principu rozdílnosti DNA jednotlivých patogenů. Přesněji řečeno tyto metody se v poslední době více či méně úspěšně vyvíjejí. Na tuto problematiku byl zaměřen projekt „Vývoj metody pro kvantifikaci houbových patogenů na bázi Real time PCR“, kde cílem bylo propracovat

novou metodu pro druhově specifickou kvantitativní detekci houbových patogenů v listových pletivech hostitelských rostlin. Výše uvedené houby posloužily jako modelové organismy.

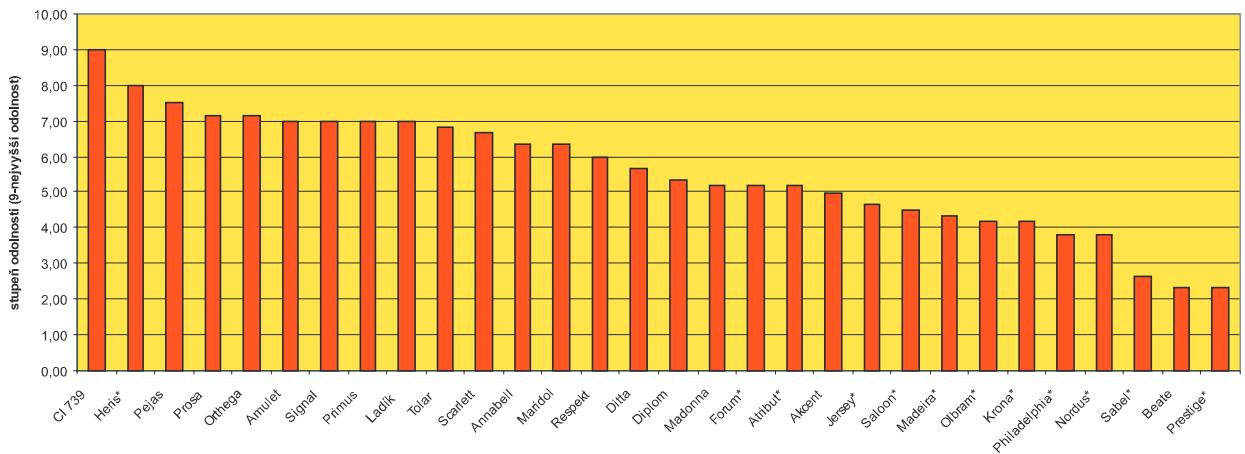
V rámci tohoto projektu byly vysévány a hodnoceny registrované odrůdy jarního ječmene jak ve skleníkových podmínkách, tak v podmínkách přirozené polní infekce. Primárními na těchto pokusech byly sběry infikovaných pletiv právě pro účely projektu. Sekundárně byly vyseté materiály hodnoceny a jejich reakce porovnávány v jednotlivých ročnících.

V letech 2002–2004 byly tyto odrůdy vysévány ručním výsevem do hnázd ve třech opakování. Termín výsevu byl vždy volen pozdější oproti běžnému agrotechnickému termínu z důvodu větší jistoty infekce sledovaného patogena. Předplodinou byla cukrovka.

Lokalita Kroměříž se nachází v nadmořské výšce 235 m a patří k teplému, mírně suchému klimatickému okrsku, v řepařské výrobní oblasti. Průměrná roční teplota je 8,7 °C, průměrný roční úhrn srážek činí 599 mm, s maximem v červenci a v srpnu a minimem v únoru. Půdní typ je černozem luvizemní. Půdy jsou převážně velmi hluboké, s plně nasyceným sorpčním komplexem a neutrální reakcí.

V roce 2002 nebyla v pokusech zaznamenána významná infekce. Bylo provedeno jediné hodnocení, a z toho vyplynulo, že nejnáhylnější odrůda studovaného sortimentu, náhylná kontrola Beate, je v pokusu téměř bez výskytu patogena. Byl pouze zaznamenán jeho výskyt, což bylo hodnoceno známkou 8 v rámci boni-

Graf 1: Pořadí odrůd podle reakcí k přirozené infekci *Pyrenophora teres* v letech 2003–2004 na lokalitě Kroměříž



tační stupnice 9–1, kde stupeň 9 představuje materiály bez napadení a známka 1 je přidělována materiálům, jejichž listové čepele byly patogenem poškozeny na 75–100%. V jednom opakování byl výskyt hodnocen známkou 7. Ostatní odrůdy zůstaly bez výskytu patogena.

Materiály vyseté v letech 2003–2004 byly již vystaveny silnému infekčnímu tlaku. Během vegetace bylo provedeno trojí hodnocení pomocí uvedené stupnice. První hodnocení, které předchází, pouze zaznamenává u odrůdy první výskyt patogena.

Výsev dvaceti osmi vybraných odrůd ze sortimentu jarních ječmenů a dvou kontrol (rezistentní CI 739 a náchylná Beata) byl proveden dne 17. 4. 2003. Během vegetace byla provedena hodnocení v termínech 20. 6., 25. 6. a 9. 7. 2003.

V roce 2004 byl pokus vyset dne 23. 4. Hodnocení byla provedena v termínech 8. 6., 23. 6., 1. 7. a 17. 7. Nutno poznamenat, že infekční tlak patogena v roce 2004 byl značný, ale vesměs se projevil až v měsíci červenci. Hodnocení jednotlivých odrůd se snížilo od druhého ke čtvrtému termínu o 3–4 stupně. Celkově možno konstatovat, že v roce silnějšího infekčního tlaku patogena bylo u většiny studovaných odrůd zaznamenáno i větší napadení (u 20ti odrůd) než v roce 2003. U některých z nich (Maridol, Forum, Atribut, Akcent, Respekt, Prosa a Scarlett) bylo napadení větší až o dva stupně, u odrůdy Signal skoro o tři stupně. V pěti případech bylo hodnocení v obou letech totožné (Diplom, Heris, Sabel a obě kontroly: jak rezistentní CI 739, tak náchylná Beata). V pěti případech naopak byly odrůdy náchylnější vůči studovanému patogenu v roce 2003 (Nordus, Madona, Madeira, Krona a Atribut). Konečná hodnocení sortimentu odrůd jarního ječmene z obou let byla zprůměrována a bylo sestaveno pořadí podle reakcí odrůd (graf 1).

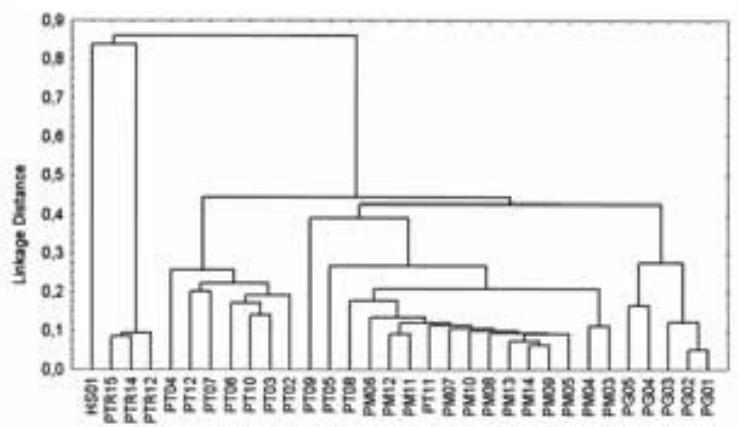
Hvězdička u jednotlivých odrůd v tomto grafu představuje odrůdy jarních ječmenů s vysokou odolností k dominantnímu listovému patogenu na ječmeni, a to k padlím travnímu (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*). S výjimkou odrůdy Heris se tyto odrůdy nacházejí ve druhé polovině žebříčku odolnosti k síťovité skvrnitosti ječmene. Je patrné, že těmto odrůdám nepostačuje „dobrá genetická výbava“. V ročnících jako byl právě uplynulý – 2004, kdy odrůdy zdárně projdou tu část vegetace, která se většinou vyznačuje nižšími teplotami potřebnými pro vývoj padlí, nastoupí o něco vyšší teploty a vegetace se díky i např. vyšším srážkám prodlouží, teprve pod silným



infekčním tlakem jsou napadeny skvrnitostmi, a to až na úroveň náchylné kontroly. Je tedy skutečně nutno obrátit pozornost ke zdrojům rezistence ke skvrnitostem a zaměřit se na šlechtění odrůd s kombinovanou odolností. Tím je myšleno nejen k obligátním a fakultativním patogenům, ale jak již bylo výše napsáno, každá ze skvrnitostí má „svou“ DNA, tudíž i každá z uvedených skvrnitostí má „své“ zdroje odolnosti.

Na prvním místě je však nezbytná znalost těchto houbových patogenů, schopnost jejich rozlišení a znalost jejich specifického chování k rostlinnému hostiteli. Výše zmíněné metody jdou jednoznačně k tomuto cíli. Metodou vhodnou k studiu vnitro a mezirodové variability hub je AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), která je založena na analýze restrikčních fragmentů pomocí PCR se značenými specifickými primery (Vos et al. 1995). Na našem pracovišti jsme pro analýzu AFLP použili systém restrikčních enzymů *MseI* a *EcoRI* a selektivních *MseI* a *EcoRI* primerů s přesahy 2 nt. Analýzou produktů selektivní amplifikace, třetího kroku AFLP analýzy, u 32 genotypů s 11 primerovými kombinacemi bylo detekováno 1247 polymorfních signálů. Aplikací programu RAPDALG (Armstrong et al. 1994) byly získány relativní genetické

Obr. 1: Dendrogram vytvořený na základě dat z AFLP analýzy



vzdálenosti. Dalším zpracováním dat programem STATISTICA byl získán odpovídající dendrogram (Obrázek 1). Jednotlivé větve dendrogramu odpovídají jednotlivým studovaným druhům, u *P. teres* je možné rozlišit i obě formy spot a net. Je možné vidět i variabilitu izolátů v rámci jednoho druhu či formy houby rodu *Pyrenophora*, což odpovídá jak zkušenostem fytopatologů, tak i publikovaným výsledkům (Campbell et al. 1999; Jonsson et al. 2000; Wu et al. 2002). Z dendrogramu dále vyplývá, že lze na základě polymorfismu restrikčních míst rozlišit studované druhy rodu *Pyrenophora* a lze tedy tuto metodu použít k získání druhově specifických markerů.

Fragmenty specifické pro zvolený genotyp, v našem případě formu patogena *P. teres*, byly izolovány, klonovány do pPCR Script Amp SK (+) klonovacího vektoru a sekvencovány. Na základě získaných sekvencí byly pomocí programu Primer Express navrženy specifické primery (Leišová et al. 2004). Pro detekci přítomnosti *P. teres* f.sp. *teres* byly navrženy markery PTT471h, PTT429g a PTT339i, velikosti amplifikačních produktů mají délku 91bp, 93bp a 81bp. Pro detekci *P. teres* f.sp. *maculata* byly navrženy markery PTM494d, PTM494d7 a PTM348j, s amplifikačními produkty o délkách 161bp, 379bp a 66bp. Navíc byly navrženy pri-

mery PT194m a PT139m s amplifikačními produkty o velikostech 194bp a 139bp na základě sekvence ITS I oblasti. PCR s těmito primery však neposkytují specifické signály rozlišující spot a net formu *P. teres*.

Po optimalizaci PCR reakcí se specifickými primery byla testována jejich specifitost. Analýza produktů PCR reakce ukázala, že pro detekci *Pyrenophora teres* f.sp. *teres* jsou specifické pouze markery PTT471h a PTM348j. Marker PTT429g poskytuje amplifikační produkt u obou forem *P. teres*. Pro detekci *P. teres* f.sp. *maculata* se ukázaly být vhodnými markery PTM494d a PTM340i. Marker PTM379d7 poskytuje signály u obou forem *P. teres* (Leisova et al. 2004).

Markery specifické pro spot a net formu *P. teres* vyvinuté v rámci tohoto projektu byly použity pro detekci *P. teres* f.sp. *teres* a *P. teres* f.sp. *maculata* v listových pletivech hostitele po umělé inkulaci. Výsledky jasné prokázaly, že lze pomocí nich specificky detektovat jak spot, tak i net formu *P. teres* v listových pletivech hostitele.

Dále byly vyvinuty markery a optimalizována metodika pro kvantitativní detekce *P. teres* v listových pletivech hostitele pomocí Real-time PCR. Výsledky detekce, prováděné metodou Real-time PCR přesněji odpovídají míře napadení hostitele patogenem než jak je tomu u vizuálního hodnocení míry napadení podle velikosti a počtu symptomů na listech.

Oba přístupy detekce patogena (kvalitativní i kvantitativní) v pletivech hostitele mohou být využity pro studijní účely, ale hlavně

v zemědělské praxi všude tam, kde je třeba rozlišit spot a net formu *P. teres*, či kde je třeba kvalifikovaně odhadnout míru napadení rostlin pro následnou aplikaci fungicidu nebo pro další ochranu porostů ječmene.

NAZV QC 1361 – Vývoj metody pro kvantifikaci houbových patogenů na bázi RealTime PCR (2001–2004)

Literatura:

ARMSTRONG J.S., GIBBS A.J., PEAKALL R., WEILLER G. (1994): The RAPDistance package. ftp: life.anu.edu.au/pub/software/RAPDistance or http://life.anu.edu.au/molecular/software.

CAMPBELL G.F., CROUS P.W., LUCAS J.A. (1999): *Pyrenophora teres* f. *maculata*, the cause of *Pyrenophora* leaf spot of barley in South Africa. Mycol. Res. **103**: 257–267.

JOHNSON R., SÄLL T., BRYNGELSSON T. (2000): Genetic diversity for random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in two Swedish populations of *Pyrenophora teres*. Can. J. Plant Pathol. **22**: 258–264.

LEIŠOVÁ L., KUČERA L., MINAŘÍKOVÁ V., OVESNÁ J. (2004): AFLP-based PCR markers that differentiate spot and net form of *Pyrenophora teres*. Plant Pathology **53**: in press.

VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., VAN DE LEE T., HORNERS M., FRIJTERS A., POT J., PELEMAN J., KUIJPER M., ZABEAU M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, **23**: 4407–4414.

WU H.L., STEFFENSON B.J., LI Y., OLESON A.E., ZHONÍ S. (2002): Genetic variation for virulence and RFLP markers in *Pyrenophora teres*. Can. J. Plant Pathol. **25**: 82–90.

Mustang®

Jeden herbicid na všechny dvouděložné plevely v obilninách a kukuřici

Nejpříznivější poměr cen a spektra účinku

Hubení všech významných plevelů v obilninách (Hermánky, rmeny, svízel, mák, chrpa, ptačinec, merlíky, rdesna, laskavce, pcháč, šťovíky, výdrol, řepky a ostatní brukvovité, pelyňky, mléče a další dvouděložné plevely).

Univerzální použití v obilninách, kukuřici a travách na semeno

Spolehlivá účinnost na merlíky

Možnost mnoha kombinací proti chundelce (Treflan, Monitor, Attribut, Tokan, Lantipur, Syncuran a další)

Dow AgroSciences

Čechy: 602 248 198, 602 275 038, 602 217 197
Morava a Slezsko: 602 523 607, 602 571 763

Starane® 250 EC

Jistota výhry

nejen nad svízelem přítulou, ale i dalšími dvouděložnými pleveli v obilninách a máku

Základ herbicidní ochrany obilnin

Starane 250 EC je možno kombinovat s dalšími přípravky běžně používanými v obilninách k rozšíření spektra účinnosti na chundelku metlici nebo dvouděložné plevely.

Dow AgroSciences

Další informace na telefonních číslech:
602 248 198, 602 275 038, 602 217 197
602 523 607, 602 571 763