

## Umístění původců osivem přenosných chorob v obilce ječmene

*/Location of barley seed borne pathogens in cariopsis/*

Matušinsky, P., Tvarůžek, L.

Agrotest fyto, s.r.o. Havlíčkova 2787, 767 01 Kroměříž

### Souhrn

Cílem práce bylo prokázat umístění vybraných osivem přenosných patogenů v obilkách ječmene. Ke stanovení druhů bylo využito standardní PCR. Obilky byly preparovány na obalové vrstvy (lemma, perikarp, testa), endosperm a embryo. DNA osivem přenosných houbových patogenů byla zjištěna zejména v obalových vrstvách (lemma, perikarp) a DNA některých druhů byla detekována i v embryu. Přes testu do endospermu analyzovaného osiva žádný z testovaných patogenů neproniknul.

**Klíčová slova:** molekulární diagnostika, osivem přenosné choroby, ječmen

### Abstract

The aim of this study was to identify the location of some seed borne barley pathogens in the grain using molecular methods based on standard PCR. After washing, kernels were dissected into lemma, pericarp, testa, endosperm and embryo which were individually tested by PCR. DNA of pathogens was detected in the highest amount in lemma, and occurred in lower amounts in the pericarp and embryo. The results showed that most of pathogens present in analysed seed does not penetrate through the testa into the endosperm.

**Key words:** molecular diagnosis, seed-borne diseases, barley

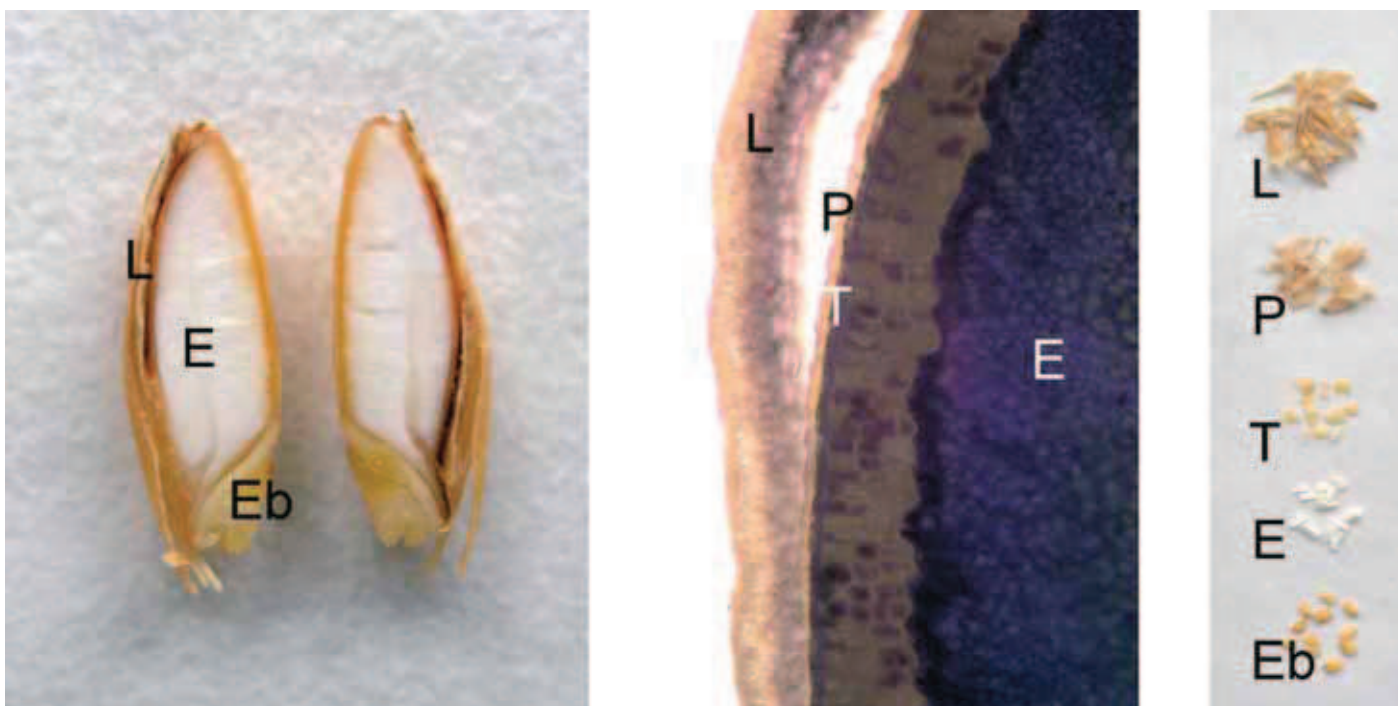
### Úvod

Kvalita osiva spočívá nejen v jeho dobré klíčivosti nebo geneticko-biologických charakteristikách, ale i v jeho zdravotním stavu. Celá řada chorob ječmene, ať již klasových nebo listových, je buď zcela nebo částečně přenosných osivem. Infekce osiva je způsob, jakým se choroba rozšiřuje z jedné sezóny do další a potenciálně také do nových oblastí. Některé osivem přenosné patogeny ječmene mohou přežít pouze v rostoucích rostlinách nebo sklizeném zrna (např. *Ustilago nuda* nebo *Pyrenophora graminea*) a jsou výhradně přenosné osivem. Jiné jsou schopny přežít dlouhé období na odumřelých posklizňových zbytcích, v půdě nebo jiných hostitelských rostlinách (např. *Fusarium* spp. nebo *Cochliobolus sativus*). Dále můžeme charakterizovat osivem přenosné patogeny podle umístění na samotné obilce. Většina sněti

jako např. patogen pšenice *Tilletia tritici* je přenášena prostřednictvím spor na povrchu obilky (obvykle na pluše) a je tedy relativně snadno potlačována mořidly. U patogenů pronikajících hlouběji do obilky jako *P. graminea* a *Pyrenophora teres* (lokace v perikarpu) nebo *Ustilago nuda* (lokace v embryu) je ošetření osiva náročnější. V ložském roce bylo na pracovišti ZVÚ Kroměříž prokázáno, že patogen *R. collo-cygni* se nachází nejen v obalových vrstvách obilky, ale i v embryu (Matušinsky a kol., 2011). Cílem naší práce bylo využít potenciálu molekulární diagnostiky ke stanovení vybraných osivem přenosných chorob v obilkách ječmene.

### Materiál a metody

Odběr biologického materiálu (zrna jarního ječmene) byl proveden v roce 2009 v Kroměříži. Celkem bylo analyzováno 100 semen z pěti



Obr. 1: Řez obilkou ječmene a obilky preparované na jednotlivé části. L – lemma; P – perikarp; T – testa; E – endosperm; Eb – embryo

odrůd jarního ječmene (Diplom, Jersey, Malz, Prestige, Scarlet). Semena byla namočena na 24 hodin do sterilní destilované vody při teplotě 20 °C. Takto připravené obilky byly za sterilních podmínek preparovány na obalové vrstvy (lemma, perikarp, testa), endosperm a embryo (Obr. 1). Po vysušení byly jednotlivé části zváženy a umístěny od samostatných plastových mikrozkuavek (Obr. 2). Do doby izolace DNA byly vzorky uloženy při -30 °C. Extrakce DNA probíhala drcením a homogenizací v tekutém dusíku a následně pomocí DNeasy Plant Mini Kitu (Qiagen). Standardní PCR diagnostika osivem přenosných patogenů byla provedena pomocí dříve publikovaných druhově specifických primerů a metod: *Pyrenophora teres* (Leišová a kol., 2005), *Pyrenophora graminea* (Taylor a kol., 2001), *Rhynchosporium secalis* (Lee a kol., 2001), *Cochliobolus sativus* (Matušinsky a kol., 2010), *Ramularia collo-cygni* (Frei a kol., 2007), *Fusarium graminearum* (Nicholson a kol., 1998), *F. culmorum* (Schilling a kol., 1996), *F. avenaceum* (Turner a kol., 1998), *F. poae* (Parry and Nicholson, 1996), *Microdochium nivale* var. *nivale* and *M. nivale* var. *majus* (Nicholson a kol., 1996). Všechny reakce byly opakovány třikrát.

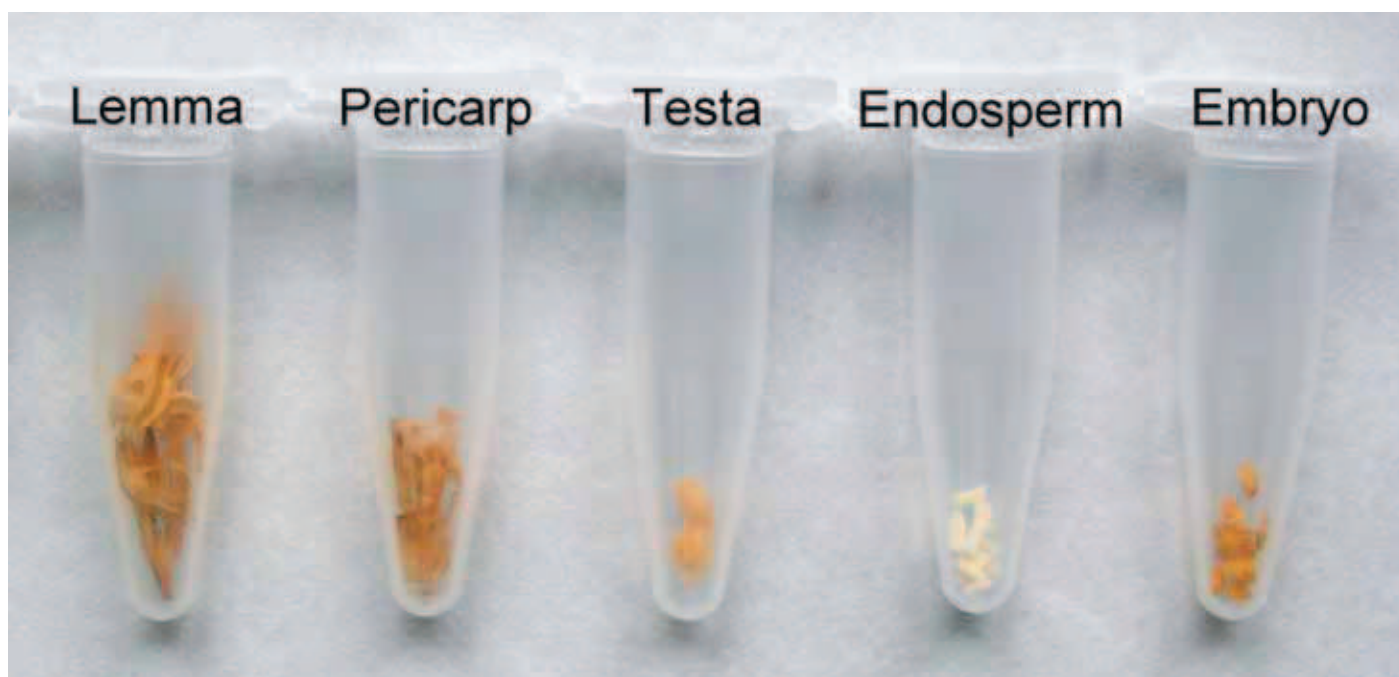
### Výsledky a diskuse

V naší studii bylo analyzováno osivo s přirozenou kontaminací některými osivem přenosnými houbovými patogeny. Po provedené molekulární analýze byla v osivu prokázána přítomnost *P. teres*, *C. sativus*, *R. collo-cygni* a obou variet *M. nivale*. Další z testovaných patogenů se v analyzovaném osivu vyskytovaly pouze v zanedbatelném množství (*P. graminea* a *F. poae*), nebo se nevyskytovaly vůbec (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* a *R. secalis*). Proto se níže popsání zjištění o lokaci týkají pouze patogenů, jež byly v analyzovaném osivu stanoveny v dostatečném množství. U druhů, které se v našem osivu nevyskytovaly, nebylo pochopitelně možno tyto informace získat. Pro ověření lokace druhů, které v naší studii nebylo možno vzhledem k jejich nepřítomnosti vyhodnotit, by bylo nutno vybrat takové osivo, které je prokazatelně kontaminováno např. již zmíněnými druhy fuzárií nebo *P. graminea* a *R. secalis*. Vrátime-li se k patogenům, které se v naší studii v osivu vyskytly, můžeme konstatovat, že jejich DNA byla prokázána ponejvíce v obalových vrstvách (lemma, perikarp) a u některých jako *C. sativus*,

*R. collo-cygni* a *M. majus* byla jejich přítomnost detekována i v embryu (Tab. 1). Zde je nutno zdůraznit, že do experimentu byly vybrány obilky bez viditelného poškození chorobami či zahnědnutí. Dá se předpokládat, že výběrem obilek s viditelným poškozením chorobami by byla naše zjištění zcela jistě ovlivněna. Kdybychom například do analýz zařadili obilky silně poškozené fuzariózami, dá se předpokládat, že DNA patogena bychom pak mohli nalézt v celém profilu obilky. To však nebylo cílem studie. Nás zajímala lokace potenciálně přenosných chorob v bezpříznakových obilkách, kdy při běžné kontrole není kontaminace patrná.

Na to zda a jakým způsobem bude osivo kontaminováno má vliv celá řada faktorů. Např. patogen *P. graminea* je striktně osivem přenosná choroba a přetrvává jako mycelium v obalových vrstvách obilky, jako je plucha a perikarp. Podobně byl např. u *R. collo-cygni* v naší studii zjištěn největší podíl DNA v obalových vrstvách obilky (lemma, perikarp), ale částečně byla prokázána přítomnost i v embryu. V roce 2009, kdy byla zaznamenána silná přirozená infekce ramulárieové skvrnitosti je patrně vysoká hladina DNA *R. collo-cygni* v pluše způsobena kontaminací vzduchem šířených spor. Ovšem přes testu obilky do endospermu *R. collo-cygni* nepronikla ani při těchto pro kontaminaci vhodných podmínkách.

Osivem přenosné choroby obvykle infikují vyvíjející se obilky před sklizní. Kolonizace semen, jak již bylo naznačeno, závisí na přítomnosti zdrojů inokula, ale také na klimatických podmínkách a citlivosti hostitelské odrůdy. Míra kontaminace může mít za určitých podmínek vliv na intenzitu následného poškození porostu chorobou, a také může být kontaminované osivo nástrojem přenosu choroby na velké vzdálenosti (při obchodování s osivy apod.). Např. u *P. teres* nebo *R. collo-cygni* nemusí mít úroveň kontaminace osiva rozhodující vliv na intenzitu choroby, ale může mít význam jako zdroj primární infekce na nové lokality (jako tomu bylo v případě *P. teres* na novém Zélandě a podobně). Naopak např. u *P. graminea* byla ve skleníkových testech zjištěna pozitivní korelace mezi úrovní kontaminace osiva a následnou intenzitou choroby. Na příkladu ramulárieové skvrnitosti bylo prokázáno, že kontaminované osivo je zdrojem primární infekce. V německé studii publikované autory Zamani-Noor a kol. (2009) bylo pomocí molekulárních metod analyzováno zrno sklizené ze silně



Obr. 2: Preparované obilky jarního ječmene připravené k izolaci DNA

napadeného porostu ramuláriovou skvrnitostí. Toto zrno bylo zaseto ve skleníkových podmínkách a rostliny, které z něj vyrostly, byly v průběhu vegetace několikrát testovány. Molekulární metody prokázaly přenos patogena z osiva na vyvíjející se rostliny. Kontaminované osivo hraje i další významnou roli při rozvoji choroby. Nyman a kol. (2009) zjistili, že kombinace infikovaného osiva společně s infekcí listů spory významně zvyšuje intenzitu následného projevu choroby, ve srovnání infekce pouze z jednoho zdroje. Tudíž kontaminované osivo není pouze prostředkem pro šíření choroby na nové lokality, ale následně i zvyšuje intenzitu poškození hostitele po propuknutí choroby.

Základní a nejdůležitější strategií minimalizace rizika chorob přenosných osivem je použití zdravého osiva bez kontaminace. Dobrých výsledků je dosahováno při dodržení této zásady v kombinaci s vhodným ošetřením osiva mořidly. Zatímco pro některé osivem přenosné choroby (např. *P. graminea*, *Microdochium* spp., *Fusarium* spp., *U. nuda*) jsou na trhu k dispozici dostupná účinná mořidla (viz. Registr přípravků na ochranu rostlin) u jiných (např. *R. collo-cygni*) takové možnosti zatím nejsou. Podle zahraničních studií jsou mořidla na ramuláriovou skvrnitost účinná pouze málo nebo vůbec. Například podle studie (Nyman et al. 2009) ošetření osiva ozimého ječmene mořidlem s obsahem účinných látek tebuconazole+triazoxide nezabránilo postupu ramulárie z osiva do nadzemních částí rostlin.

### **Závěr**

Osivo je nejdůležitějším prvkem při pěstování rostlin. Ze špatného osiva lze jen ztěžím dosáhnout dobré sklizně. V průběhu množení osiva je nutno zachovat jeho geneticko-biologické vlastnosti,

klíčovost a dobrý zdravotní stav. Napadení obilky patogeny snižuje jednak vlastní vitalitu osiva a jednak způsobuje následné poškození porostu vlivem rozvoje chorob osivem přenosných. Z toho důvodu je doporučováno používat pro založení porostu uznané osivo ošetřené vhodným mořidlem.

*/Recenzováno/*

### **Poděkování**

Tato publikace vznikla v rámci bilaterální česko-slovenské spolupráce (projekt 7AMB12SK136) s využitím poskytnuté institucionální podpory na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace, Rozhodnutí MZe ČR č. RO0211 ze dne 28. 2. 2011.

Adresa autora: [matusinsky.pavel@vukrom.cz](mailto:matusinsky.pavel@vukrom.cz)



Foto: M. Vyšehlíková