

Molekulární metody ve fytopatologii

Pavel Matušinsky, Agrotest fyto, s.r.o.

Metody molekulární biologie nacházejí široké uplatnění v mnoha vědních oborech a v posledních letech jsou hojně využívány i v zemědělském výzkumu. Lze je efektivně využít i ve fytopatologii a to jak k přesné diagnostice patogenů, tak i k jejich podrobnému studiu. Samostatnou kapitolou je šlechtění kulturních plodin na rezistence vůči patogenům za použití molekulárních markerů (MAS, *marker assisted selection*). V následujícím textu bych se rád věnoval jednak diagnostice patogenů pomocí molekulárních technik, jak jsou prováděny v laboratoři Zemědělského výzkumného ústavu v Kroměříži a také využitím těchto postupů při charakterizaci fuzárií produkujících mykotoxiny.

Obecný princip uplatnění těchto moderních metod v rostlinolékařské diagnostice je založen na polymorfismu nukleových kyselin. DNA markery mohou být použity k identifikaci patogenů kultivovaných v umělých podmínkách na Petriho miskách nebo přímo v napadené rostlině. Výhodou těchto metod je jejich citlivost a přesnost. Umožňují detekovat přítomnost škodlivého organismu ještě před jeho expanzí. K přesné determinaci patogena není nutná jeho časově náročná kultivace. Navíc některé taxony mohou být při použití metod založených na kultivaci použitým médiem a kultivačními podmínkami zvýhodněny a u jiných je kultivace nanejvýš obtížná.

Laboratoř molekulární biologie v Zemědělském výzkumném ústavu v Kroměříži byla uvedena do provozu na podzim minulého roku. Od té doby se nám podařilo optimalizovat metodiku identifikace několika původců závažných chorob obilovin a na dalších intenzivně pracujeme. Nezbytnou součástí této činnosti je vytvoření kolekce pozitivních kontrol, tedy referenčních vzorků, které slouží k potvrzení správného průběhu PCR (polymerázové řetězové reakce). K tomuto účelu slouží sbírka houbových patogenů na Oddělení ochrany rostlin a agrotechniky ZVÚ obsahující základní kultury fytopatogenních hub. Napadení rostlin chorobami diagnostikujeme např. v segmentech stébel, kořenech, listech, zrnu, mouce a sladu. Prvním krokem u těchto postupů je důkladná homogenizace vzorku, po té následuje rozdrcení tkáně v tekutém dusíku a purifikace genomové DNA odstraněním lipidů, proteinů, polysacharidů, zbytků buněčných stěn a orga-

nel. V polymerázové řetězové reakci je DNA vzorku za přítomnosti druhově specifických primerů amplifikována (namnožena). Vzorek je po PCR nanesen do agarozového gelu obarveného ethidium bromidem a vložen do elektrického pole. Záporně nabité DNA migruje ke kladnému pólu a její fragmenty se separují dle velikosti. Vizualizace produktu je poté provedena pod UV zářením.

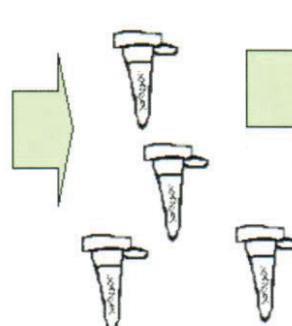
Praktické využití těchto metod bych rád demonstroval na několika příkladech. Prvním z nich je diagnostika pravého stéblolamu způsobovaného dvěma patogeny *Oculimacula yallundae* a *O. acuformis*. K účinnému zvládnutí tohoto onemocnění pšenice je důležitá včasná diagnostika. Rozpoznat skutečného původce chorob pat stébel v růstové fázi prvního kolénka, tedy v době která je pro provedení ochranného opatření klíčová, je velmi komplikované. Baze stébla může být totiž kromě stéblolamu kolonizována celou řadou hub jako např. *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. avenaceum*, *Microdochium nivale* nebo *Rhizoctonia cerealis*. Použitím druhově specifických primerů, v tomto případě *Ty16F/Ty16R* a *Ta05F/Ta05R* (Nicholson et al. 1997), je amplifikován fragment o velikosti 1.05 kb pro *O. yallundae* a fragment o velikosti 0.33 kb pro *O. acuformis*.

Na obrázku 1 vidíme zjednodušené schéma znázorňující výše popsaný postup při identifikaci jednotlivých druhů hub v rostlinné tkáni. Na fotografii gelu po elektroforéze můžeme vidět dva pozitivní signály, přičemž vzorek č. 2 s fragmentem o velikosti 0.33 kb odpovídá *O. acuformis* a vzorek č. 5 s fragmentem o velikosti 1.05 kb odpovídá *O. yallundae*. Ostatní vzorky jsou z hlediska přítomnosti *Oculimacula* spp. hodnoceny jako negativní (Obr. 1).

Druhým praktickým příkladem využití molekulárních metod je rozlišení fuzárií z hlediska schopnosti produkovat mykotoxiny ze skupiny trichothecenů. *F. graminearum* a *F. culmorum* jsou nejzávažnější původci klasových fuzarióz u nás, kteří se z hlediska produkce trichothecenových mykotoxinů deoxynivalenolu (DON) a nivalenolu (NIV) dělí na dva chemotypy. Nivalenol je látka velmi výrazně toxičtější nežli deoxynivalenol, proto může být informace o schopnosti konkrétního kmene fuzária zajímavá.



Izolace DNA, PCR, Elektroforéza



Obr. 1: Diagnostika stéblolamu molekulárními metodami (foto autor)

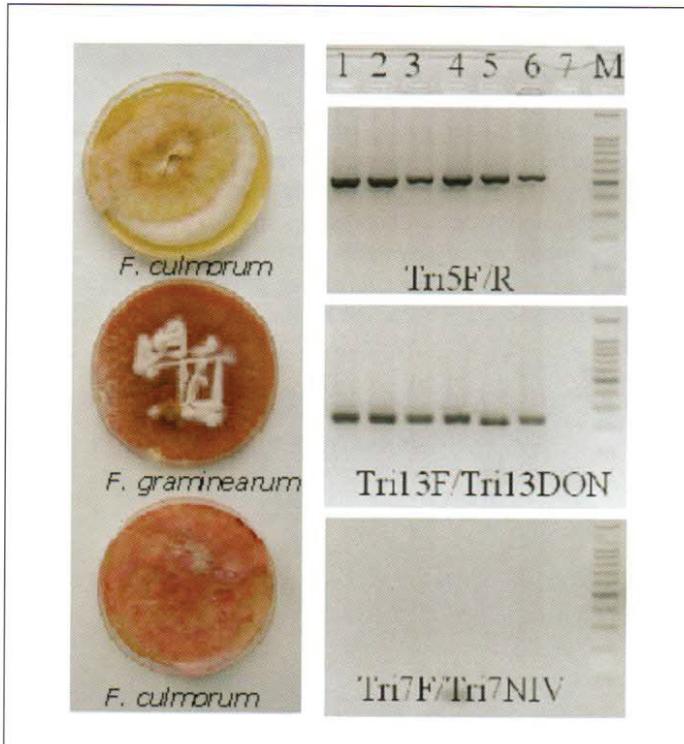
Tab. 1 Primery použité při analýze izolátů *Fusarium culmorum* a *F. graminearum*

č.	Druh (původ)	Tri5	Tri13NIV	Tri13DON	Tri7NIV	Tri7DON	Minus Tri7DON	Mykotoxin
1	<i>F. culmorum</i> (Kroměříž)	+	-	+	-	-	+	DON
2	<i>F. culmorum</i> (Praha)	+	-	+	-	-	+	DON
3	<i>F. culmorum</i> (Brno)	+	-	+	-	-	+	DON
4	<i>F. graminearum</i> (Kroměříž)	+	-	+	-	+	-	DON
5	<i>F. graminearum</i> (Praha)	+	-	+	-	+	-	DON
6	<i>F. graminearum</i> (Brno)	+	-	+	-	-	+	DON
7	Negativní kontrola	-	-	-	-	-	-	-

Pozn.: + pozitivní signál na gelu, - negativní odezva

V tabulce 1 je přehled analyzovaných vzorků s označením jejich původu. Také jsou zde jednotlivé použité primery a znaménkem +/- zaznamenán výsledek PCR. Na základě znalosti uplatnění jednotlivých genů při biosyntéze trichothecenů, můžeme spolehlivě rozeznat kmeny schopné produkce trichothecenů a jejich převažující chemotyp. Gen Tri5 je zodpovědný za první krok v syntéze trichothecenů, protože kóduje enzym katalyzující přeměnu farnesyl pyrofosfátu na trichodienu. Tento gen byl přítomen u všech šesti sledovaných vzorků, které jsou tudíž schopné produkovat trichotheceny (Obr. 2). Další krok analýzy byl zaměřen na geny Tri7 a Tri13, které jsou důležité pro syntézu nivalenolu. V případě, že jsou tyto geny nefunkční, můžeme s jistotou prohlásit, že sledované izoláty patří do deoxynivalenolového chemotypu, což bylo analýzou potvrzeno (Tab. 1).

Vzorky 1–7 z fotografie odpovídají údajům v tab. 1, písmenem M je označen velikostní standard (DNA Ladder 100bp) (foto autor).



Obr. 2: Fotografie gelu po elektroforéze s produktem PCR. Použité primery jsou zaměřeny na tu část genomu fuzárií, která je rozhodující při biosyntéze trichothecenů.

Z těchto dvou příkladů je zřejmé, že molekulární metody mohou mít praktický přínos v rostlinolékařství. Možnosti dalšího využití molekulárně biologických technik v našem oboru je celá řada. Např. pomocí real-time PCR lze kvantifikovat množství patogena ve tkání a technikami DNA arrays lze během jediné reakce diagnostikovat celou paletu patogenních organismů. Molekulární metody se vyznačují vysokou citlivostí a přesností a pravděpodobně se s nimi budeme setkávat stále častěji. Výzkum v této oblasti má velmi progresivní trend a dá se předpokládat četnější uplatňování nových technologií i ve fytopatologii, tak jak se tomu děje v ostatních oborech lidské činnosti.

Poděkování

Tento příspěvek vznikl za finanční podpory GAČR 522/06/P103

SUNAGREEN®

Stimulujte svůj zisk!

Proč do JEČMENE ?

- Zvýšení výnosu zrna**
- Snížení obsahu N látek**
- Zahuštění porostu**
- Vyrovnaní odnoží**

Ječmen jarní

- Řepka olejná**
- Pšenice ozimá**
- Brambory**
- Mák**

...JINAK DO TOHO NEVĚDEU! DVOJNAŠOBNÝ VÝNOS – DVOJNAŠOBNÁ VÍZPLATA ...!!!

CHEMAP AGRO

Informace pro pěstitele a odběratele:
CHEMAP AGRO, spol. s r. o., chemapagro@chemap.cz, tel. 603 106 942, 603 848 617

www.chemap.cz