

Detekce *Sclerotinia sclerotiorum* v raných stádiích vývoje slunečnice pomocí metod PCR a ELISA

(Detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower early stages of development by PCR and ELISA)

Spitzer, T.¹, Matušinský, P.¹, Wolf, A. G.²

¹Agrotest fyto, s.r.o., Havlíčkova 2787/121, Kroměříž

²Institut für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz der Georg-August-Universität Göttingen

Souhrn

V letech 2007 a 2008 byly odebrány vzorky slunečnice ve stádiu BBCH 14 (4 vyvinuté listy), 32–33 (2–3 internodia), 51 (objevení se základu květu) a 61 (počátek kvetení) a to rostlin a kořenů, v BBCH 14 a 32–33 také vzorky půdy. V BBCH 14 a 32–33 byly vzorky rostlin bez viditelné přítomnosti patogena, v BBCH 51 a 61 rostliny vykazující příznaky vadnutí. Vzorky stonků a kořenů byly analyzovány metodou PCR a ELISA vzorky půdy pouze PCR. Metodou ELISA byla zjištěna přítomnost *S.sclerotiorum* ve větším počtu případů, než tomu bylo u metody PCR. Detekována byla především přítomnost patogena v kořenech a také v časnějších růstových fázích slunečnice. Byla zjištěna malá shoda metod v detekci patogena v kořenech a listech a přítomnosti *S. sclerotiorum* v rostlinách s typickými vizuálními symptomy této choroby. Je otázkou, zda se na vadnutí rostlin slunečnice nepodílí i jiný houbový patogen.

Klíčová slova: slunečnice, *Sclerotinia sclerotiorum*, ELISA, PCR

Summary

Between 2007 and 2008 were collected samples of sunflower in stage BBCH 14 (4 developed leaves), 32–33 (2–3 internodes), 51 (the emergence of flower base) and 61 (beginning of flowering) the plants and roots, in the BBCH 14 and 32–33 the soil samples. The BBCH 14 and 32–33 are samples of the plants without any visible presence of the pathogen, the BBCH 51 and 61 plants showing signs of infestation. Samples of stems and roots were analyzed by PCR and ELISA and soil samples PCR only. The method of ELISA was detected *S.sclerotiorum* in more cases than it was at the PCR. Was mainly detected the presence of the pathogen in the roots and also in earlier stages of sunflower growth. It was found little consensus methods for detecting the pathogen in roots and leaves and the presence of *S. sclerotiorum* in plants with typical visual symptoms of the disease. It is questionable whether the sunflower plants wilt not participates in a different fungal pathogen.

Keywords: sunflower, *Sclerotinia sclerotiorum*, ELISA, PCR

Úvod

Sclerotinia sclerotiorum je houbový patogen napadající celosvětově více než 400 druhů rostlin, z nichž mnohé jsou pěstovány jako kulturní plodiny na polích. Mezi takové patří například brambory, řepka, mák i slunečnice (Garg a kol., 2010). Primárním zdrojem infekce u řepky i slunečnice jsou askospory produkované v jarních měsících plodnicemi houby vyrostlými ze sklerocií v zemi. Kromě tohoto způsobu šíření dochází v půdě za určitých podmínek ke carpogennickému klíčení sklerocií a šíření infekčních hyf půdou ke kořenům rostlin. Toto šíření je dlouho skryté a na rostlinách se projeví až později, u slunečnice to bývá v období počátku květu (Cowan a kol., 2010).

Detekce choroby na rostlinách slunečnice je vizuálně možná až v době, kdy již houba poškozuje výrazně rostliny a možnosti kvalitní ochrany jsou malé. Využívání analytických metod PCR nebo ELISA pro zjištění přítomnosti patogena v rostlině nebo půdě v době před rozvinutím choroby je v literatuře zmiňováno jen vzácně. Metoda PCR a DAS ELISA byla využita při studiu výskytu viru SuCMoV (Sunflower chlorotic mottle virus) (Giolitti a kol., 2009). Metoda RT-PCR byla využita při analýze dějů v rostlinách slunečnice při napadení *S. sclerotiorum*. Detekována byla exprese genů kódujících neutrální endopolygalacturonasy na počátku vzniku nekrot (Fraissinetachet a kol., 1994).

Metoda ELISA byla využita při studiu možnosti detekce *S. sclerotiorum* na korunách plátcích řepky s využitím těchto informací pro vypracování modelu predikce rozvoje dalšího napadení plodiny (Bom a kol., 2000).

Cílem naší práce bylo ověřit, zda metody PCR a ELISA jsou vhodné k použití k včasné detekci *S. sclerotiorum* u rostlin slunečnice a v půdě a vzájemné porovnání výsledků analýz.

Metodika

V letech 2007 a 2008 byly zasety experimentální plochy slunečnice odrůdy Alexandra a to na pozemcích, kde se v osevním sledu střídá ozimá řepka a slunečnice v tříletých cyklech, takže je zde vysoká pravděpodobnost výskytu *S. sclerotiorum*. Ve vývojových stádiích růstu slunečnice BBCH 14 (4 vyvinuté listy), 32–33 (2–3 internodia), 51 (objevení se základu květu) a 61 (počátek kvetení) byly odebrány vzorky rostlin a kořenů, v BBCH 14 a 32–33 také vzorky půdy. V BBCH 14 a 32–33 byly odebrány vzorky rostlin náhodně bez viditelné přítomnosti patogena na rostlinách. V BBCH 51 a 61 byly vybrány selektivně rostliny vykazující příznaky vadnutí. V roce 2007 byly rostliny odebrány v BBCH 61 rozděleny na části pod úborem, stonek, kořenový krček a kořen. V roce 2008 byly ve stádiu BBCH 61 rostliny rozděleny jen na stonky a kořeny. Celkem bylo v roce 2007 analyzováno 75 vzorků a v roce 2008 110 vzorků.

Všechny vzorky rostlinného materiálu odebrané v roce 2007 byly po usušení a namletí analyzovány metodou PCR v laboratoři molekulární genetiky Agrotestu fyto, s.r.o. a stejné vzorky byly zaslány na pracoviště „Institut für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz der Georg-August-Universität Göttingen“ profesoru G. Wolfovi, který provedl analýzy pomocí metody ELISA.

Vzorky rostlinného materiálu odebrané v roce 2008 byly všechny analyzovány metodou PCR ve vlastní laboratoři molekulární genetiky Agrotestu fyto, s.r.o. a na pracoviště „Institut für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz der Georg-August-Universität Göttingen“ profesoru G. Wolfovi byly z kapacitních důvodů německé strany zaslány pouze vzorky odebrané v BBCH 61.

Vzorky půdy odebrané v bezprostřední blízkosti rostlin, které byly odebrané pro rozbor stonků a kořenů, byly analyzovány pouze metodou PCR v laboratoři molekulární genetiky Agrotestu fyto, s.r.o.

Analýza metodou PCR – Vzorky odebraných rostlin, kořenů a půdy byly zmrazeny na -30 °C. Před analýzou byl rostlinný materiál mechanicky drcen v třecí misce za pomoci tekutého dusíku. Genomová DNA pak byla izolována pomocí *DNeasy Plant Minikit Qiagen*. Diagnostika byla provedena pomocí PCR za přítomnosti druhově specifických primerů (Freeman a kol., 2002). Separace produktu PCR byla provedena na horizontální agarozové elektroforéze a vizualizovaná po obarvení na UV transiluminátoru.

Analýza metodou ELISA – Vzorky byly po odběru vysušeny při 30 °C a po té pomlety. Pak byly přes noc třepány v extrakčním pufru (1:20 w/v) při 4 °C. Po extrakci bylo 1000 µl extraktu dáno do centrifugy a centrifugováno při 13000 rpm. Sedlina byla přímo analyzována ELISA, měření extinkce bylo provedeno fotometrem při vlnové délce 405 nm a referenční vlnové délce 592 nm. Analýzy byly provedeny u profesora Wolfa v Institut für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz der Georg-August-Universität Göttingen.

Výsledky a diskuse

Rok 2007 byl pro rozvoj *S. sclerotiorum* velmi příznivý a na slunečnici se projeví příznaky půdní infekce již před počátkem kvetení. Ve vzorcích půdy odebraných ve stádiu BBCH 14 metoda PCR neprokázala žádnou přítomnost *S. sclerotiorum*, stejně jako u vzorků stonků a kořenů. Naproti tomu metoda ELISA provedená u stejných vzorků stonků a kořenů prokázala u tří vzorků kořenů významnou přítomnost patogena. Obě metody se shodly v hodnocení stonků, ale při hodnocení kořenů byl výsledek různý.

Rozbor vzorků odebraných v BBCH 32 byl na základě hodnocení metodou PCR negativní na přítomnost *S. sclerotiorum* jak u kořenů, tak i stonků a půdy. Metoda ELISA se shodla s PCR v negativním hodnocení přítomnosti *S. sclerotiorum* ve stoncích, ale opět u kořenů byl výsledek rozdílný. ELISA metodou byla zjištěna přítomnost patogena ve třech případech.

Rozbor vzorků odebraných v BBCH 51 z vadnoucích rostlin byl na základě hodnocení metodou PCR negativní na přítomnost *S. sclerotiorum* jak u kořenů, tak i stonků. Metoda ELISA prokázala napadení *S. sclerotiorum* v jednom případě u kořene a v jednom případě u stonku.

Rozbor vzorků odebraných v BBCH 61 z napadených rostlin s výraznými vizuálními příznaky *S. sclerotiorum* byl na základě hodnocení metodou PCR pozitivní u všech stonků a jednoho kořenového krčku. Metoda ELISA prokázala přítomnost patogena ve dvou případech kořenů a krčků.

Metoda PCR prokázala v sezoně 2007 přítomnost *S. sclerotiorum* pouze ve stádiu počátku kvetení, kdežto metoda ELISA prokázala navíc přítomnost patogena i ve stádiu slunečnice BBCH 51 a BBCH 32 a to v kořenech.

Rok 2008 byl pro rozvoj *S. sclerotiorum* méně příznivý, ale na slunečnici se opět projeví příznaky vadnutí následkem půdní infekce počátkem kvetení. Ve vzorcích půdy odebraných ve stádiu BBCH 14 metoda PCR neprokázala žádnou přítomnost *S. sclerotiorum*, stejně jako u vzorků stonků a kořenů a stejně tak tomu bylo i u vzorků odebraných ve stádiu BBCH 32 a BBCH 51. Analýzy metodou ELISA byly provedeny pouze u vzorků odebraných ve stádiu BBCH 51 a byly také negativní a to jak u kořenů, tak i u stonků a to i přes to, že část vzorků stonků a kořenů byla odebrána z rostlin s vizuálními příznaky vadnutí obecně připisovanému půdní infekci *S. sclerotiorum*.

U vzorků odebraných v BBCH 61 prokázala metoda PCR pozitivní přítomnost *S. sclerotiorum* v pěti případech u stonků, když byly vzorky opět odebrány z rostlin s příznaky napadení. V kořenech nebyla přítomnost patogena metodou PCR prokázána.

Z výsledků vyplývá, že metodou ELISA byla zjištěna přítomnost *S. sclerotiorum* ve větším počtu případů, než tomu bylo u metody PCR. Detekována byla především přítomnost patogena v kořenech a také v časnějších růstových fázích slunečnice. Walcz (1985) uvádí metodu ELISA jako dostatečně citlivou a specifickou pro zjištění *S. sclerotiorum* u slunečnice a za hraniční považuje koncentraci 10 ng/ml. Metody PCR a RT-PCR byly využity při sledování expresí genů způsobujících odolnost proti *S. sclerotiorum* (Fraissinettachet 1994), nebo pro detekci virů u slunečnice (Giolitti 2009). Pro sledování přítomnosti patogena *S. sclerotiorum* v půdě, kořenech a stoncích v období před vznikem typických viditelných příznaků choroby nejsou v dostupné literatuře údaje.

Kromě malé shody obou metod v detekcích přítomnosti patogena v kořenech a listech nebyla také prokázána přítomnost *S. sclerotiorum* v rostlinách s typickými vizuálními symptomy obecně připisovaným této chorobě. Nejzřetelnější to bylo v roce 2008 u vzorků odebraných v BBCH 51, kde byla část rostlin vizuálně zdravých a druhá část vadnoucí rostliny. U žádné z rostlin nebyla zjištěna přítomnost *S. sclerotiorum* a to žádnou z metod. Je otázkou, zda se na vadnutí rostlin slunečnice nepodílí i jiný houbový patogen.

Závěr

Sclerotinia sclerotiorum je významný patogen slunečnice v podmínkách jejího pěstování v České republice a v některých letech způsobuje vysoké ztráty na výnose a kvalitě produkce. Možnosti ochrany proti této chorobě se kromě agrotechnických opatření omezují na aplikace fungicidů v termínu od 8–10 listů do počátku kvetení. Tímto opatřením lze potlačovat chorobu a jejího původce pocházející z askospor. Při klíčení carpogenic-kém jsou rostliny napadeny z půdy a až do období počátku kvetení se choroba vizuálně neprojevuje. Detekce patogena v rostlinách v raných vývojových stádiích (BBCH 14 až BBCH 32) by umožnila zaměřit se cíleně i na ochranu proti půdní infekci. Metoda ELISA se jeví jako vhodnější pro tento účel, než metoda PCR, ale ani její výsledky neodpovídají všem napadením hodnoceným vizuálně. Je nutné ověřit, zda se na vadnutí rostlin slunečnice před květem nepodílí i další fytopatogenní houby.

Poděkování

Publikované výsledky byly dosaženy v rámci řešení projektu NAZV QH 71254 – Inovace metod ochrany slunečnice.

Literatura

- BOM M, BOLAND G. J., 2000 Evaluation of polyclonal-antibody-based immunoassays for detection of *Sclerotinia sclerotiorum* on canola petals, and prediction of stem rot. CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, Volume: 46, Issue: 8, Pages: 723–729, Published: AUG 2000
- COWAN J. E., BOLAND G. J., 2010 Production and carpogenic germination of secondary sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* following freezing treatments on primary sclerotia CANADIAN JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY-REVUE CANADIENNE DE PHYTOPATHOLOGIE, Volume: 32, Issue: 3, Pages: 425–425, Published: 2010 GARG H.,
- FRAISSINETTACHET L. M., REYMONDCOTTON P., FEVRE M., 1994 Polygalacturonases and Pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. JOURNAL OF TRACE AND MICROPROBE

- TECHNIQUES, Volume: 12, Issue: 4, Pages: 239–246, Published: 1994
- FREEMAN J., WARD E., CALDERON C., McCARTNEY A., 2002 A polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum*. EUROPEAN JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY, Volume:108, Pages 877–886.
- GARG H., LI H., SIVASITHAMPARAM K., KUO J., BARBETTI M. J., 2010: The infection processes of *Sclerotinia sclerotiorum* in cotyledon tissue of a resistant and a susceptible genotype of *Brassica napus*. Ann Bot (2010) 106 (6): 897–908.
- GIOLITTI F., BEJERMAN N., LENARDON S., 2009 Dipsacus fullo-nium: an Alternative Host of Sunflower chlorotic mottle virus in Argentina. JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY, Volume: 157, Issue: 5, Pages: 325–328, Published: MAY 2009
- SIVASITHAMPARAM K., BARBETTI M.J., 2010 Scarification and Environmental Factors that Enhance Carpogenic Germination of Sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. PLANT DISEASE, Volume: 94, Issue: 8, Pages: 1041–1047, Published: AUG 2010
- WALCZ I., PACSA A.S., SZABO L.G., 1985: Detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). TRANS. BR. MYCOL. SOC. Vol. 85, no. 3, pp. 485–488. 1985.



Adresa autora: spitzer.tomas@vukrom.cz
recenzováno