

# Detekce přítomnosti spor *Tilletia controversa* v půdě

(*Detection of Tilletia controversa spores in soil*)

Evženie Prokinová<sup>1\*</sup>, Jakub Řičař<sup>1</sup>, Michaela Kochanová<sup>1</sup>, Marie Váňová<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Česká zemědělská univerzita v Praze, fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, katedra ochrany rostlin, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 Suchbátův Břez, 165 21 Praha 6 Suchbátův Břez,

<sup>2</sup> Agrotest fyto, s.r.o. Havlíčkova 2787/121 767 01 Kroměříž

## Souhrn

*Tilletia controversa* – původce zakrslé sněti pšeničné – patří k nebezpečným patogenům pšenice v ČR i v řadě dalších států světa. Spóry houby si v půdě zachovávají životnost 8–10 let. Včasná detekce patogena v půdě může poskytnout informaci o riziku výskytu choroby v dalších letech. Pro zjištění přítomnosti spór *Tilletia controversa* je možné využít metodu, která kombinuje promývání půdy na sítích s centrifugací na sacharózovém polštáři. Pro ověření životnosti spór lze využít metodu barvení akridinovou oranží a vyhodnocení pomocí fluorescenčního mikroskopu.

**Klíčová slova:** *Tilletia controversa*; detekce v půdě, životnost teliospór

## Summary

*Tilletia controversa*, the causal agent of dwarf bunt, is one of the most dangerous soilborne fungal organisms in the Czech Republic and in many countries across the world. *T. controversa* spores may survive in soil for up to 10 years. Methods are needed for early stage dwarf bunt diagnosis. Reliable detection of *T. controversa* in soil can provide information as to fields contaminated with spores and therefore at risk of dwarf bunt occurrence in the coming season. A detection method exists that combines extraction using sieves and sucrose centrifugation. Evaluating soil inoculum density is possible through enumerating teliospores of *T. controversa* in soil by means of the relationship between the number of teliospores recovered from soil and the number of teliospores present in the soil.

**Key words:** *Tilletia controversa*, detection in soil; vitality of teliospores

## ÚVOD

*Tilletia controversa*, původce zakrslé sněti pšeničné, je nebezpečný patogen rozšířený v řadě zemí světa. Spóry houby mohou přežít v půdě až deset let (Tyler and Jensen 1958). Stejně dlouho tak trvá riziko napadení rostlin. Patogen přetváří zrna v hálky, které obsahují miliony výtrusů (teliospór) (Wilcoxson and Saari 1996). Tyto hálky mohou být během sklizně rozbity a teliospóry se z nich uvolňují, kontaminují půdu, zdravá sklizená zrna, ulpívají na sklizňové technice, při sklizni jsou také roznášeny větrem na okolní pozemky. Houba produkuje páchnoucí látku trimethylamin, takže napadená sklizeň je nepoužitelná pro potravinářské účely a jen omezeně použitelná pro krmné účely. Přítomnost sněti tak znehodnocuje sklizeň a výrazně omezuje její prodejnost.

Výsledky monitoringu *Tilletia controversa* z let 2001–2008 ukázaly, že patogen je přítomen téměř ve všech pěstitelských oblastech pšenice u nás (Váňová, Prokinová, dosud nepublikováno). Možnost detekce přítomnosti patogena na pozemku by znamenala včasnou informaci, na základě které je možné se rozhodnout o výběru mořidla, bylo by možné (alespoň dočasně) vyloučit zamořené pozemky z pěstování semenných porostů vyšších stupňů, význam by taková informace měla i pro ekologická hospodářství.

Metoda detekce spór patogenů v půdě, která využívá promývání vzorků půdy na sítích a separaci výtrusů v sacharózovém roztoku, je známá poměrně dlouhou dobu (Buczacki and Ockendon 1978, Daniels and Skipper 1982, Lanson and Allen 1986, Ohms 1957). Babadoost and Mathre (1998) vyvinuli metodu detekce a kvantifikace teliospór *Tilletia indica*, *T. controversa* a *T. barclayana* v půdě.



Zakrslé a snětivé klasy ozimé pšenice v porostu

Dhingra a Sinclair (1995) popsali metodu tzv. vitálního barvení, pomocí které lze rozlišit živé výtrusy hub od mrtvých. Barvení akridinovou oranží s následným vyhodnocením pomocí fluorescenčního mikroskopu popsali jako vhodnou ke zjištění životnosti teliospór *Tilletia indica* v půdě Thinggaard and Leth (2003).

## MATERIÁL, METODA

Pro detekci teliospór z uměle zamořené půdy byly použity výtrusy *Tilletia controversa*, které pocházely z pokusných infikovaných rostlin z VÚZ Kroměříž. Jejich životnost byla ověřena testem klíčivosti na 2% vodním agaru, kultivace v 8 °C, světelný režim 12 h světlo/12 h tma.

Pro extrakci teliospór z uměle zamořené půdy jsme použili přesně popsanou metodu (Babadoost and Mathre 1998). Metoda spočívá v promývání vzorku půdy na sítích (117 µm), filtraci získané suspenze přes speciální filtrační papír (propustnost pro částice menší než 20 µm) a centrifugaci získaného sedimentu v roztoku sacharózy, přitom tři operace celého postupu se třikrát opakují. Konečný získaný sediment je vyšetřeno běžnou mikroskopickou metodou na přítomnost teliospór. Půdu pro účely umělé kontaminace jsme odebrali z pozemku pokusného pole v areálu ČZU, kde se napadení sněti zakrslou (ani jinou sněti rodu *Tilletia*) podle dostupných informací nevyskytlo na rostlinách v posledních patnácti letech ani jednou. Počet zjištěných teliospór byl zjišťován v Bürkerově komůrce. Umělá kontaminace půdy byla provedena 1 ml suspenze teliospór o hustotě 0 (kontrola),  $0,75 \times 10^2$  a  $2 \times 10^5$  spór vpraveném do 10 g půdy. Každá varianta měla tři opakování.



Černá masa chlamydozpor sněti zakrslé v klase ozimé pšenice.

Pro detekci teliospór v přirozeně kontaminované půdě byly použity vzorky z pozemků s ověřeným výskytem sněti v posledních patnácti letech. Vzorky byly dodány VZÚ Kroměříž (region Vsetínska) a SRS (region Vsetínska a Příbramsko). Vzorky byly zpracovány mírně modifikovanou metodou podle Babadoost and Mathre (1998) – s vynecháním opakování centrifugace na sacharózovém polštáři s cílem zkrátit dobu potřebnou pro zpracování vzorku. V tomto případě nelze použít rovnici vypracovanou uvedenými autory pro stanovení počtu spór ve vzorku půdy. Mikroskopické hodnocení nebylo provedeno s využitím Bürkerovy komůrky, ale pouze prověřením 1 ml získaného sedimentu. Determinace *Tilletia* spp. byla provedena na základě mikroskopických morfologických znaků. Takto bylo zpracováno čtrnáct vzorků, každý ve třech opakováních.

Metoda zjištění životnosti spór : část teliospór byla usmrcena ve sterilizátoru (120 °C, 20 min), druhá část byla ponechána živá – životnost spór prokázána jejich klíčivostí na 2% vodním agaru.

Teliospóry obou skupin byly barveny akridin oranží a vizualizace byla provedena pomocí fluorescenčního mikroskopu podle Thinggaard and Leth (2003).

## VÝSLEDKY A DISKUSE

V uměle kontaminované zemině byly spóry úspěšně detekovány. Ze vzorku kontaminovaného  $10^2$  teliospór jsme zpět získali 17%, ze vzorku kontaminovaného  $10^5$  pak 69 % spór – tab. 1. Procento zjištěných spór odpovídá výsledkům uveřejněným autory Babadoost and Mathre (1998). Ti detekovali 19,3% spór při kontaminaci suspenzí  $10^2$  a 73,8 % spór při kontaminaci zeminy suspenzí o hustotě  $10^5$  teliospór *T. controversa*. Množství spór, které jsme detekovali v přirozeně zamořených vzorcích zeminy je uvedeno v tab. 2. Počet spór byl zjišťován zkrácenou metodou (vynechání opakování dvou filtrací a následné centrifugace), proto nebylo možné využít výpočet počtu spór v zemině s využitím rovnice, kterou vypracovali autoři metody. Nicméně se potvrdilo, že i zkrácená metoda (úspora času 8–10 hodin) je dostatečná pro prokázání přítomnosti teliospór *Tilletia* spp. v daném vzorku zeminy.

Tři ze čtrnácti vzorků byly negativní, přítomnost teliospór nebyla zjištěna. Pouze v šesti vzorcích byla detekována beze vší pochybnosti *Tilletia controversa*. Zbylých pět vzorků obsahovalo spóry sněti rodu *Tilletia*, které neměly charakteristické morfologické znaky ani *T. controversa*, ani *T. caries* (syn. *T. tritici*), která také může přežívat v půdě (Borgen, 2000). Domníváme se, že se buď mohlo jednat o indiferentní typy spór kříženců obou druhů, protože oba druhy se křížit mohou (Silbernagel 1964, Shi et al., 1996), nebo byly typické znaky (především výška lamel v síťovité struktuře povrchu teliospóry) částečně zničeny dlouhodobějším přežíváním v půdě, mimo fyzikálních faktorů i pod vlivem půdní mikroflóry.

Obarvením usmrcených a živých teliospór akridin oranží a vyhodnocením pomocí fluorescenčního mikroskopu je možné poměrně spolehlivě rozeznat mrtvé a živé spóry. U živých spór vitální barvivo neproniká buněčnou stěnou, zatímco u mrtvých spór ano. Ačkoli metoda byla vyvinuta pro *Tilletia indica* (Thinggaard a Leth, 2003), ověřili jsme, že je možné ji použít i pro *Tilletia controversa*. Pokus ukázal, že vitální teliospóry detekované v uměle kontaminované zemině byly vitální. Ze čtrnácti testovaných, resp. jedenácti pozitivních vzorků přirozeně zamořené zeminy se v devíti případech jevíly teliospóry živé. Konstatujeme, že vitální barvení a vyhodnocení pomocí fluorescenčního mikroskopu se jeví jako poměrně rychlá a spolehlivá metoda pro ověření životnosti teliospór *Tilletia* spp.

## ZÁVĚR

Kombinace zmíněných metod – tj. detekce teliospór v půdě a následně vitální barvení – by mohla být využívána pro ověření zamoření pozemků teliospórami *Tilletia* spp. Věříme, že kombinace detekce spór a monitoringu výskytu rostlin napadených *Tilletia* spp. (s důrazem na *T. controversa*) poskytne užitečné informace všem pěstitelům, kterým unožní včas zvolit vhodné mořidlo, posoudit osevni sled. Důležitá bude znalost o zamoření či čistotě pozemku pro pěstitele semenných porostů a pro podniky hospodařící systémem ekologického zemědělství.

## PODĚKOVÁNÍ

Práce byla provedena díky finanční podpoře MZe – NAZV, projekt QH71105

## LITERATURA:

Babadoost M., Mathre D.E.: A method for extraction and enumeration of teliospores of *Tilletia indica*, *T. controversa*, and *T. barclayana* in soil. Plant Disease, 1998: 1359–1361.

Borgen A.: Perennial survival of common bunt (*Tilletia tritici*) in soil under modern farming practice. *Journal of Plant Dis. Prot.*, 2000, vol. 107, no. 2: 182–188

Buczacki S.T., Ockendon, J.G. (): A method for the extraction and enumeration of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* from infested soil. *Ann. Appl. Biol.*, 1978, 88: 363–367.

Daniels B. A., Skipper H.D.: Methods for recovery and quantitative estimation of propagules from soil. In: Schenck N.C. (ed): *Methods and principles of mycorrhizal research*, 1982, APS Press, 29–35 pp  
Dhingra O. D., Sinclair D. B.: *Basic plant pathology methods*. 2<sup>nd</sup> Ed., 1995, CRC Press, Lewis Publisher USA, 434 p.

Ianson D.C., Allen, M.F.: The effects of soil texture on extraction of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spores from arid sites. *Mycologia*, 1986, 78:164–168.

Ohms R. E.: A flotation method for collecting spores of phycomycetous mycorrhizal parasite from soil. *Phytopathology*, 1957, 47:751–752.

Shi Y. L., Loomis P., Christian D., Carris L. M., Leung H.: Analysis of the genetic relationships among the wheat bunt fungi using RAPD and ribosomal DNA markers. *Phytopathology*, 1996, vol. 86: 311–318

Silbernagel M. J.: Compatibility between *Tilletia caries* and *T. controversa*. *Phytopathology*, 1964, vol. 54: 1117–1120

Thinggaard K., Leth V.: Use of fluorochrome vital dye acridine orange to determine viability and germination of *Tilletia indica* teliospores in soil. *Seed Science and Technology* 2003, 31(2): 329–340.

Tyler L.J., Jensen N. F.: Some factors that influence development of dwarf bunt in winter wheat. *Phytopathology*, 1958: 48: 565–571.

Wilcoxson R. D., Saari E. E. (1996): *Bunt and smut diseases of wheat: Concepts and methods of disease management*. Mexico. D.F.: CIMMYT 66p.

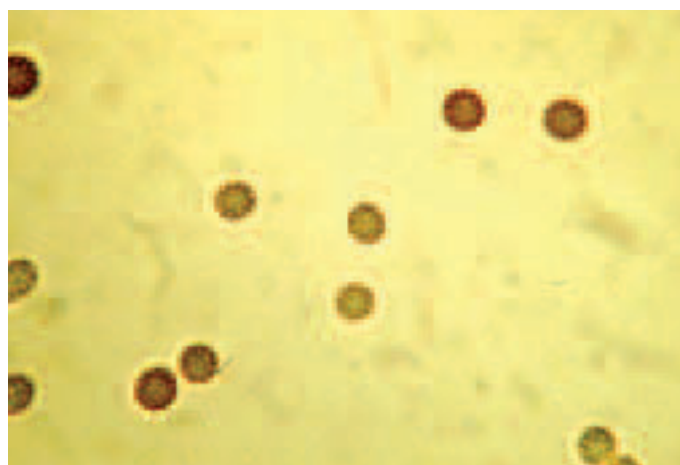
Kontakní adresa: prokinova@af.czu.cz

**Tab. 1:** *T. controversa* – detekce v uměle kontaminované zemině

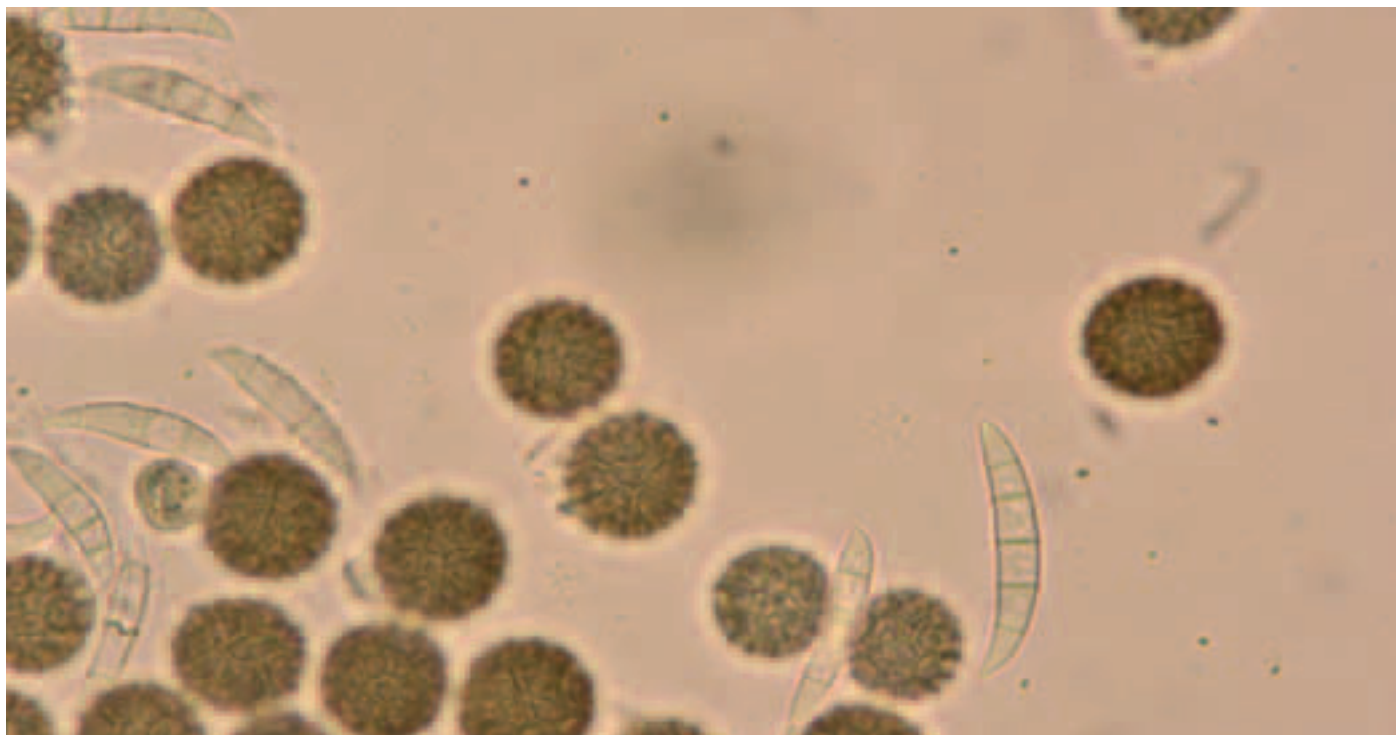
hustota suspenze (spor/ml)	0	10 <sup>2</sup>	10 <sup>5</sup>
množství vpravených spór	0	100 %	100 %
procento zjištěných teliospór	0	17 %	69 %

**Tab. 2:** *Tilletia spp.* v přirozeně kontaminované zemině

vzorek č.	počet teliospór <i>Tilletia spp.</i> zjištěných v 1 ml sedimentu	zjištěný druh
1	2	<i>T. controversa</i>
2	2	<i>T. controversa</i>
3	1	<i>Tilletia sp.</i>
4	0	-
5	2	<i>Tilletia sp.</i>
6	11	<i>T. controversa</i>
7	2	<i>T. controversa</i>
8	3	<i>T. controversa</i>
9	2	<i>Tilletia sp.</i>
10	2	<i>Tilletia sp.</i>
11	3	<i>T. controversa</i>
12	0	-
13	1	<i>Tilletia sp.</i>
14	0	-



Spory sněti zakrslé (*Tilletia controversa*).



Výskyt sněťů bývá velmi často doprovázen i vyšším výskytem fuzárií