

Agrotest fyto, s.r.o.
Výzkumné centrum SELTON, s.r.o.
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

Metodika determinace endofytické tmavohnědé skvrnitosti ječmene a ochrany proti této chorobě

Kroměříž 2011

Agrotest fyto, s.r.o.
Výzkumné centrum SELTON, s.r.o.
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

Metodika determinace endofytické tmavohnědé skvrnitosti ječmene a ochrany proti této chorobě

Kroměříž 2011

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu č. QH91054

Metodika prošla oponentním řízením a získala osvědčení o uplatnění certifikované metodiky vydané Státní rostlinolékařskou správou pod číslem: SRS 039665/2011 dne 9.6.2011.

Oponenti:

Doc. Ing. Evženie Prokinová, CSc., Česká zemědělská univerzita v Praze
Ing. Petr Kroutil, Ph.D., Státní rostlinolékařská správa v Praze

ISBN 978-80-87555-04-0

Autoři:

Pavel Matušinsky

Pavel Mařík

Leona Leišová-Svobodová

Věra Minaříková

Lenka Stemberková

Martina Hanusová

Ludvík Tvarůžek

Použité fotografie: Pavel Matušinsky

Obsah

1.	Cíl metodiky.....	6
2.	Úvod.....	6
3.	Vlastní popis metodiky.....	7
4.	Příznaky a diagnostika	8
4.1	Symptomatická diagnostika.....	10
4.2	Diagnostika optickou mikroskopií	10
4.3	Kultivace na Petriho miskách.....	11
4.4	Standardní PCR.....	12
4.5	Real-time PCR.....	13
5.	Životní cyklus a šíření	14
6.	Odrůdová odolnost	15
7.	Ochrana	16
8.	Rezistence ke strobilurinovým fungicidům.....	17
9.	Závěr.....	19
10.	Srovnání „novosti postupů“	19
11.	Popis uplatnění certifikované metodiky	19
12.	Ekonomické aspekty	20
13.	Seznam použité literatury	20
14.	Seznam publikací, které předcházely metodice	22

1. Cíl metodiky

Cílem metodiky jsou postupy detekce endofytické tmavohnědé skvrnitosti ječmene a strategie ochrany ječmene proti této chorobě.

2. Úvod

Ramularia collo-cygni B. Sutton & J.M. Waller (dále v textu jen RCC) je houbový patogen, který způsobuje onemocnění jarního i ozimého ječmene s názvem endofytická tmavohnědá skvrnitost ječmene (Obr. 1). Pro zkrácení budeme dále v textu používat označení ramuláriová skvrnitost. Ramuláriová skvrnitost je chorobou pozdních růstových fází a příznaky ve formě nekrotických skvrn obvykle ohraničených žlutým halo se objevují nejdříve ve fázi metání, kvetení, ale většinou ještě později. Následné výnosové ztráty způsobené chorobou se pohybují v rozmezí 15-25 % (Cromey, 2004). Dochází také ke snížení kvality zrna, což je významné zejména u sladovnických ječmenů. Závažnost choroby spočívá ve velmi rychlém rozvoji skvrnitosti za účasti toxinů (rubelinů), které mohou způsobit odumření listů během několika dnů. Symptomatický projev ramuláriové skvrnitosti na listech je obtížně rozlišitelný od symptomů dalších listových skvrnitostí způsobených buď abiotickými faktory nebo jinými houbovými parazity.

Ramuláriová skvrnitost ječmene bývá označována jako „nová choroba“ a to z důvodu jejího relativně nedávného znovuoobjevení. Přestože byl původce objeven před více než 100 lety (1893) a znám jako *Ophiocladium hordei*, vážný zájem fytopatologů o něj se datuje teprve od 80. let dvacátého století, když byl identifikován jako původce nové choroby ječmene v Rakousku (Huss *et al.*, 1987). Sutton a Waller (1988) revidovali jeho taxonomické zařazení a přejmenovali jej na *Ramularia collo-cygni*. Výskyt RCC byl zaznamenán v několika zemích jako například Rakousko (1987), Švýcarsko (1988), Německo (1998), Nový Zéland (2000), Jižní Amerika (2002), Skotsko (2002), Francie (2003), Norsko (2004), Irsko (2004), Dánsko (2006), Švédsko (2006), ale také Česká republika (již v roce 1998) a Slovensko (2008).

Taxonomicky je RCC zařazena do říše *Fungi*, třídy *Dothideomycetes*, řádu *Capnodiales*, čeledi *Mycosphaerellaceae*. *Ramularia collo-cygni* je nepohlavním stádiem houby (pohlavní stádium zatím nebylo popsáno, ale podle předpokladů bude nejspíše patřit do rodu *Mycosphaerella*).



Obr. 1 Porost ozimého ječmene s příznaky ramulárie skvrnitosti na listech

3. Vlastní popis metodiky

Následující text přináší podrobné návody jak detekovat původce ramulárie skvrnitosti jednak symptomaticky v polních podmínkách, dále pomocí klasických fytopatologických metod (mikroskopování, kultivace na živných médiích) a také molekulárními metodami. Jsou zpracovány metody detekce standardní PCR, ale i kvantitativní analýza metodou real-time PCR. V části týkající se fungicidní ochrany jsou navrženy strategie jak s ramuláriovou skvrnitostí bojovat (jaké účinné látky použít, a ve kterých termínech aplikaci provést). V kapitole „Rezistence ke strobilurinům“ je popsán postup, jak detekovat izoláty RCC rezistentní ke strobilurinovým fungicidům.

4. Příznaky a diagnostika

RCC napadá především listy, zejména nejvýše položené listy praporcové a listy nižších listových pater, ale i listové pochvy, stébla a osiny (Obr. 2, 3, 4). Symptomy na listech jsou odlišné v raných fázích od symptomů v pozdějších fázích vývoje choroby. Nejprve se objevují drobné tmavě hnědé až černé skvrny (1 mm v průměru) zatím bez žlutého ohraničení, které jsou velmi podobné skvrnám způsobeným stresem ze slunečního záření. Avšak na rozdíl od těchto fyziologických skvrn, které jsou viditelné pouze z osluněné strany listu, jsou symptomy způsobené RCC z obou stran listu, s intenzivnějším projevem na osluněné straně.

Později vznikají typické symptomy, které jsou obdélníkového tvaru, tvarované podél listové nervatury (Obr. 4). Na spirálově ohnutých listech je patrná typická hranice silnějšího symptomatického projevu na vrchní, intenzivně osluněné, části listu. Na starších listech a v pozdějších fázích vývoje choroby jsou na spodní straně listů pomocí lupy nebo i pouhým okem rozpoznatelné, do řad uspořádané, bílé shluky konidioforů (Obr 5.).

Obr. 2 List ječmene s typickými příznaky ramulárie skvrnitosti



Uspořádání shluků konidioforů je dáno uspořádáním průduchů, z nichž vyrůstají. Jednotlivé konidiofory jsou esovitě zakřiveny do podoby připomínající labutí šíje, a podle nich byl původce latinsky druhově pojmenován (*collum* = krk; *Cygnus* = labuť) (Obr. 6).



Obr. 3 Příznaky na osinách



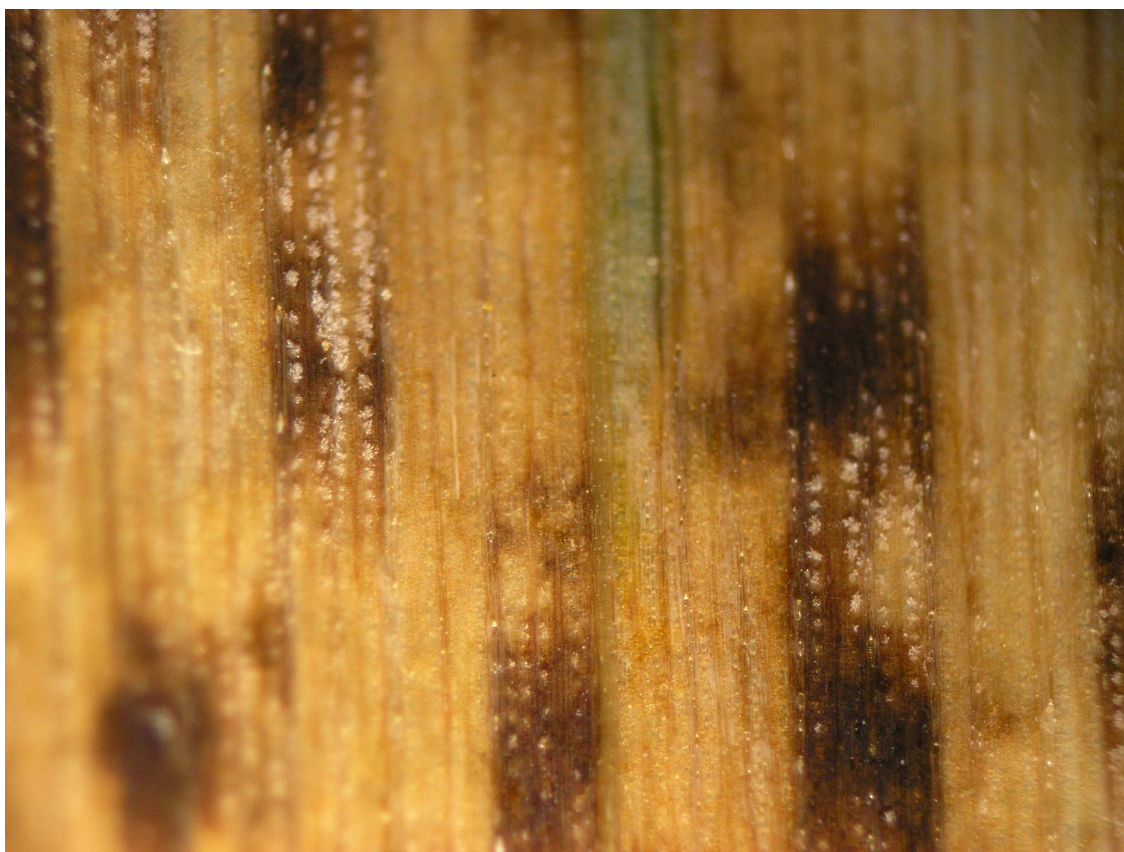
Obr. 4 Nekrotické skvrny se žlutým halo ohraničené rovnoběžnou nervaturou listu

4.1 Symptomatická diagnostika

Ramuláriová skvrnitost je poměrně obtížně rozeznatelná od dalších listových skvrnitostí způsobených abiotickými faktory či dalšími patogeny. V pozdějších fázích jsou obdelníkové nekrotické skvrny ohraničené žlutým halo poměrně dobrým znakem (Obr. 4), ovšem vždy je nutno si diagnózu potvrdit jednoduchým testem ve vlhké komůrce a mikroskopováním (viz další bod).

4.2 Diagnostika optickou mikroskopií

K vytvoření konidioforů v této fázi je potřebná kultivace. Listy se vloží do vlhké komůrky (Petriho misky nebo plastického sáčku) s kouskem namočeného savého papíru a po 24 - 48 hodinách při teplotě 15 °C se prověří pod binokulární lupou, zda narostly shluky konidioforů (Obr. 5). Rozměry ramuláriových konidioforů jsou 15 - 70 x 3 - 5 μm a rozměry konidií 7 - 11 x 3 - 6 μm (Obr. 6).



Obr. 5 Shluky konidioforů uspořádané v řadách na spodní straně listu pozorované lupou



Obr. 6 Konidiofory RCC s konidiemi pozorované pod mikroskopem

4.3 Kultivace na Petriho miskách

Přenesením konidií pomocí jehly na Petriho misky s bramborovo-dextrozovým agarem (PDA) překrytým celofánovou folií (vše sterilní) a kultivací ve tmě při 15 °C je možno po dvou až třech týdnech získat kultury RCC, pro které je typická produkce barevných látek – rubelinů, zbarvujících médium do různých barev – nejčastěji růžové, fialové nebo s nádechem buď do žluta, zelena či hněda (Obr. 7). Mycelium RCC roste velmi pomalu, za popsaných kultivačních podmínek netvoří konidie a morfologie kolonií je variabilní (Obr. 7).

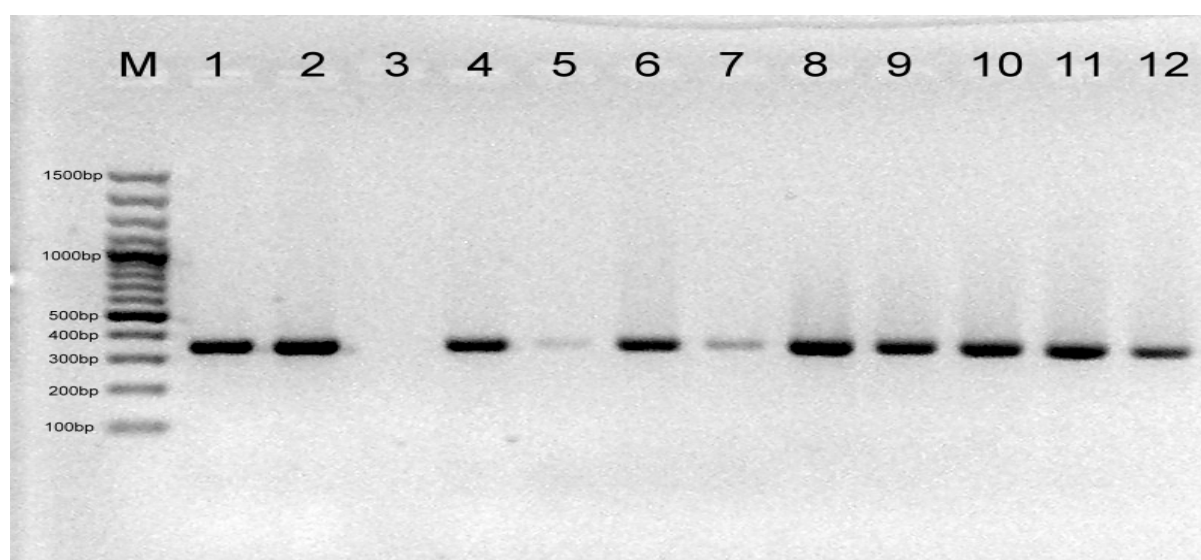


Obr. 7 Kultivace RCC na Petriho miskách s bramborovo-dextrozovým agarem (PDA)

4.4 Standardní PCR

Pro přesné stanovení ramuláriové skvrnitosti lze využít molekulární diagnostiky na bázi polymerázové řetězové reakce (PCR). V roce 2006 (Havis *et al.*, 2006) byla publikována metoda nested PCR ke stanovení RCC a o rok později byla vyvinuta metoda dignostiky RCC pomocí standardní PCR (Frei *et al.*, 2007). Druhá uvedená metoda je jednodušší a levnější, proto ji doporučujeme k využití. Lze ji využít jak pro stanovení přítomnosti DNA *Ramularia collo-cygni* v listech tak i v znu. Po izolaci DNA (např. DNeasy Plant Mini Kit, Qiagene) z analyzovaných tkání sestává reakce v celkovém objemu 20 μL ze 2.0 μL této izolované DNA, 0.2 μM obou primerů RC3/RC5 (RC3 – GCG ACC CTG CCG CGC AA, RC5 – CTC TGC GAA TAG TTG CCA CAA CG), 0.2 mM dNTP, 2.5 mM MgCl_2 , 1 x koncentrovaný roztok

pufru (750 mM Tris-HCl a 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) a 1 U polymerázy. Reakční podmínky: úvodní jednorázová denaturace při 95 °C po dobu 3 minut dále 35 cyklů denaturace 94 °C (20 sekund), annealing 61 °C (20 sekund) a elongace 72 °C (1 minuta). Na závěr jednorázová elongace při teplotě 72 °C po dobu 3 minut. Výsledný produkt amplifikace lze separovat v 1.5 % agarózovém gelu pomocí elektroforézy a po obarvení interkalačním barvivem (např. ethidiumbromidem) vizualizovat v UV světle. O přítomnosti DNA *Ramularia collo-cygni* svědčí fragment o velikosti 348 bp (Obr. 8). Primery RC3/RC5 jsou vysoce specifické k RCC a nedochází ke křížové reakci s dalšími patogeny potenciálně se vyskytujícími na ječmeni. Při standardní PCR byl dosažen detekční limit 1 fg cílové DNA.



Obr. 8 Fotografie agarózového gelu po PCR. M – hmotnostní marker 100 bp DNA velikostní standard, 1 a 2 - pozitivní kontroly DNA mycelia RCC, 3 - negativní kontrola (voda), 4 až 12 - DNA listů ječmene z různou mírou napadení ramuláriovou skvrnitostí.

4.5 Real-time PCR

Real-time PCR je metoda molekulární biologie umožňující rychlou, citlivou a spolehlivou detekci a kvantifikaci specifického úseku DNA. Pro kvantifikaci RCC je dostupná fluorescenčně značená TaqMan sonda a primery (Gubiš *et al.*, 2010). Výhodou real-time PCR oproti standardní PCR je umožnění přesného stanovení výchozího počtu kopií cílové templátové sekvence DNA a tudíž odvození množství DNA *Ramularia collo-cygni* ve tkáních ječmene. Pro kvantifikaci pomocí real-time PCR je nezbytné konstantí množství DNA v reakci. Reakce se provádí v reakčním objemu 25 µl obsahujícím 1x PCR pufr, 4 mM MgCl_2 , 100 µM každého z nukleotidů dNTP, 1.25 U AmpliTag Gold polymerázy (Life Technology, Foster City, USA), 0.3 µM od obou primerů, 0.2 µM fluorescenčně značené TaqMan MGB sondy (Tab. 1) a 250

ng templátové DNA. Reakční podmínky: 10 min při 95 °C a 40 cyklů opakujících inkubaci při 95 °C po dobu 15 sekund a 60 °C po dobu 1 minuty. Na základě naměřených hodnot Ct (tj. počet cyklů nutných pro překročení prahové hodnoty fluorescence pozadí) se z kalibrační křivky odvozuje hodnota obsahu RCC v reakci. Kalibrační křivka je vytvořena vynesáním hodnot Ct naměřených u vzorků se známou koncentrací cílové DNA RCC, tzv. standardů.

Tab. 1 Sekvence primerů a TaqMan sondy pro real-time PCR houby *Ramularia collo-cygni*

Primery a TaqMan sonda	Sequence 5'-3'	Velikost amplikonu
Rccj1-F	GAGCGTCATTTCACTCAAG	63 bp
Rccj3-R	GAGGCGCGGAGAGACT	
RccSON	CTCGCTTGGTATTGGGCGTC	

5. Životní cyklus a šíření

První příznaky se na listech ječmene objevují v pozdějších růstových fázích hostitele (fáze kvetení a později). Rozvoj příznaků je poté velmi rychlý. K rychlému postupu symptomů přispívají toxiny (rubeliny), které RCC produkuje jako sekundární metabolity. Jsou to polycyklické aromatické sloučeniny, které vykazují fotodynamickou aktivitu: za účasti světla vznikají aktivní formy kyslíku, které jsou pro rostlinná pletiva velmi toxické. Dochází k nekrotizaci pletiv, což vede k redukci zelené plochy listů a snížení fotosyntetické aktivity rostliny. V důsledku toho dochází k předčasnému dozrávání a snížení jak výnosu, tak i kvalitativních parametrů zrna. S největší pravděpodobností souvisí objevení se příznaků se senescencí, kdy dochází k postupné degradaci antioxidantního ochranného systému rostliny, který již není schopen efektivně odbourávat aktivní formy kyslíku, které vznikají právě jako následek reakce rubelinů na sluneční záření.

Ramuláiová skvrnitost je choroba přenosná osivem, proto se na ozimém ječmeni vyskytuje bezpříznakově už na podzim. Přezimuje na něm ale i na jiných jednoděložných rostlinách a přestože nevytváří symptomy, je detekovatelná molekulárními metodami. Jakmile začne ozimý ječmen v měsíci červnu dozrávat, projevují se příznaky a na spodní straně listů vznikají konidiofory, z nichž se uvolňuje množství konidií, které jsou roznášeny větrem. Průběh infekce a šíření choroby je od tohoto stupně napadnutí velmi rychlé. Jednotlivé části ječmene se během velmi krátké doby pokryjí typickými symptomy a začnou zasychat, přičemž se ramuláiová skvrnitost stane na napadených listech dominantní.

V České republice byla RCC poprvé popsána v roce 1998 ve Šlechtitelské stanici Stupice u Prahy. V následujících letech byl výskyt tohoto patogena pozorován i na jiných lokalitách. Zatím nejvyšší rozsah napadení byl zaznamenán v letech 2002 a 2009, v ostatních letech byl výskyt choroby na území ČR spíše lokálního charakteru. Z hlediska intenzity a rozšíření choroby jsou za důležité považovány zejména klimatické podmínky, jinak řečeno vliv ročníku. Dalším důležitým faktorem je lokalita a vyšší riziko výskytu je při souběžném pěstování ozimého a jarního ječmene.

Do další vegetační sezony se RCC přenáší buď osivem, výdřelem, přenosem mezi obilninami, zejména mezi jarním a ozimým ječmenem, nebo přezimováním v planých druzích trav. Někteří autoři popisují vytváření drobných kulovitých útvarů na slámě ječmene. Tyto útvary byly pracovními nazvány asteromella (Salamati a Reitan, 2006). O podrobnějším významu asteromell dosud nejsou k dispozici podrobnější informace, pravděpodobně se může jednat o klidové spory, které pomáhají houbě přežít nepříznivé zimní období.

Ramularia collo-cygni se může vyskytovat, kromě ječmene, v menší míře i na tritikale, žitu, pšenici, ovsu, kukuřici, planých druzích trav (např. pýru) a byla izolována také z konopí.

6. Odrůdová odolnost

Nejdůležitější a nejefektivnější ochranou proti všem houbovým patogenům je, kromě dodržování správné agrotechniky, výběr odolných odrůd. Plně odolné odrůdy vůči ramuláriové skvrnitosti však dosud nejsou dostupné, nicméně výsledkem četných odrůdových pokusů je přehled o odrůdách s vyšší či nižší náchylností k této chorobě. K odrůdám ozimého ječmene s menší mírou napadení patří např. Merlot nebo Highlight, naopak odrůdy jako Luran, Laverda či Wendy vykazují v českých pokusech silnější symptomatické projevy napadení. U jarních ječmenů, např. v experimentech prováděných ve Skotsku, byla pozorována nejmenší míra napadení u odrůdy Decanter, naopak nejvíce napadena byla odrůda Cocktail (Oxley a Havis, 2009). V odrůdových pokusech prováděných na území ČR bylo hodnoceno napadení RCC u 150 odrůd jarního ječmene, přičemž v roce 2009 nebylo zjištěno výrazných rozdílů mezi jednotlivými odrůdami, tj. všechny odrůdy byly ve fázi voskové zralosti silně napadeny RCC. Jelikož odrůdy s účinným majorgenem odolnosti dosud nebyly nalezeny, navíc typ odolnosti založený na jednom genu rezistence bývá obvykle patogenem rychle překonán, budou vhodnější alternativou pravděpodobně odrůdy schopné koexistovat s RCC či ji tolerovat. Dosavadní výzkum byl zaměřen na hledání odrůd s nižším symptomatickým projevem choroby. Dosud se nepodařilo nalézt ve světových kolekcích ječmene žádný genový zdroj rezistence k RCC, nižší symptomy v mléčné až voskové zralosti vykazují některé polopozdní

až pozdní odrůdy. Předmětem dalšího výzkumu bude získání podrobnějších informací o toleranci odrůd a výzkum interakcí RCC v komplexu s dalšími listovými chorobami.

7. Ochrana

Snížení infekčního tlaku lze dosáhnout včasným a kvalitním zapravením posklizňových zbytků a včasnou zaorávkou vzešlých výdrolů ječmene. Nedoporučuje se pěstování ozimého a jarního ječmene na sousedících honech či bezprostředně po sobě v osevním postupu a rovněž pěstování ječmene v příliš vlhkých oblastech. Do budoucna by bylo dobrým způsobem ochrany pěstování rezistentních odrůd ječmene, zatím však nejsou v registrovaném sortimentu žádné odrůdy s dostatečnou odolností k RCC a ani ve světovém sortimentu ječmene nebyl nalezen šlechtitelsky využitelný genový zdroj rezistence k RCC. Fungicidy tedy zůstávají hlavním nástrojem pěstitelů k redukci škod způsobených ramulariovou skvrnitostí.

I přímá ochrana má však svá úskalí. Proti ramuláriové skvrnitosti ječmene není dosud v ČR registrován žádný přípravek a při zavádění nových fungicidů na trh není uváděna jejich účinnost proti této chorobě. Jelikož však ramuláriová skvrnitost ječmene nabývá na významu, je pravděpodobné, že v budoucnu budou oficiálně doporučeny účinné přípravky cíleně proti tomuto patogenu. V rámci výzkumu však byla zjištěna vedlejší účinnost některých fungicidů, resp. jejich účinných látek, registrovaných v ČR do ječmene i proti ramuláriové skvrnitosti. Některé přípravky s dobrou účinností na síťovitou skvrnitost ječmene (*Pyrenophora teres*) a spálu ječmene (*Rhynchosporium secalis*) na ramuláriovou skvrnitost ječmene neúčinkují vůbec, účinkují jen slabě nebo jen nevýznamně oddalují plné rozvinutí symptomů. Úspěšnost jejich použití je omezena několika faktory, mezi něž patří rezistence RCC vůči určitým skupinám látek (strobiluriny). Přípravky s hlavní účinnou látkou ze skupiny strobilurinů nelze doporučit jako samostatně a dlouhodoběji účinné proti RCC, účinnost strobilurinů může být podpurná. RCC si rychle vyvinula rezistenci vůči látkám z této skupiny a v lokalitách, kde byly strobiluriny v posledních letech použity, jsou rezistentní populace RCC zastoupeny až ve sto procentech.

V zahraničních zdrojích jsou jako nejlepší uváděny účinné látky - chlorothalonil a epoxiconazole. Z účinných látek obsažených v přípravcích registrovaných v ČR pro ječmen, které jsou částečně odzkoušené na účinnost proti endofytické tmavohnědé skvrnitosti ječmene, jsou v literatuře jmenovány prothioconazole a tebuconazole.

Důležitým prvkem fungicidní ochrany je termín aplikace. Ramuláriová skvrnitost je choroba, která se symptomaticky projevuje v pozdějších růstových fázích. Účinná bývá

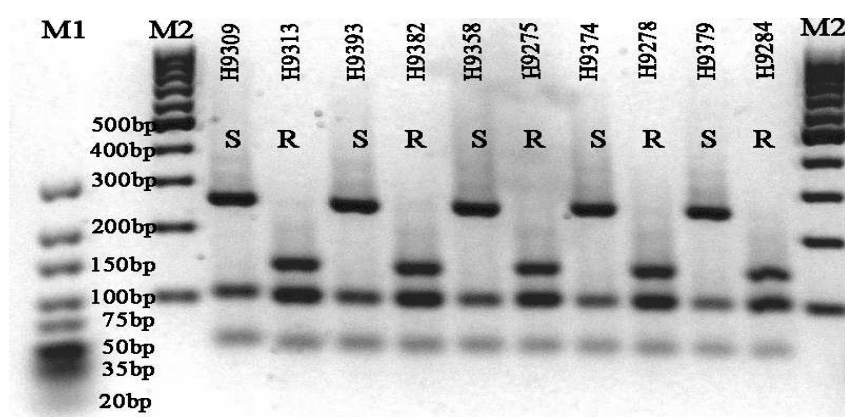
aplikace provedená v období naduřování pochvy praporcového listu (BBCH 45-49). V některých letech či lokalitách s vysokým infekčním tlakem se však ukazuje ochrana v jednom aplikačním termínu jako málo efektivní a rovněž z pohledu ochrany vůči celému komplexu listových chorob ječmene jako nedostatečná. Nejvyššího efektu i výnosového přínosu bývá dosaženo při použití rozdílných fungicidů ve dvou termínech aplikace, a to 1. ve sloupkování (BBCH 32-37) a 2. v termínu těsně před metáním (BBCH 45-49) nebo koncem metání až začátkem kvetení (BBCH 59-65). Systém ochrany se dvěma fungicidy účinně oddaluje výskyt symptomů napadení RCC, významně zmírňuje intenzitu příznaků i při velmi silném infekčním tlaku a umožňuje ječmeni dozrát.

8. Rezistence ke strobilurinovým fungicidům

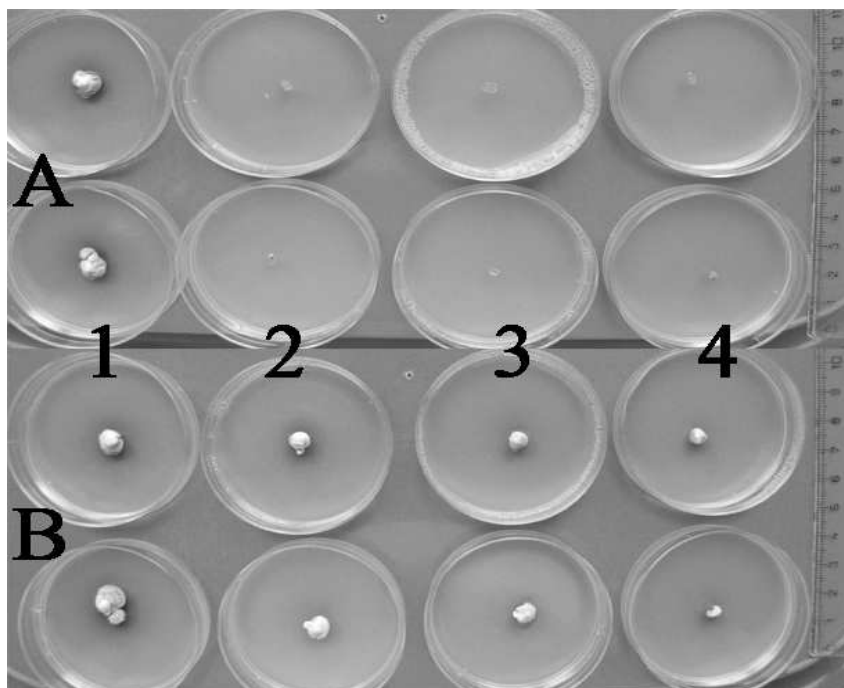
Strobiluriny vykazovaly v prvních letech po objevení se ramulárie skvrnitosti velmi dobrou účinnost, ovšem velmi brzy se u RCC vyvinula rezistence k fungicidům z této skupiny. U strobilurin-rezistentních izolátů RCC je přítomna bodová mutace mitochondriálního genu cytochromu b v kodonu 143 vedoucí ke změně aminokyseliny glycinu (GGT) na alanin (GCT) (Fountaine a Fraaije, 2009). Je to stejná mutace, která již byla dříve popsána u rezistentních populací patogenů např. *Blumeria graminis* a *Mycosphaerella graminicola* (Sierotzki *et al.*, 2000; Fraaije *et al.*, 2005). Na základě tohoto zjištění byl vyvinut CAPS marker k laboratorní detekci této mutace (Matusinsky *et al.*, 2010). Nejprve je nutno pomocí standardní PCR amplifikovat část cytochromu b a poté specifickou restriční endonukleázou tento úsek štěpit. PCR se provádí v reakčním objemu 20 µl obsahujícím 0.2 mM každého nukleotidu dNTP, 0.2 µM obou primerů (RCCcytoF- GGATGATTAATACGTTACTTACACTC a RCCcytoR- GTTACCTGATCCTGCGCTGT), 1 U Taq polymerázy, 2.5 mM MgCl₂, 1 x PCR pufr a 10 ng DNA izolované z mycelia monosporického izolátu RCC. 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 45 sec. a syntéza při 72 °C po dobu 2 min; závěrečná inkubace při 72 °C po dobu 5 min. Poté je 5 µl roztoku výsledného PCR produktu inkubováno spolu s 1 U restriční endonukleázy *AluI* (Fermentas, Lithuania; sequence: AG[^]CT) a 1x příslušným pufrem Tango (Fermentas) v celkovém objemu 20 µl po dobu 16 hodin při teplotě 37 °C. Výsledné fragmenty restriční analýzy jsou separovány metodou horizontální elektroforézy v 1.7 % agarózovém gelu.

Po PCR s primery RCCcytoF/R získáme amplikon o velikosti 406 bp. Tento amplikon je po inkubaci s restriční endonukleázou *AluI* u strobilurin-senzitivních izolátů RCC rozštěpen

na 3 fragmenty (249, 102 a 55 bp), zatímco u strobilurin-rezistentních izolátů je rozštěpen na 4 fragmenty (144, 105, 102 a 55 bp přičemž fragmenty 102 and 105 bp se na agarózovém gelu překrývají) (Obr. 9). Pro ověření správnosti výsledků je možno provést kultivační test s odstupňovanými koncentracemi azoxystrobinu (Obr. 10). Výše popsanou molekulární analýzou byly testovány monosporické izoláty RCC nasbírané v roce 2009 na území České republiky a bylo zjištěno, že mutovaná alela (A143 - nesou ji strobilurin rezistentní jedinci) se vyskytuje ve 47 % ze 302 analyzovaných izolátů.



Obr. 9 Fotografie gelu s CAPS markerem identifikujícím rezistentní (R) a senzitivní (S) izoláty RCC. M1- Ultra Low Range DNA Ladder, M2 -100 bp DNA velikostní standard



Obr. 10 Petriho misky s izolátem RCC senzitivním (A) a rezistentním (B) ke strobilurinům. Ve sloupcích jsou odstupňované koncentrace azoxystrobinu 1: 0.0 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (kontrola); 2: 2.0 $\mu\text{g.ml}^{-1}$; 3: 4.0 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ a 4: 8.0 $\mu\text{g.ml}^{-1}$

9. Závěr

Přestože je tomuto patogenu věnována velká pozornost, dosud se nepodařilo zodpovědět celou řadu důležitých otázek. Velkým přínosem je možnost včasné a přesné detekce pomocí metod PCR a real-time PCR. Důležitým úkolem výzkumu v nejbližších letech je nalezení odrůd tolerantních k RCC. Pro zmírnění škod způsobených ramuláriovou skvrnitostí lze v současnosti jako účinná opatření doporučit ošetřenou podmítku a včasnou zaorávku výdrolů po sklizni ječmene pro snížení infekčního tlaku a v oblastech s pravidelným silným výskytem choroby fungicidní ošetření ve dvou termínech aplikace. Jelikož však v ČR není prozatím registrován žádný fungicid přímo proti ramuláriové skvrnitosti, lze k ošetření porostu v příslušných růstových fázích doporučit ty fungicidy registrované do ječmene proti jiným listovým chorobám, které navíc vykazují vedlejší účinnost proti této chorobě.

10. Srovnání „novosti postupů“

Metodika optimalizuje využití molekulární detekce RCC pomocí standardní PCR, což umožňuje přesnou a citlivou diagnostiku. Dále zavádí postup kvantifikace DNA *Ramularia collo-cygni* ve tkáních ječmene. Metodika dále přináší postup detekce strobilurin-rezistentních izolátů RCC. Varianty fungicidní ochrany jsou navrženy pro pěstební systémy v českých podmínkách s přípravky registrovanými v ČR. Tyto přípravky jsou sice v ČR registrované do ječmene proti jiným listovým chorobám, než je ramuláriová skvrnitost (proti ní není zatím registrován žádný fungicid), ale v pokusech vykazaly jistou vedlejší účinnost proti této chorobě.

11. Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika přibližuje problematiku detekce RCC a ochrany proti ramuláriové skvrnitosti českým pěstitelům, zemědělským poradcům, studentům a zájemcům o tuto zajímavou chorobu. Zprostředkovaně může sloužit i šlechtitelům.

12. Ekonomické aspekty

Přesná a včasná diagnostika patogena má klíčový význam při volbě vhodné strategie ochrany zemědělských plodin. Hospodářská škodlivost choroby je odhadována na 15 – 25 % snížení výnosu. Škody jsou obvykle u ramulárie skvrnitosti hodnoceny jako střední až lokálně velmi silné. Při včasné a správné diagnostice je proveden cílený zásah vhodným fungicidem v optimálním termínu, čímž se eliminují škody, které by vznikly v důsledku napadení ramuláriovou skvrnitostí.

13. Seznam použité literatury

- Cromey MG, Harvey IC, Sheridan EJ, Grbavag N, 2004. Occurrence, importance and control of *Ramularia collo-cygni* in New Zealand. In: Yahyaoui AH, Brader L, Tekauz A, Wallwork H & Steffenson B (Eds.) 2002. Proceedings of the Second International Workshop on Barley Leaf Blights, 7–11 April 2002, Aleppo, Syria, ICARDA, 337-342.
- Fraaije BA, Cools HJ, Fountaine J, Lovell DJ, Motteram J, West JS & Lucas JA, 2005. Role of ascospores in further spread of QoI-resistant cytochrome b alleles (G143A) in field populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* 95, 933-941.
- Frei P, Gindro K, Richter H, Schürch S, 2007. Direct-PCR detection and epidemiology of *Ramularia collo-cygni* associated with barley necrotic leaf spots. *J. Phytopathology* 155, 281-288.
- Fountaine J, Fraaije BA, 2009. Development of QoI resistant alleles in populations of *Ramularia collo-cygni*. In: Oxley S, Brown J, Foster VV, Havis N (Eds.) 2009. The Second European *Ramularia* Workshop. 7–8 April, 2009, Edinburgh, Scotland. *Aspect Appl Biol* 92, 123-126.
- Gubiš J, Hudcovicová M, Leišová-Svobodová L, Matušinsky P, 2010. Sonda a primery pro kvantifikaci patogena *Ramularia collo-cygni* v pletivech ječmene. Užitený vzor č. 20883, den zápisu 10.5.2010. Úřad průmyslového vlastnictví, Česká republika.
- Havis ND, Oxley SJP, Piper SR, Langrell SRH, 2006. Rapid nested PCR-based detection of *Ramularia collo-cygni* direct from barley. *FEMS Microbiol Lett* 256, 217-223.
- Huss H, Mayerhofer H, Wetching W, 1987. *Ophiocladium hordei* CAV. (Fungi imperfecti), ein für Österreich neuer parasitärer Pilz der Gerste. *Der Pflanzenarzt* 40, 167-169.

- Matusinsky P, Leisova-Svobodová L, Marik P, Tvaruzek L, Stemberkova L, Hanusova M, Minarikova V, Vysohlidova M, Spitzer T, 2010. Frequency of a mutant allele of cytochrome b conferring resistance to QoI fungicides in the Czech population of *Ramularia collo-cygni*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 117 , 248–252.
- Oxley S, Havis N, 2009. *Understanding Ramularia collo-cygni* in the past, present and future. In: Oxley S, Brown J, Foster V V & Havis N (Eds.) 2009. The Second European Ramularia Workshop. 7–8 April, 2009, Edinburgh, Scotland. *Aspect Appl Biol* 92, 123-126.
- Salamati S, Reitan L, 2006. *Ramularia collo-cygni* on spring barley, an overview of its biology and epidemiology. In: Koopman B, Oxley S, Schützendübel A, von Tiedemann A, (Eds.) 2006. Proceedings of the First European Ramularia Workshop, Georg-August University Göttingen, Germany, March 2006, 19-35.
- Sierotzki H, Wulschleger J, Gisi U, 2000. Point-mutation in cytochrome b gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici* field isolates. *Pestic. Biochem. Phys.* 68, 107-112.
- Sutton BC, Waller JM, 1988. Taxonomy of *Ophiocladium hordei*, causing leaf lesions on *Triticale* and other *Gramineae*. *Trans Br Mycol Soc* 90, 55-61.
- Tsöpe O, Sachs E, 2001. Farbstoffbildung von *Ramularia collo - cygni* Sutton and Waller als Grundlage für eine Schnell diagnose. *Nachrichtenblatt Deutschen Pflanzenschutzdienstes*, 53, 161 – 164.

14. Seznam publikací, které předcházely metodice

- Gubiš J, Hudcovicová M, Leišová-Svobodová L, Matusinsky P, 2010. Sonda a primery pro kvantifikaci patogena *Ramularia collo-cygni* v pletivech ječmene. Užitený vzor č. 20883, den zápisu 10.5.2010. Úřad průmyslového vlastnictví, Česká republika.
- Gubiš J, Hudcovicová M, Leišová-Svobodová L, Matusinsky P, 2010. Diagnostic laboratory test for *Ramularia collo-cygni* in barley tissue. Sborník ze 17. konference Nové poznatky z genetiky a šlechtění polnohospodářských rostlin. 26.-27.10.2010, Piešťany, 104-105.
- Leišová-Svobodová L, Minaříkova V, Matusinsky P, Mařík P, 2010. Endofytická tmavohnědá skvrnitost ječmene. Úroda 11, 10-12.
- Mařík P, Šnejdar Z, Matušinsky P, 2011. Expression of resistance to *Ramularia* leaf spot in winter barley cultivars grown in conditions of the Czech Republic. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 47 (1), 37-40.
- Matusinsky P, Marik P, Stemberkova L, Hanusova M, Minaříkova V, 2010. Resistance of spring barley varieties to *Ramularia* leaf spot in the Czech Republic. Proceedings of the 13th Congress of the Med. Phytopathol. Union (MPU), 20.-25.6.2010, Roma, 594-595.
- Matusinsky P, Leisova-Svobodová L, Marik P, Tvaruzek L, Stemberkova L, Hanusova M, Minarikova V, Vysohlidova M, Spitzer T, 2010. Frequency of a mutant allele of cytochrome b conferring resistance to QoI fungicides in the Czech population of *Ramularia collo-cygni*. Journal of Plant Diseases and Protection, 117 (6), 248-252.
- Matusinsky P, 2009. Předání kmenů *Ramularia collo-cygni* do Sbírky fytopatogenních hub a referenčních protilátek VURV, v.v.i. Praha Ruzyně.
- Vysohlídková M, Tvarůžek L, Matusinsky P, Polišenská I, 2009. Hodnocení výskytu listových a klasových chorob jarního ječmene na lokalitě Kroměříž v roce 2009. Obilnářské listy 4, 107-109.