

**Potvrzení výskytu rezistence ke strobilurinům
u *Mycosphaerella graminicola* (anamorph.: *Septoria tritici*) v oblasti Kroměříže
/Confirmation of *Mycosphaerella graminicola* (anamorph. *Septoria tritici*)
resistance to strobilurins in Kroměříž region/**

Matušinsky, P., Tvarůžek, L., Vyšehřídová, M., Horáčková, S.,
Agrotest fyto, s.r.o., Havlíčkova 2787, Kroměříž

Souhrn:

Molekulárně-genetickými metodami a kultivací patogena na živné půdě obsahující fungicidní látku byla potvrzena přítomnost izolátů *Mycosphaerella graminicola* (anamorph.: *Septoria tritici*) rezistentních ke strobilurinům. Odběry infikovaného rostlinného materiálu byly provedeny na pozemcích v okolí Kroměříže. Všechny monosporické izoláty, které byly takto získány, projevovaly rezistenci.

Klíčová slova: *Septoria tritici*, pšenice, strobiluriny, rezistence

Abstract: By molecular genetic methods and cultivation the pathogen on a culture medium containing a fungicidal substance, the presence of isolates of *Mycosphaerella graminicola* (anamorph.: *Septoria tritici*), resistant to strobilurins has been confirmed. Samples of infected plant material were collected in the wheat stand near Kromeriz. All monosporic isolates obtained exhibited resistance.

Key Words: *Septoria tritici*, wheat, strobilurins, resistance

Úvod

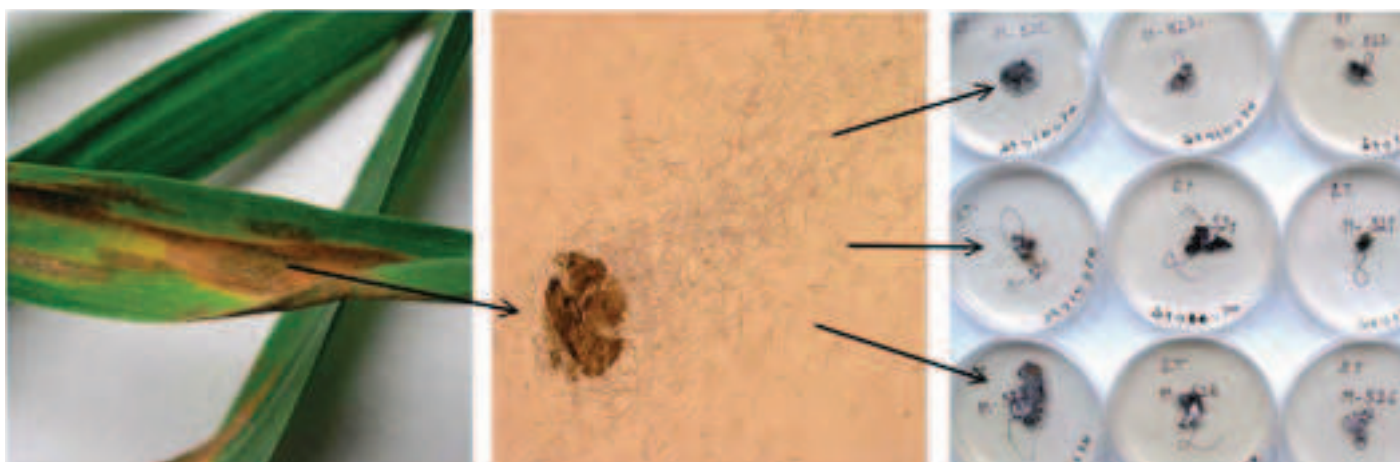
Původce septoriové skvrnitosti (braničnatky pšeničné) *Septoria tritici* Rob. in Desm., sexuální stádium *Mycosphaerella graminicola* (Fückel) Schroeter patří mezi závažné choroby pšenice. Patogen se vyskytuje na celém území ČR. Časné setí ozimů a další opatření podporující vývoj porostů na podzim zvyšují riziko přenosu primární infekce. Choroba snižuje významně výnos redukcí aktivní asimilační plochy. Výnosové ztráty se mohou projevit jak ve snížení hmotnosti 1000 zrn, tak jejich počtu. Prvními příznaky napadení jsou nepravidelné chlorotické skvrny. V závislosti na odrůdě a podmínkách prostředí se postupně vyvíjejí zpočátku šedě zelené a postupně hnědnoucí nekrózy.

Přibližně po 15 dnech je možno pozorovat při pohledu na list proti světlu tvořící se plodnice nepohlavního stadia – pyknidy. Zdrojem primární infekce jsou posklizňové zbytky napadených rostlin, na kterých dozrávají v období srpna až října pseudotecia, z nichž se uvolňují větrem přenosné askospory. Na jaře pokračuje rozvoj choroby konidiami (pyknosporami) tvořícími se v pyknidách na napadených listech. Nezbytná je vysoká vlhkost listového povrchu trvající minimálně 20 hodin. Teplotní optimum infekce leží mezi 20–25 °C. Patogen proniká do pletiv hostitele výlučně

průduchy listů. Houbová vlákna následně prorůstají mezofylem v listech paralelně s cévními svazky pod epidermálními buňkami. Podrobný přehled biologie s vyobrazeními mikroskopických útvarů patogena nalezne čtenář v Obilnářských listech 2/2011 (Vyšehřídová, Tvarůžek).

Fungicidní ošetření se provádí podle signalizace nebo při ohrožení od BBCH 37 (objevení se posledního listu) do BBCH 51 (počátek metání). Zásahy se zpravidla provádějí proti celému komplexu listových chorob a chorob klasů. Při rozhodování o konkrétním termínu ošetření je vhodné zohlednit také předpokládaný počet ošetření. Při opakovaném používání stejných přípravků je riziko vzniku rezistence a tedy neúčinnosti aktivních látek, proto je třeba střídát přípravky s různým mechanismem působení.

Mezi látky často používané proti braničnatce pšeničné patří benzimidazoly, inhibitory demethylace sterolu (DMI) a strobiluriny. Benzimidazoly i strobiluriny jsou jednoploškové fungicidy a u obou těchto skupin látek si braničnatka vytvořila rezistenci. Bodová mutace genu pro beta-tubulin má za následek záměnu aminokyselin v kodonu 198 a způsobuje tak rezistenci k benzimidazolům. Rezistence ke strobilurinům je dána bodovou mutací genu pro cytochrom b, následkem čehož dochází



Obr. 1 Z nekrotizujících lézí na listech pšenice způsobených patogenem *S. tritici* byly odebrány pyknidy. Tyto byly rozmáčkнутy a z nich uvolněné jednotlivé protáhlé pyknospory byly umístěny na Petriho misky s PDA (potato dextrose agar) a kultivovány 2 týdny při 20 °C ve tmě.

k záměně aminokyselin glycinu za alanin. Tato níže uvedená mutace byla detekována u izolátů braničnatky i v této práci.

Na posledním zasedání Evropské expertní skupiny zaměřené na rezistenci k fungicidům, které proběhlo pod patronací BASF v říjnu tohoto roku ve Vídni, bylo konstatováno, že v případě *Septoria tritici* je v Evropě patrný posun k nárůstu rezistence. Západní Evropa je v tomto smyslu chápána jako oblast s vysokým rizikem výskytu tohoto stavu, ČR a Polsko jako země se středním výskytem.

Tento stručný příspěvek přináší potvrzení výskytu rezistence v oblasti střední Moravy provedené křížově dvěma metodami.

Materiál a Metody

Odběr vzorků

Vzorky listů s příznaky napadení braničnatkou pšeničnou byly odebrány v Kroměříži dne 29. 6. 2011, což odpovídalo fázi růstu pšenice ozimé BBCH 77. Porost odrůdy Cubus byl před tím fungicidně 2 x opakovaně ošetřen přípravkem Acanto v dávce 1,0 l/ha (ú. l. pycoxystrobin). Aplikace byly provedeny ve dnech 17. 5. 2011 a 7. 6. 2011. Plošný výskyt braničnatky na praporečném listu dosahoval 8% při hodnocení provedeném na kontrolní neošetřené variantě dne 14. 6. ve fázi BBCH 71. Při dalším hodnocení (29.6., BBCH 77) to bylo již 21%. Na variantě s přípravkem Acanto dosahovala účinnost na braničnatku při prvním hodnocení (BBCH 71) pouze 26%, v následném hodnocení (BBCH 77) bylo dosaženo účinnosti jen 27%.

Z odebraných listů bylo získáno 17 monosporických izolátů *S. tritici*, které byly následně testovány pomocí molekulárních metod a kultivací na agarovém médiu s přítomností fungicidní látky.

Molekulární analýzy

Sekvence cytochromu b *Mycosphaerella graminicola* (AY247413.1) byly vybrány v databázi GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Na základě těchto sekvencí byla navržena sada primerů a označena jako STcytoF/R. Primery byly navrženy pomocí software Primer3Plus software (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) a analyzovány pomocí Net Primer software (<http://www.premierbiosoft.com>). Nejprve bylo nutno pomocí standardní PCR (polymerázová řetězová reakce) amplifikovat část cytochromu b a poté specifickou restrikční endonukleázou tento úsek štěpit. PCR byla provedena v reakčním objemu 20 µl obsahujícím

0,2 mM každého nukleotidu dNTP, 0,2 µM obou primerů (STcytoF-TGAGGATTTGGAAGAGTCACC a STcytoR-GATTTCTGAACCCGCTGTA), 1 U Taq polymerázy, 2,5 mM MgCl₂, 1 x PCR pufr a 10 ng DNA izolované z mycelia monosporického izolátu *S. tritici* (Obr. 1). Reakční podmínky: úvodní jednorázová denaturace při 94 °C po dobu 5 min., dále 35 cyklů: denaturace při 94 °C po dobu 1 min., annealing při 55 °C po dobu 30 sec. a syntéza při 72 °C po dobu 40 sec.; závěrečná inkubace při 72 °C po dobu 5 min. Poté bylo 5 µl roztoku výsledného PCR produktu inkubováno spolu s 1 U restrikční endonukleázy *BseXI* (Fermentas, Lithuania; sekvence: 5'-GCAGC(N)₈-3') a 1x příslušným pufr (Fermentas) v celkovém objemu 20 µl po dobu 16 hodin při teplotě 37 °C. Výsledné fragmenty restrikční analýzy byly separovány metodou horizontální elektroforéz v 1,7% agarózovém gelu.

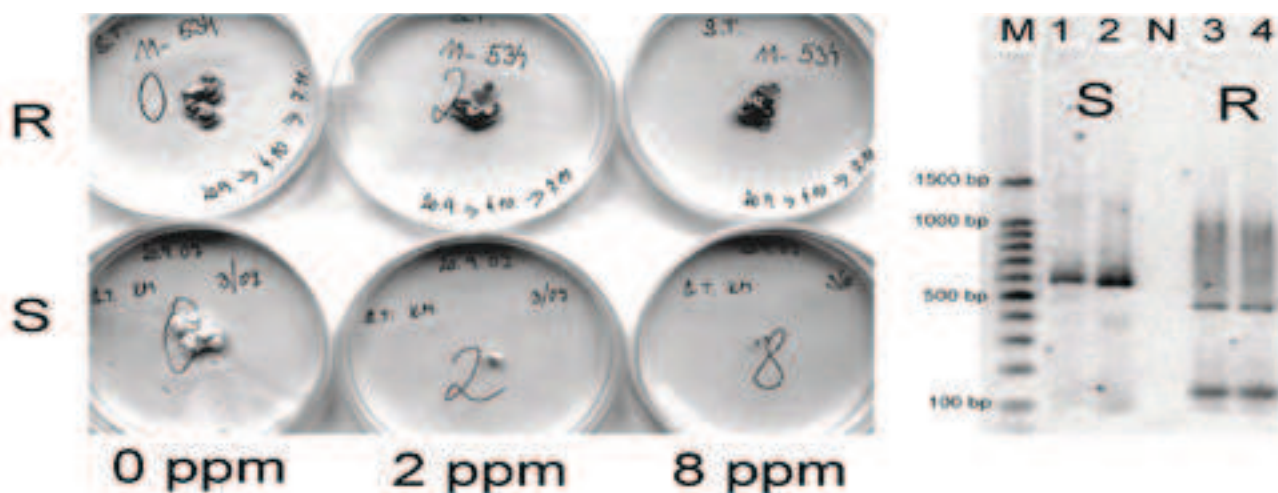
Výsledky

Po PCR s primery STcytoF/R byl získán amplikon o velikosti 627 bp. Tento amplikon zůstává po inkubaci s restrikční endonukleázou *BseXI* u strobilurin-senzitivních izolátů *S. tritici* nerozštěpen, zatímco u strobilurin-rezistentních izolátů (nesoucích alelu G143A) je rozštěpen na 2 fragmenty (189 a 438 bp) (Obr. 2). Přítomnost mutované alely G143A byla prokázána u všech 17 izolátů získaných v roce 2011 na lokalitě Kroměříž. Ke kultivačnímu testu, ve kterém bylo potvrzeno, že houba pokračuje v růstu bez omezení i za přítomnosti fungicidu, byla použita záměrně ú.l. azoxystrobin. I když se jedná o jinou fungicidní látku, než je ta, kterou byly rostliny před odběrem listů ošetřeny, je známo, že pokud se projeví rezistence k jedné účinné látce z chemické skupiny (v našem případě QoI-strobilurinů), je třeba ji očekávat i vůči látkám ostatním. To se testem plně potvrdilo.

Závěr

Z listů odrůdy ozimé pšenice Cubus na lokalitě Kroměříž bylo v roce 2011 získáno 17 monosporických izolátů *Septoria tritici*. Všechny uvedené izoláty nesly mutovanou alelu G143A, což potvrzuje jejich rezistenci ke strobilurinovým fungicidům.

Na závěr lze shrnout několik zásad antirezistentní strategie. Je nezbytné omezit počet opakovaných aplikací dané skupiny látek během vegetace (týká se látek celé skupiny ze stejným mechanismem účinku, jelikož hrozí křížová rezistence). Lze



Obr. 2 Růst mycelia u rezistentního a senzitivního izolátu *S. tritici* na PDA (bramborovo-dextrozový agar) za přítomnosti odstupňované koncentrace azoxystrobinu (ve sloupcích). Agarozový gel po separaci fragmentů DNA získaných po PCR s primery STcytoF/R a následným štěpením restrikční endonukleázou *BseXI*. M = 100bp DNA Ladder, 1–2 = izolát S.T. 2/07 80, N = voda (negativní kontrola), 3–4 = izolát S.T. 11_534, R-rezistentní izoláty, S-senzitivní izoláty

doporučit kombinované fungicidy obsahující více účinných látek s různým mechanismem účinku, nejčastěji např. jednopohové fungicidy s více-pohovými nebo alespoň střídat fungicidy s různým mechanismem účinku. Tomu všemu by měl předcházet celý soubor agronomických zásahů, od výběru odrůd, technologie zpracování půdy až po osevni sled.

Jako nový přístup k řešení problematiky je v zahraniční studován tzv. systém „low risk – high risk fungicide mixtures“ (směsi fungicidů s nízkým a vysokým rizikem vzniku rezistence). Princip spočívá ve střídání fungicidů z různě rezistencí ohrožených skupin, čímž se především prodlužuje tzv. efektivní životnost fungicidů. Jedná se o dlouhodobé řešení.

/Recenzováno/

Adresa autorů:

matusinsky.pavel@vukrom.cz,
tvaruzek.ludvik@vukrom.cz

Poděkování:

Tato publikace vznikla s využitím poskytnuté institucionální podpory na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace, Rozhodnutí MZe ČR č. RO0211 ze dne 28. 2. 2011.

Autoři děkují paní Evě Švarcové za precizní kultivační a molekulární analýzy.

