

Výskyt houby *Verticillium longisporum* u vzorků ozimé řepky a jeho určení hodnocením rostlin podle příznaků a metodou ELISA – srovnání obou metod (Monitoring the occurrence of fungal pathogen *Verticillium* sp. by samples of winter rape and its determination by visual evaluation of plants and ELISA – comparison of both methods)

Spitzer, T., Matušinsky, P.
Agrotest fyto, s. r. o., Havlíčkova 2787, Kroměříž

Souhrn: V letech 2013–2015 byly analyzovány vzorky ozimé řepky na přítomnost *Verticillium longisporum* odebraných z ploch s předpokládaným výskytem choroby z různých míst ČR agronomickou službou Svazu pěstitelů a zpracovatelů olejnin. Hodnocení bylo provedeno laboratorní analýzou metodou ELISA a vizuálním hodnocením porostu odběrateli vzorků a provedeno srovnání obou metod. Bylo zjištěno, že se houbový patogen *Verticillium longisporum* v ČR v porostech ozimé řepky běžně vyskytuje, protože slabě pozitivních a pozitivních vzorků bylo v průměru 3 let okolo 70 %. Shoda laboratorní analýzy ELISA s vizuálním hodnocením napadení porostu byla překvapivě dobrá na úrovni 62 %, což ukazuje na dobré znalosti příznaků i choroby ozimé řepky.

Klíčová slova: *Verticillium longisporum*, *Verticillium dahliae*

Abstract: Between 2013 and 2015, samples of winter rape were analyzed for the presence of *Verticillium longisporum*, taken from areas with suspected disease from different places of the Czech Republic by Svazu pěstitelů a zpracovatelů olejnin agronomic service. The evaluation was made by ELISA laboratory analysis and visual evaluation of the stand by the sampler and a comparison of both methods was performed. The *Verticillium longisporum* fungal pathogen in the Czech Republic has been found to be common in winter rape crops, since slightly positive and positive samples were about 70 % on average for 3 years. Laboratory analysis ELISA compared with a visual evaluation of the infestation was surprisingly good at 62 %, indicating a good knowledge of this disease of winter rape.

Key Words: *Verticillium longisporum*, *Verticillium dahliae*

Úvod

Původcem významné choroby ozimé řepky – verticiliového vadnutí řepky – je houbový patogen *Verticillium longisporum*. Houba se vyskytuje ve všech oblastech pěstování ozimé řepky, přičemž významnější výnosové ztráty byly zaznamenány v přímořských oblastech severní Evropy hlavně v Německu. Dunker et al. (2008) v polních pokusech s očkováním i přírodní infekcí zjistil ztráty na výnose jednotlivých rostlin 20–80 % v závislosti na infekčním potenciálu půdy.

Na řepce jsou detekovány dva hlavní zástupci rodu *Verticillium* a to *V. longisporum* and *V. dahliae*, kteří se liší preferencí hostitelů. Ozimou řepku *Brasica napus* preferuje jako hostitele *V. longisporum*.

Průzkum prováděný v letech 2006–2008 na 66 lokalitách v České republice prokázal přítomnost *V. longisporum* na rostlinách řepky ve 12–41 % (Spitzer et al. 2008). Přítomnost tohoto patogena jako jednoho ze dvou nejvíce rozšířených u ozimé řepky na Slovensku prokázal Bokor et al. (2014).

Spolehlivé určení patogena *V. longisporum* na rostlinách řepky není snadná vzhledem k jeho životnímu cyklu a pouhé vizuální určení původce choroby je velmi ovlivněno zkušeností hodnotitele. Proto by bylo přínosné zavedení spolehlivých analytických metod determinace patogena například ELISA testy. Tato metoda se u ozimé řepky již v minulosti využívala. Byly vyvinuty ELISA testy pro detekci zástupců rodu *Verticillium* a ve Francii byly ELISA testy testovány jako jedna z možností sledování kvality osiva řepky (Wagner et al. 2012). Pro rychlé, spolehlivé a citlivé zjišťování obsahů kadmia ve vodě, půdě a rostlinách řepky vyvinul Gao et al. (2012) metodu na bázi „indirect competitive ELISA“.

Cílem této práce bylo:

- Pokračování ve sledování výskytu *V. longisporum* v ČR z let 2006–2008 a
- Srovnání výsledků rozborů vzorků ozimé řepky na přítomnost houbového patogenu *V. longisporum* metodou ELISA s celkovým vizuálním hodnocením porostu na poli provedeným odběrateli vzorků a posouzení vhodnosti těchto metod pro praktickou determinaci v patogenu v provozních podmínkách.

Materiál a metody

Vzorky rostlin byly odebírány těsně po sklizni z různých polí osetých ozimou řepkou v ČR v letech 2013–2015. Byly vybrány lokality a porosty, u nichž odběratelé vzorků předpokládali přítomnost verticiliového vadnutí. Z každé lokality v každém roce bylo na strništi odebráno patnáct zbytků stonků a z nich odebrána část nad kořenovým krčkem o délce 20 cm (Dunker et al. 2008). Lokality nebyly každý rok identické, ale lišily se podle aktuálního pěstování ozimé řepky ve vybraných zemědělských podnicích. V roce 2013 bylo analyzováno celkem 28 vzorků, v roce 2014 26 vzorků a v roce 2015 22 vzorků. Každý vzorek byl namlet na laboratorním mlýnku Fritsch Pulverisette 19 na síť 1 mm a analyzován metodou ELISA.

Metoda ELISA byla provedena pomocí spektrofotometru Mikroplate Reader MRX II s použitím KITu *Verticillium* komplete KIT 480 od firmy Bioreba AG. Pro každou pokusnou sezonu byl pořízen nový Kit. Výsledné naměřené extinkce jednotlivých vzorků zjištěné metodou ELISA byly porovnány s pozitivní a s negativní kontrolou příslušnou k jednotlivým použitým kitům. Vzorky pak byly následně rozříděny do tří skupin a to – pozitivní (blíží se hodnotou extinkce pozitivní kontrole), negativní (blíží

Tab. 1: Slovní zařazení jednotlivých vzorků na základě analýz ELISA a celkového vizuálního hodnocení porostů

Číslo	2015		2014		2013	
	Metoda hodnocení		Metoda hodnocení		Metoda hodnocení	
	Vz.	ELISA	Vizuální	ELISA	Vizuální	ELISA
1	slabě pozitivní	nemocný	pozitivní	nemocný	pozitivní	nemocný
2	pozitivní	zdravý porost	pozitivní	nemocný	pozitivní	nemocný
3	negativní	zdravý porost	slabě pozitivní	nemocný	pozitivní	nemocný
4	slabě pozitivní	nemocný	pozitivní	nemocný	pozitivní	nemocný
5	slabě pozitivní	zdravý porost	pozitivní	nemocný	pozitivní	nemocný
6	slabě pozitivní	nemocný	pozitivní	zdravý porost	pozitivní	nemocný
7	negativní	zdravý porost	slabě pozitivní	zdravý porost	pozitivní	nemocný
8	pozitivní	nemocný	slabě pozitivní	zdravý porost	pozitivní	nemocný
9	slabě pozitivní	zdravý porost	negativní	zdravý porost	pozitivní	nemocný
10	negativní	zdravý porost	slabě pozitivní	zdravý porost	negativní	nemocný
11	slabě pozitivní	zdravý porost	negativní	zdravý porost	slabě pozitivní	nemocný
12	negativní	zdravý porost	slabě pozitivní	zdravý porost	slabě pozitivní	zdravý porost
13	pozitivní	zdravý porost	negativní	nemocný	pozitivní	nemocný
14	slabě pozitivní	nemocný	negativní	zdravý porost	pozitivní	nemocný
15	negativní	zdravý porost	slabě pozitivní	zdravý porost	negativní	nemocný
16	slabě pozitivní	nemocný	slabě pozitivní	zdravý porost	pozitivní	zdravý porost
17	negativní	zdravý porost	slabě pozitivní	zdravý porost	negativní	nemocný
18	slabě pozitivní	zdravý porost	slabě pozitivní	zdravý porost	negativní	zdravý porost
19	negativní	zdravý porost	slabě pozitivní	zdravý porost	pozitivní	nemocný
20	slabě pozitivní	nemocný	negativní	zdravý porost	slabě pozitivní	nemocný
21	negativní	zdravý porost	slabě pozitivní	nemocný	slabě pozitivní	zdravý porost
22	negativní	zdravý porost	pozitivní	nemocný	pozitivní	nemocný
23			slabě pozitivní	zdravý porost	slabě pozitivní	zdravý porost
24			negativní	zdravý porost	negativní	nemocný
25			negativní	zdravý porost	pozitivní	nemocný
26			negativní	zdravý porost	pozitivní	nemocný
27					negativní	nemocný
28					negativní	nemocný

se hodnotou extinkce negativní kontrole) a slabě pozitivní (s mírou extinkce okolo střední hodnoty mezi pozitivní a negativní kontrolou). Hodnoty extinkcí tří uvedených skupin jsou uvedeny v tabulce č. 2. Zároveň bylo zaznamenáno vyjádření odběratele vzorku na jeho vizuální hodnocení porostu z pohledu jeho názoru na míru napadení *V. longisporum*. Odběratelé vzorků hodnotili porost ve dvou kategoriích jako zdravý porost anebo nemocný porost.

Výsledky a diskuze

Výsledky analýz vzorků metodou ELISA spolu s hodnocením stavu porostu jsou uvedeny pro jednotlivé roky v tabulce č. 1. V roce 2013

V tomto roce bylo analyzováno celkově 28 vzorků. Metodou ELISA bylo zjištěno 22 slabě pozitivních a pozitivních vzorků. V celkem 18 případech byla zjištěna určitá míra schody s vizuálním hodnocením napadení a 10krát byla zjištěna neshoda.

V roce 2014

V tomto roce bylo analyzováno celkově 26 vzorků. Metodou

ELISA bylo zjištěno 18 slabě pozitivních a pozitivních vzorků. V celkem 14 případech byla zjištěna určitá míra schody s vizuálním hodnocením napadení a 12krát byla zjištěna neshoda.

V roce 2015

V tomto roce bylo analyzováno celkově 22 vzorků. Metodou ELISA bylo zjištěno 13 slabě pozitivních a pozitivních vzorků. V celkem 15 případech byla zjištěna určitá míra schody s vizuálním hodnocením napadení a 7krát byla zjištěna neshoda.

Z provedených analýz i vizuálního hodnocení porostů řepky vyplývají některé zajímavé poznatky. Vizuální hodnocení napadení porostu *V. longisporum* je ovlivněno všemi negativy spojenými se subjektivním hodnocením. Toto hodnocení bylo od odběratelů vzorků na poli požadováno proto, abychom zjistili, jak se bude toto hodnocení lišit od analytického laboratorního testování. Vizuální hodnocení se s metodou ELISA shodovalo v 62 % případů v průměru tří let.

Přítomnost patogena byla dále prokázána metodou ELISA v průměru tří let u cca 70 % odebraných vzorků.

Tab. 2: Hodnoty extinkce pro pozitivní a negativní kontrolu a zařazení do tříd podle naměřených hodnot extinkcí (ELISA)

2015			2014			2013		
pozitivní kontrola	2,965	pozitivní kontrola	2,478	pozitivní kontrola	3,075			
negativní kontrola	0,148	negativní kontrola	0,116	negativní kontrola	0,175			
Vzorek	Rozpětí hodnot		Vzorek	Rozpětí hodnot		Vzorek	Rozpětí hodnot	
pozitivní	2,156	3,398	pozitivní	1,731	3,42	pozitivní	1,997	3,06
slabě pozitivní	1,294	1,824	slabě pozitivní	1,022	1,55	slabě pozitivní	1,227	1,913
negativní	0,335	0,899	negativní	0,372	0,793	negativní	0,459	0,977

Závěr

Z analýz přítomnosti *V. longisporum* u ozimé řepky provedených metodou ELISA vyplývá dobrá možnost použití kitů, které nejsou specificky zaměřené pouze na *V. longisporum*, ale zachycují oba hlavní druhy *V. longisporum* a *V. dahliae* na řepce. Shoda laboratorní analýzy ELISA s vizuálním hodnocením napadení porostu byla překvapivě dobrá na úrovni 62 %. Svědčí to o vcelku dobré znalosti projevů patogena *V. longisporum* u pracovníků, kteří vzorky ozimé řepky odebírali. Dále se prokázalo, že problém této choroby je stálý, a že se houbový patogen vyskytuje na polích s ozimou řepkou minimálně ve stejné míře, jak bylo zaznamenáno předchozím monitoringem situace v letech 2006–2008.

/Recenzováno/

Poděkování

Tato publikace vznikla z podpory projektu QJ1310227.

Literatura

Bokor P., Becka D., Tothova M.: Occurrence of white rot and verticillium wilt in Winter Rapeseed fields in Slovakia during 2014. ROSPEROUS OIL CROPS 2014 Pages: 82–85 Published: 2014.
 Dunker S., Keunecke H., Steinbach P. Von Tiedemann A.: Impact of *Verticillium longisporum* on Yield and Morphology of Winter Oilseed Rape (*Brassica napus*) in Relation to Systemic Spread in the Plant, Journal of Phytopathology, Volume 156, Issue 11-12, pages 698–707, December 2008
 Gao W., Nan T. G., Tan G. Y., Zhao H. W., Wang B. M., Li Q. X., Meng F. Y.: Development of a sensitive monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of cadmium ions in water, soil and rape samples. FOOD AND AGRICULTURAL IMMUNOLOGY Volume: 23 Issue: 1 Pages: 27-39 DOI: 10.1080/09540105.2011.589045 Published: 2012.

Spitzer T. Matušinsky P. Mikolášová R. Wolf G.: Occurrence of Verticillium wilt of oil seed rape in the Czech Republic detected by PCR and ELISA 56. Deutsche Pflanzenschutztagung in Kiel 22.–25. September 2008 : Mitteilungen aus dem Julius Kühn-Institut, 2008, 370 ISSN: 1867-1268

Wagner M. H., Ducournau S., Luciani A., Lechappe J. : From knowledge-based research towards accurate and rapid testing of seed quality in winter rape. SEED SCIENCE RESEARCH Volume: 22 Pages: S80–S85 Supplement: 1 DOI: 10.1017/S0960258511000316 Published: FEB 2012.

Meteorologické varování pro všechny plevely v pšenici, žitě a tritikale!



**V jarních měsících očekávejte
příchod silného hurikánu, který
zasáhne celou Českou republiku.
Ohrožena je chundelka metlice
a všechny dvouděložné plevely,
následně se očekává extrémně
vysoká úroda obilnin.**

**Informace:
602 275 038**

 Dow AgroSciences