

AGRITEC PLANT RESEARCH s.r.o.

Zemědělská 2520/16, 787 01 Šumperk



OPTIMALIZOVANÁ METODIKA MOLEKULÁRNÍ DETEKCE VÝZNAMNÝCH PATOGENŮ ŘEPKY OZIMÉ *VERTICILLIUM SPP.* A *LEPTOSPHAERIA MACULANS*

Autoři:
Mgr. Jiří Horáček, Ph.D.
Ing. Jana Poslušná

2012

OPTIMALIZOVANÁ METODIKA MOLEKULÁRNÍ DETEKCE VÝZNAMNÝCH PATOGENŮ ŘEPKY OZIMÉ *VERTICILLIUM SPP.* A *LEPTOSPHAERIA MACULANS*

Metodika vypracovaná jako výstup projektu QI111A075.

Jiří Horáček, Jana Poslušná
horacek@agritec.cz, poslusna@agritec.cz

Vydal Agritec Plant Research s. r. o. v nakladatelství AGRITEC, výzkum, šlechtění
a služby, s. r. o. Šumperk
www.agritec.cz

Oponenti:

Ing. Pavel Kraus, Ph.D.
ÚKZÚZ Brno, Národní odrůdový úřad, oddělení fytopatologie
Hroznová 2, 656 06, Brno

Ing. Josef Patzak, Ph.D.
Chmelařský institut s.r.o.
Kadaňská 2525, 438 46, Žatec

Certifikaci provedl:

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Hroznová 2, 656 06, Brno

© AGRITEC PLANT RESEARCH, s.r.o., Šumperk 2012.

Tato publikace nesmí být přetiskována vcelku ani po částech, uchovávána v médiích, přenášena nebo uváděna do oběhu pomocí elektronických, mechanických, fotografických či jiných prostředků bez uvedení osoby, která má k publikaci práva podle autorského zákona nebo bez jejího výslovného souhlasu. S případnými náměty na jakékoliv změny nebo úpravy se obraťte písemně na osobu uvedenou výše.

ISBN: 978-80-87360-11-8

Obsah

1. CÍL METODIKY	4
2. POPIS METODIKY.....	4
2.1.1. Úvod: choroby způsobené patogeny <i>Leptosphaeria maculans</i> a <i>Verticillium spp.</i> .	4
2.1.2. Fomová hniloba brukvovitých	4
2.1.3. Verticiliové vadnutí.....	6
2.2. MOLEKULÁRNÍ DETEKCE HUB <i>VERTICILLIUM SPP.</i> A <i>LEPTOSPHAERIA MACULANS</i>	8
3. MATERIÁL A METODY	9
3.1. PŘÍSTROJE A POMŮCKY	9
3.2. CHEMIKÁLIE.....	9
3.2.1. Chemikálie pro izolaci DNA.....	9
3.2.2. Chemikálie pro PCR.....	9
3.2.3. Chemikálie pro elektroforézu.....	10
3.3. PŘÍPRAVA ROZTOKŮ A PUFRŮ.....	10
3.4. ROSTLINNÝ MATERIÁL A HOMOGENIZACE VZORKU.....	10
3.5. IZOLACE GENOMOVÉ DNA.....	10
3.5.1. Izolace genomové DNA metodou CTAB/chloroform	10
3.5.2. Izolace genomové DNA pomocí kitu Invisorb Spin Plant Kit (Invitex, Německo) – postupuje se dle přiloženého protokolu od výrobce.	11
3.6. PCR	11
3.7. ELEKTROFORÉZA, FOTODOKUMENTACE	12
3.8. VYHODNOCENÍ ANALÝZY A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ.....	13
4. PROTOKOL O ZKOUŠCE	13
5. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ.....	13
6. ZÁVĚR – POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	13
7. EKONOMICKÉ ASPEKTY	13
8. DEDIKACE.....	14
9. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	14
10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	14

Abstrakt:

Metoda využití molekulárních markerů pro diagnostiku houbových chorob řepky byla optimalizována na izolátech hub *Verticillium dahliae*, *Verticillium longisporum* a *Leptosphaeria maculans*. Byly nalezeny markery umožňující spolehlivou identifikaci a odlišení těchto patogenů.

Abstract:

The method of winter rape fungal pathogen diagnostics using molecular markers was optimized on isolates of *Verticillium dahliae*, *Verticillium longisporum* a *Leptosphaeria maculans*. Specific markers were found, that enable positive identification and differentiation of target pathogens.

1. CÍL METODIKY

Cílem metodiky je aplikace poznatků molekulární biologie pro rychlou a spolehlivou detekci a vzájemné odlišení vybraných významných houbových patogenů ozimé řepky *Verticillium spp.* a *Leptosphaeria maculans*, ať již v časných fázích vývoje řepky, kdy projevy chorob nejsou ještě evidentní, či v pozdních fázích, kdy dochází k deformaci kořenů a nouzovému zrání.

2. POPIS METODIKY

2.1.1. Úvod: choroby způsobené patogeny *Leptosphaeria maculans* a *Verticillium spp.*

2.1.2. Fomová hniloba brukvovitých

Fomová hniloba brukvovitých je nejvýznamnější chorobou řepky olejky pěstované v ČR (Plachká a Odstrčilová, 2008). Fomová hniloba je nejběžněji používaný název onemocnění, ale setkáme se i s termíny jako je suchá hniloba stonku, rakovina stonku (Rimmer et al., 2007). Způsobuje ji komplex askomycetních hub *Leptosphaeria maculans* (Desmaz.) Ces. & De Not. (1863) a *Leptosphaeria biglobosa* n. sp. s imperfektním stádiem *Phoma lingam* (Tode.) Desm. (1849) (Rouxel and Balesdent, 2005; Mazáková et al. 2010). Na základě studia různých charakteristik *L. maculans* byl tento patogen rozdělen do dvou skupin. První skupina A, Tox+, vysoce virulentní – způsobuje vážnější poškození stonku a kořenů. Druhá skupina B, Tox0 způsobuje méně škodlivé léze (Rouxel et al. 2004). Na základě morfologických rozdílů pseudoperithecia byl pak rozlišen druh *L. biglobosa* (Shoemaker and Brun, 2001).

V současné době je *L. maculans* řazena do třídy *Dothideomycetes*, řád *Peronosporales* (Rimmer et al. 2007; Rouxel and Balesdent, 2005). *L. maculans* je vřeckatá houba, plodničky pohlavního stadia nazýváme pseudoperithecia a plodničky nepohlavního stadia – pyknidy (Kazda a kol., 2010). Pyknidy dělíme do dvou typů dle výskytu, a to buď na živé tkáni hostitelské rostliny, nebo na infikovaných rostlinných zbytcích. Pyknospory jsou hyalinní, obvykle rovné, válečkovité, uprostřed zaškrčené, jednobuněčné v rozsahu od 2,5 – 5 x 1 – 2 μm (Rimmer et al. 2007). Pseudoperithecia s pseudosklerenchymatickými stěnami, se vyskytují na zbytcích napadených rostlin, tkáň hostitelské rostliny kolem černá. Pseudoperithecia jsou vnořená černá kulovitá, 300 – 500 μm velká. Uvnitř pseudoperithecií dozrávají askospory. Šesti přehrádkovaná vřecka

obsahují 8 výtrusů. Askospory jsou hyalinní, protáhlé (Kazda a kol., 2010), o velikosti 35 – 70 x 5 – 8 µm (Chadová, 2006).

Fomová hniloba napadá kulturní rostliny brukvovitých (řepka olejka, řepice, hořčice, některé druhy zeleniny, tuřín, brukev zelná a zelí). Během dalších studií byla za hostitele označena dále ředkev *Raphanus sativus*, divoká ředkev *R. rapstrum*, bílá hořčice *Sinapis alba* a rukola *Eruca vesicaria* spp. *sativa*. I rostliny jiných čeledí mohou být hostiteli pro *Leptosphaeria maculans*, jedná se o např. *Phaseolus* spp. (*Fabaceae*), *Humulus* spp. (*Moraceae*), *Swertia perennis* (*Gentianaceae*), *Teucrium* spp. (*Labiatae*) a *Artemisia campestris* (*Asteraceae*) (Rouxel and Balesdent, 2005). Patogen napadá i plevelné druhy (*Lobularia* spp., *Matthiola* spp., *Raphanus* spp., *Thlaspi arvense*, *Sinapis arvensis*, *Descurainia* spp., *Sisymbrium* spp.) (Rimmer et al. 2007; Chadová, 2006).

Zdrojem infekce bývá včas nelikvidovaný výdrol řepky rostoucí v sousedství nově založených porostů (Šaroun, 2009). Příčinou podzimní infekce jsou nálety askospor uvolňované z plodnic, které se vytvářejí na posklizňových zbytcích, případně infikované osivo (Häni a kol., 1993). Na rostlinných zbytcích *L. maculans* přežívá jako saprofyt (Rouxel and Balesdent, 2005; Plachká a Odstrčilová, 2008) buď ve formě pyknid (anamorfa *Phoma lingam*), nebo ve formě pseudoperithecií (telemorfa *L. maculans*) (Bittner, 2006).

Životní cyklus patogena začíná na podzim, kdy z posklizňových zbytků se při určité teplotě a zejména dostatečné vlhkosti uvolňují z pseudoperithecií askospory patogena (Poslušná a Plachká, 2009). Pohlavně vzniklé askospory mohou být šířeny i na velké vzdálenosti až několika kilometrů (Rimmer et al. 2007). Askospory pak napadají vzešlé rostlinky. Při vhodné vlhkosti začínají askospory klíčit a hyfy prorůstají do pletiva řepky (Poslušná a Plachká, 2009). Spora klíčí a infekční hyfa proniká přes stomata či poraněné pletivo do tkání řepky – nekrotrofní fáze (Rouxel and Balesdent, 2005). Dále houba přechází do biotrofní fáze. Mycelium prorůstá cévními svazky přes řapík do stonků (Rimmer et al. 2007). Tato vývojová fáze je zcela bezpříznaková, houba roste v mezibuněčných prostorech. (Rouxel and Balesdent, 2005).

Patogen se šíří z míst primárního napadení do celé rostliny. Zřetelné symptomy choroby jsou na podzim viditelné zejména na listech (Poslušná a Plachká, 2009), kde se na listech tvoří světlé skvrny, často okrouhlého (Plachká a Odstrčilová, 2008) někdy i nepravidelného tvaru. Později jsou tyto skvrny šedě zbarvené a nekrotické. Obvykle mají tmavé ohraničení. Ve středu lézí jsou dobře viditelné černé tečky – pyknidy a pletivo se v těchto místech trhá (Rimmer et al. 2007). Z pyknid se uvolňují konidie, které se šíří dále do porostu (Poslušná a Plachká, 2009). Ty jsou rozstříkovány kapkami deště na krátké vzdálenosti. Toto sekundární napadení však nemá tak velký význam v životním cyklu patogena (Rimmer et al. 2007; Rouxel and Balesdent, 2005). Při silném infekčním tlaku lze již na podzim potvrdit infekci patogenem rozříznutím kořene, kdy napadené pletivo je typicky načernalé z důvodu rozšiřující se nekrózy, která může být pozorovatelná i vně kořene a kořenového krčku. Takto poškozené rostliny špatně přezimují a dochází často k jejich hnití a odumírání. Pro šíření patogena v rostlině je důležitá teplota. Patogen je aktivní od 5 °C, při nižší teplotě se jeho aktivita výrazně zpomaluje, až úplně ustává. Na jaře se patogen v rostlině šíří jejím růstem. Po odkvětu ve fázi tvorby šesulí (BBCH 75 – 85), začínají být pozorovatelné symptomy na stoncích a kořenech. Ve středech skvrn se vytvářejí černé tečky s pohlavním stadiem patogena (pseudoperithecia). Kořeny a kořenové krčky rostlin trouchnivějí a po rozříznutí jsou patrné znaky nekrotických, na kterých je možné také pozorovat plodničky patogena (Poslušná a Plachká, 2009).

Největší intenzita poškození se projevuje před sklizní ve druhém roce pěstování. Pro suchou hnilobu jsou typické hluboké nekrózy a výskyt pyknid. Dochází k hloubkovému poškození stonků a kořenů. Tyto projevy jsou příčinou předčasného dozrávání řepky a velkých ztrát na výnosu (Plachká a Odstrčilová, 2008). Na konci

vegetačního období způsobuje choroba poškození pletiv, které vede k poléhání rostlin a snížení výnosů (Rouxel and Balesdent, 2005). Ztráty na výnosech způsobené původci fómové hniloby v ČR jsou do 20 %, v zahraničí až 50 % (Plachká a Odstrčilová, 2008). Fómová hniloba negativně ovlivňuje nasazování šešulí a nouzovým dozráváním snižuje hmotnost tisíce semen (HTS) a množství nasazeného semene. Při silném napadení mladých rostlin může docházet i k likvidaci celého porostu (Gall, 2011). Nejzávažnější škody vznikají, pokud časně napadený porost není ošetřen fungicidy (Gall, 2011).

2.1.3. Verticiliové vadnutí

Verticiliové vadnutí (*Verticillium dahliae* Kleb. a *V. longisporum* (Stark) Karapapa, Bainbridge & Heale) je další škodlivé onemocnění řepky olejky (Mazáková et al. 2008). Verticiliové vadnutí je ovšem chorobou, o které se málo ví. Její škodlivý potenciál je velmi vysoký. Redukce výnosu může dosahovat 25 až 50 %, jak bylo zjištěno z výskytů na polích v severním Německu (Spitzer, 2010; Kulovaná, 2011). Předpokládalo se, že i v našich podmínkách se patogen vyskytuje poměrně často, ale zůstává často nerozpoznán, nebo je překryt jinými chorobami. Monitoring provedený v letech 2006 – 2009 ve spolupráci s SPZO a univerzitou v Göttingenu v Německu ukázal, že se choroba na našem území vyskytuje. Silná napadení byla přitom zjištěna v podnicích s vysokým zastoupením řepky v osevním postupu (Spitzer, 2010). *Verticillium spp.* patří mezi půdou přenosné rostlinné patogeny odpovědné za verticiliové vadnutí v mírných a subtropických pásmech (Johansson, 2006; Gómez-Alpizar, 2001). Společně napadají na 250 hostitelů, zahrnující ekonomicky důležité plodiny a stromy. Speciálně 2 druhy *Verticillium dahliae* a *V. albo-atrum* napadají vysoký počet hostitelských druhů. *V. longisporum* má více zúžený hostitelský prostor, ale přispívá zejména k verticiliovému vadnutí olejnin ve Švédsku (Johansson, 2006).

Verticillium patří třídy *Deuteromycetes (Fungi Imperfecti)*, skupiny hub, u kterých není známé pohlavní stádium (Berlanger and Powelson, 2000). *V. dahliae* má širokou řadu hostitelů. Více než 300 druhů dřevin a bylin je známo svou citlivostí k *V. dahliae* včetně rajčat, lilku, paprik, bramboru, máty peprné, chryzantém, bavlny, aster, ovocných stromů, jahod, malin, růží, vojtěšky, javoru a dalších. Odolné rostliny zahrnují všechny jednoděložné, všechny nahosemenné, jabloně, horský jasan, buk, břízy, dřín, břestovec, hloh, lípu, dřezovec, duby, javor, topol, ořech a vrby (Gómez-Alpizar, 2001). *Verticillium* dále napadá některé křoviny (fuchsie, šeřík, škumpa, vřes aj.), okrasné rostliny, zeleninu (zelí, celer, ředkev, pepř, rebarbora aj.), ovocné druhy (gřep, dříví, rybíz, ostružiník, *Prunus sp.*, vodní meloun aj.), plevely (pampeliška, pelyněk, laskavec aj.), polní plodiny (jetel, chmel, řepka olejka, světlice barviřská aj.), nenapadá např. kaktusy a kapradiny (Berlanger and Powelson, 2000).

V. longisporum je úzce příbuzný druh s *V. dahliae*. Diferenciace izolátů *Verticillia* s dlouhými výtrusy získaných z křenu, klasifikované jako *Verticillium dahliae* var. *longisporum*, byla poprvé provedena v 60. letech minulého století. Až podrobné popisy různých morfologických, fyziologických a molekulárních znaků vedly k tvrzení o upravení *V. longisporum* jako samostatného druhu. Nicméně se stále vedli diskuze o taxonomii *V. longisporum* jako samostatného hostitelsky specifického druhu *Verticillia*. Bylo prokázáno, že košťálové plodiny mohou být příležitostně infikovány izoláty *Verticillia* s krátkými výtrusy a *V. longisporum* je schopno infikovat rostlinné druhy i mimo čeleď brukvovitých (Tiedemann, 2012). Molekulární důkazy naznačují, že *V. longisporum* je allopolyploid, případně mezi *V. dahliae* a druhem příbuzným s *V. albo-atrum*. *Verticillium longisporum* je příčinou verticiliového vadnutí řepky a vážnou chorobou v Evropě. I když je *V. dahliae* občas izolované z řepky olejky, jen *V. longisporum* je schopno způsobit onemocnění. U hub existuje jen omezený počet příkladů přirozených hybridních patogenů se zvýšenou virulencí a rozšířeným spektrem hostitelů. Patří mezi ně *Melampsora x Columbiana* G.

Newc., Kříženec mezi *M. medusae* a *M. occidentalis*, která se stala dominantní rzí na hybridním topolu *Populus trichocarpa* x *P. deltoides* na pacifickém severozápadě v roce 1998, stejně jako *V. longisporum*, patogen čeledi brukvovitých (Inderbitzin et al., 2011).

V. longisporum je adaptabilní, diploidní, patogen cévních svazků řepky olejky (*Brassica napus* L. spp. *oleifera*). V dřívějších studiích byla sledována hostitelská specifická *V. longisporum* versus *V. dahliae* a byla nalezena jasná omezení *V. dahliae* k ne-brukvovitým hostitelům, zatímco *V. longisporum* byl patogenní pouze k brukvovitým druhům. Oba druhy mají tedy nepřekrývající se rozsah hostitelů (Zeise and Tiedemann, 2001, 2002). To potvrzuje i Spitzer (2010) i Johansson (2006), kdy bylo zjištěno, že *Verticillium dahliae* se vyskytuje na bramborách, leguminózách, jahodách atd., zatímco druh, který působí problémy na ozimé řepce (křížokvětých) je *Verticillium longisporum*.

Za normálních podmínek je mycelium *Verticillium dahliae* hyalinní, jednoduché nebo větvené, přehrádkovité a mnohoaderné (Johansson, 2006). Jádra jsou v kulturách haploidní. Konidie jsou vejcovité nebo elipsoidní a obvykle jednobuněčné. Jsou nesena na phialidech, což jsou specializované hyfy vytvářené v přeslenu kolem každého konidioforu. Každý phialid nese množství konidií. *Verticillium* je pojmenováno podle přeslenovitého uspořádání phialidů na konidioforu. Houba tvoří mikrosklerocia v odumírající tkáni, což jsou masy melanizujících hyf (Berlanger and Powelson, 2000; Gómez-Alpízar, 2001). Mikrosklerocia jsou malé, černé, tlustostěnné struktury, které se tvoří v odumírající nebo v živé tkáni. Často jsou vidět lupou. Ve většině případů se mikrosklerocia formují na stárnoucím pletivu, u některých hostitelů je nacházíme ale také i v živé tkáni (Berlanger and Powelson, 2000). Tyto mikrosklerocia se uvolňují při sklizni a mohou zůstat v půdě jako zdroj infekce pro následné plodiny na mnoho let (Matthews–Berry, 2007).

Verticillium spp. se přirozeně vyskytuje v nízkém množství v půdě a roste lépe při mírně vyšších teplotách kolem 21 – 28 °C. Houba může přezimovat jako mycelium na trvalkách, na rostlinných zbytcích či jiných rostlinných partiích (Berlanger and Powelson, 2000; Gómez-Alpízar, 2001).

Monocyklický životní cyklus *Verticillia* můžeme rozdělit do dvou fází. Během ranějších fáze onemocnění se patogen se projevuje uvnitř vodivých pletiv jako endofyt a v pozdějších fázích onemocnění, kdy se v důsledku stárnutí pletiv rostliny tvoří mikrosklerocia, nastává semi-nekrotrofní fáze (Johansson, 2006).

Klíčivost mikrosklerocií v půdě je stimulována kořenovými výměšky hostitele (Johansson, 2006; Gómez-Alpízar, 2001). Byl porovnáván průběh infekce *V. longisporum* a *V. dahliae* u olejnin. *V. longisporum* kolonizoval olejninu skrz laterální kořeny a kořenové vlásky, kdežto *V. dahliae* kolonizoval rostlinu přes primární kořeny. V době zrání rostlin *V. longisporum* byl nacházen v rostlině, v kořenech a také stoncích a listech. Oproti *V. dahliae* byl přítomen v 67 % případů pouze v kořenech a spodním stonku (Johansson, 2006).

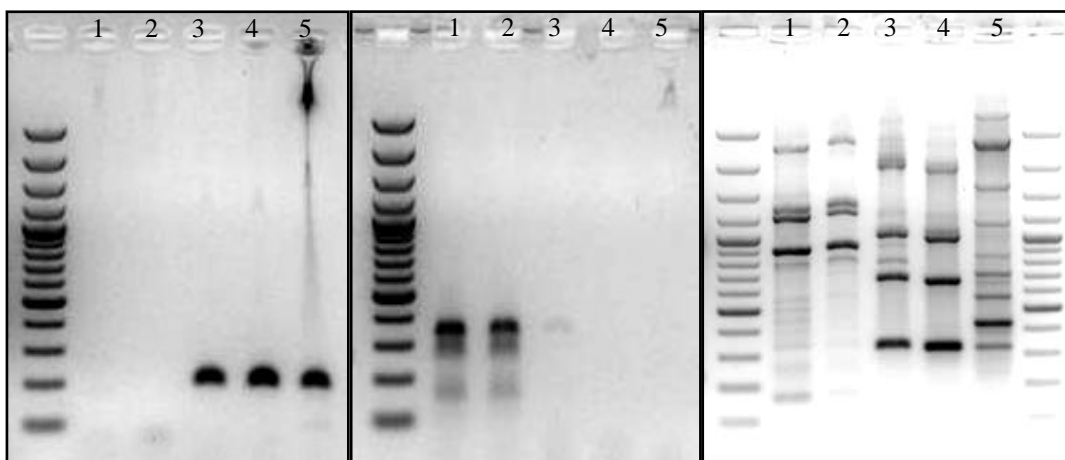
Mikrosklerocia klíčí za vhodných podmínek v mycelium, které napadá kořeny řepky a houba se systémově šíří xylémem rostlinou. Další možnost napadení existuje z mycelia a konidií vytvářejících se na napadených zbytcích rostlin. K napadení kořenů rostlin může dojít již na podzim, ale první vizuální příznaky napadení jsou zřetelné až pozdě na jaře či brzy v létě. Na počátku kvetení lze na listech pozorovat žloutnutí a posléze vadnutí a zaschnutí poloviny listu podél hlavní listové žilky. Na hlavním stonku se tvoří podélně dlouhé vodově zelené, později žloutnoucí a hnědnoucí pruhy, zatímco vedlejší pletivo je zcela bez napadení. Z hlavního stonku může napadení přecházet na vedlejší větve. Napadené pletivo na stonku je mírně propadlé a je zřetelně ohraničené od zdravého pletiva. Napadené rostliny řepky předčasně dozrávají či nedozrají vůbec. Báze stonku a kořeny napadených rostlin bývají uvnitř zbarveny tmavošedě až černě. Houba vytváří v místech napadení černá mikrosklerocia podobná železnému prášku, která vystupují na povrch a pokrývají pokožku. (Kulovaná, 2001)

Příznaky verticiliového vadnutí se liší v závislosti na hostiteli (Gómez-Alpizar, 2001). *Verticillium* způsobuje specifické příznaky a plodnice produkuje hojné množství mikrosklerocií vyvinutých na stonku a kořenech postižených chorobou (Mazáková et al., 2008). Předčasné listové chlorózy a nekrózy, hnědé zbarvení a pruhování cévního systému jsou charakteristické pro všechny hostitele. Příznaky vadnutí jsou nejvíce patrné v teplých, slunečných dnech (Gómez-Alpizar, 2001). Na rozdíl od jiných nemocí způsobených druhem *Verticillium*, *V. longisporum* nevyvolává vadnutí, ale předčasné stárnutí a zrání, které může značně snížit výnosy (Tiedemann, 2012).

2.2. Molekulární detekce hub *Verticillium spp. a Leptosphaeria maculans*

Příznaky způsobené houbami (*L. maculans*, *L. biglobosa*, *V. dahliae*, *V. longisporum*) pozorované zejména na stonku a kořenu jsou podobné a snadno zaměnitelné. Pomocí metod molekulární biologie a s využitím specifických markerů však lze houbové patogeny jednoznačně identifikovat a odlišit a to již v ranných fázích vývoje rostliny, kdy napadení patogenem nemusí být očividné.

V odborné literatuře byly nalezeny primerové sekvence, vhodné pro detekci houbových patogenů řepky (Hayden et al. 2007, Steventon et al. 2002, Jedryczka et al. 1999). Dále byly získány čisté izoláty hub *Verticillium dahliae*, *Verticillium longisporum* a různé rasy houby *Leptosphaeria maculans*. Bylo zjištěno, že primery VD specificky detekují *Verticillium dahliae* i *Verticillium longisporum* a u vzorků všech ras *Leptosphaeria* je výsledek negativní. Primery LEMA naopak specificky detekují všechny rasy *Leptosphaeria maculans* a negativní výsledek poskytují u vzorků *Verticillia*. Primery ERIC jsou polymorfní a poskytují odlišná spektra pro jednotlivé rasy *Leptosphaeria maculans*, a také pro odlišná spektra pro vzorky *Verticillia*.



Obr. 1: Detekce *Leptosphaeria maculans* (markery LEMA, obrázek vlevo), detekce *Verticillia* (markery VD, obrázek uprostřed), odlišení *Leptosphaeria maculans* (různých ras) a *Verticillia* (marker ERIC, obrázek napravo). Jednotlivé vzorky tvoří čisté izoláty hub (1-*Verticillium dahliae*, 2-*Verticillium longisporum*, 3,4,5 *Leptosphaeria maculans* – různé rasy).

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Přístroje a pomůcky

- Termocykler pro PCR.
- Centrifuga na mikrozkušavky 1,5 ml.
- Analytické váhy.
- Zařízení pro horizontální elektroforézu.
- Zdroj stejnosměrného proudu pro elektroforézu.
- Třepačka typu vortex.
- Termoblok s nastavitelnou teplotou (55-65 °C).
- Mikrovlnná trouba na přípravu agarozového gelu.
- Zařízení na fotodokumentaci gelů (transluminátor + fotoaparát).
- Automatické pipety s nastavitelným objemem.
- Spotřební plasty (mikrozkušavky 1,5ml, mikrohomogenizátory, pipetovací špičky).
- Stojan na zkumavky.
- Rukavice.

3.2. Chemikálie

Všechny použité chemikálie jsou čistoty *p.a.* nebo označené jako vhodné pro molekulární biologii. Pro přípravu pufrů se používá destilovaná nebo demineralizovaná voda, pro přípravu roztoků pro PCR a pro izolaci DNA se používá sterilní demineralizovaná voda.

3.2.1. Chemikálie pro izolaci DNA

- | | |
|-------------------------------------|------|
| • Tris(hydroxymethyl) aminomethan. | TRIS |
| • Chlorid sodný. | NaCl |
| • Kys. ethylendiamintetraoctová. | EDTA |
| • Hexadecyltrimethylamonium bromid. | CTAB |
| • Polyvinylpyrolidon. | PVP |
| • Merkaptoethanol. | ME |
| • Chloroform. | |
| • Ethanol 75%. | |
| • Isopropanol. | |

3.2.2. Chemikálie pro PCR

- Termostabilní Taq DNA polymeráza (např. Biotools).
- Směs nukleotidů dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP).
- 10x koncentrovaný pufr pro PCR (dle typu polymerázy).
- Primery – viz tabulka č. 4.

3.2.3. Chemikálie pro elektroforézu

- Agaróza pro elektroforézu (např. Agarose Molecular grade, BIOLINE).
- TRIS báze.
- Kyselina octová.
- Ethidium bromid.
- Marker pro určení velikosti DNA fragmentů na gelu (100bp DNA Ladder, Fermentas).

3.3. Příprava roztoků a pufrů

Tabulka 1

Roztok	Složky	Množství	Poznámka
Extrakční pufr s CTAB pro izolaci DNA	TRIS báze	18,6 g	Upravit pH na 8,0 pomocí HCl, doplnit vodou do 500 ml. Před použitím přidat ME (40 µl / 100 ml roztoku).
	CTAB	10 g	
	EDTA	3,7 g	
	NaCl	40,9 g	
	PVP	5 g	
voda	400 ml		
Pufr 1xTE	TRIS báze	1,21 g	Upravit pH na 8,0 pomocí HCl a doplnit vodou do 1L.
	EDTA	0,37 g	
	voda	900 ml	
Pufr 50xTAE	TRIS báze	242 g	Doplnit vodou do 1L, pH roztoku je 8,0.
	kyselina octová	57,1 ml	
	EDTA	18,6 g	
	voda	900 ml	

3.4. Rostlinný materiál a homogenizace vzorku.

Pro detekce houbových patogenů *Verticillia* a *Leptosphaeria* jsou využívány vzorky napadených listů (čerstvé či zamražené) nebo vzorky napadených stonků a kořenů ozimé řepky. Stonky a kořeny jsou homogenizovány pomocí střížného mlýnku Retsch a vzorky šrotu jsou poté odebírány do mikrozkušavek, vzorky listů jsou homogenizovány přímo v mikrozkušavkách pomocí plastového mikrohomogenizátoru. V případě mletí stonků a kořenů je třeba mlýnek mezi jednotlivými vzorky důkladně čistit, aby se zabránilo vzájemné kontaminaci mezi vzorky.

3.5. Izolace genomové DNA

3.5.1. Izolace genomové DNA metodou CTAB/chloroform

1. Paralelně se provádí příprava 12 – 30 vzorků dle kapacity centrifugy. Do mikrozkušavek se vloží 50 – 100 mg rostlinného materiálu, přidá se 500 µl extrakčního pufru s CTAB a provede se homogenizace (v případě šrotu se provádí pouze lyze).
2. Obsah zkumavek se promíchá na vortexu a vloží do vyhřívaného termobloku na 65 °C. Extrakce probíhá 60 min za občasného promíchání na vortexu.
3. Zkumavky se vyjmou z termobloku, po vychladnutí se k extraktu přidá 500 µl chloroformu. Směs se důkladně promíchá na vortexu a provede se centrifugace 15 min/12 000 rpm.
4. Horní vodná fáze (300 µl) se odpipetuje do nové mikrozkušavky. Přidá se 150 µl 5M NaCl a 300 µl isopropanolu. Obsah zkumavky se lehce promíchá otočením.

Provede se centrifugace 15 min/12 000 rpm. Vysrážená DNA vytváří bílou usazeninu na dně mikrozkušavky.

5. Provede se opatrná dekantace supernatantu, sediment zůstává ve zkumavce.
6. K sedimentu DNA se přidá 500 µl 75% ethanolu, obsah se promíchá na vortexu a provede se centrifugace 5 min/12 000 rpm.
7. Provede se opatrná dekantace supernatantu. Zbylý supernatant se odsaje pipetou.
8. Sediment ve zkumavkách se rozpustí v 300 µl pufru 1xTE. Takto získaná DNA má již dostatečnou čistotu pro následující aplikace.

3.5.2. Izolace genomové DNA pomocí kitu Invisorb Spin Plant Kit (Invitex, Německo) – postupuje se dle přiloženého protokolu od výrobce.

Provede se homogenizace a lyze materiálu: do mikrozkušavek se vloží 50 – 100 mg listové tkáň, přidá se 400 µl Lysis buffer P + 20 µl Proteinase K (100 µg/ml) a provede se homogenizace. V případě šrotu se provádí pouze lyze.

1. Směs se krátce vortexuje.
2. Inkubace 1 hod při 65 °C za občasného promíchání na vortexu. Směs se přepipetuje na kolonku PREFILTR.
3. Odstředění 1 min/12.000 rpm.
4. Přidá se 10 µl RNase A (10 µg/ml) a směs se ponechá při pokojové teplotě 15 min.
5. Přidá se 200 µl Binding Buffer P, směs se vortexuje.
6. Směs se přepipetuje do kolonky SPIN FILTR a nechá se 2 min. stát.
7. Odstředění 1 min/12.000 rpm.
8. Do kolonky se napipetuje 550 µl Wash Buffer I.
9. Odstředění 1 min/12.000 rpm.
10. Do kolonky se napipetuje 550 µl Wash Buffer II.
11. Do kolonky se nepipetuje 550 µl Wash Buffer II.
12. Do kolonky se znovu napipetuje 550 µl Wash Buffer II.
13. Odstředění 1 min/12.000 rpm.
14. Provede se eluce navázané DNA. Kolonka se přemístí do nové mikrozkušavky a napipetuje se do ní 2x 100 µl předehřátého (65 °C) Elution Buffer D.
15. Inkubace 3 min, odstředění 1 min/12.000 rpm.

3.6. PCR

Všechny práce probíhají ve sterilním boxu, aby se zabránilo možným kontaminacím chemikálií a vzorků. Pracovní plochy se před započítím práce otřou 70% etanolem. Zkušavky s chemikáliemi i se vzorky se v průběhu práce udržují v chladu (používá se chladič stojánek). K pipetování se používají sterilní špičky s filtrem.

1. Chemikálie pro PCR se po rozmrznutí umístí do chladičho stojánku.
2. Připraví se potřebné množství reakční směsi (master-mix) dle tabulky. Pro detekci *Verticillia spp.* se použijí primery VD-F a VD-R, pro detekci *Leptosphaeria maculans* primery LEMA-F a LEMA-R.
3. Do označených 0.2 ml mikrozkušavek se rozpipetuje reakční směs po 13 µl.
4. Do reakční směsi v mikrozkušavkách se napipetují 2 µl vzorku DNA.
5. Mikrozkušavky s reakční směsí se vloží do PCR termocykleru a spustí se teplotní program.
6. Po ukončení teplotního programu lze vzorky krátkodobě uchovávat v lednici, nebo i delší dobu zamražené při -20 °C.

Tabulka 2: Příprava reakční směsi (master-mixu)

Chemikálie	1 reakce	10 reakcí	15 reakcí	20 reakcí
sterilní H ₂ O	8,5 µl	85 µl	127,5 µl	170 µl
10xPCR pufr	1,5 µl	15 µl	22,5 µl	30 µl
směs dNTPs (10 mM)	0,3 µl	3 µl	4,5 µl	6 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,6 µl	6 µl	9 µl	12 µl
primer F (5 mM)	1 µl	10 µl	15 µl	20 µl
primer R (5mM)	1 µl	10 µl	15 µl	20 µl
DNA polymeráza (5 IU/µl)	0,1 µl	1 µl	1,5 µl	2 µl

Tabulka 3: Sekvence primerů pro PCR

Primer	Sekvence
LEMA-F	TCT TGG CTT GGC TTT GTC TT
LEMA-R	ACA TTG GCT CGG AAA CAT TC
VD-F	TCT CCT CTC TAC GAG AAC GA
VD-R	CAC TTT CTA AGT ATC CTT CCT AT

Tabulka 4: Teplotní program PCR

Krok	Počet cyklů	Teplota	Čas
Denaturace DNA	1x	94 °C	4 min.
Denaturace DNA	35x	94 °C	30 s
Nasednutí primerů		55 °C	1 min
Syntéza DNA		72 °C	2 min
Syntéza DNA	1x	72 °C	5 min

3.7. Elektroforéza, fotodokumentace

1. Připraví se 1,5% agarózový gel: 1,5 g agarózy se rozmíchá ve 100 ml 1xTAE pufru a rozvaří v mikrovlnné troubě. Po vychladnutí na 50 °C se do roztoku přidá 10 µl roztoku ethidium bromidu a směs se naleje do elektroforetické vaničky. Vloží se hřeben a gel se nechá ztuhnout.
2. Ztuhlý gel i s vaničkou se vloží do elektroforetické aparatury, naplněné 1xTAE puftrem.
3. Do směsi po proběhlé PCR se přidají 4 µl koncentrátu nanášecího roztoku. Směs se napipetuje do jamek v agarózovém gelu.
4. Připojí se zdroj stejnosměrného proudu. Elektroforéza probíhá 1 hodinu při konstantním napětí 100 mV.
5. Gel po elektroforéze se vyjme z vaničky a přenesení na UV-transluminátor (vlnová délka excitačního světla je 280-302nm). Provede se fotodokumentace pomocí digitálního fotoaparátu s nasazeným oranžovým filtrem.

3.8. Vyhodnocení analýzy a interpretace výsledků

Na fotografii gelu se sleduje přítomnost či nepřítomnost proužku dané velikosti, odpovídající přítomnosti či nepřítomnosti amplifikovaného úseku genomové DNA hledané houby. V případě *Verticillium spp.* se hledá proužek o velikosti 360 bp (párů bazí), v případě *Leptosphaeria maculans* pak proužek o velikosti 220 bp. Přítomnost proužku je indikátorem napadení rostliny detekovaným houbovým patogenem. Pro vyloučení falešně pozitivních a falešně negativních výsledků je vhodné do analýzy zařazovat kontroly. Jako pozitivní kontrola slouží čistý izolát houbového patogena, jako negativní kontrola pak vzorek nenapadené rostliny řepky.

4. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce obsahuje tyto informace:

1. Odkaz na tuto metodiku.
2. Všechny informace nutné pro úplnou identifikaci vzorků.
3. Fotodokumentaci (elektroforeogram) s popisem vzorků.

5. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Metodika byla optimalizována pro aplikaci odlišování houbových patogenů řepky ozimé v různých fázích vývoje rostlin. V rámci ČR je tato metodika nová a využívána byla doposud pouze v laboratoři Agritec v rámci řešení projektu MZe č. QI111A075. Metodika byla otestována na souboru 100 rostlin řepky a byla zjištěna 98% korelace výsledků analýzy s reálným výskytem houbové choroby u rostlin. Přítomnost *Verticillia* byla prokazována nezávislou imunochemickou metodou ELISA s využitím komerčního kitu (Bioreba).

6. ZÁVĚR – POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Pomocí čistých izolátů byla optimalizována a ověřena metodika pro rychlou a spolehlivou detekci a vzájemné odlišení vybraných významných houbových patogenů ozimé řepky *Verticillium spp.* a *Leptosphaeria maculans*. Metodika je určena pro laboratoře, které se zabývají problematikou detekce houbových patogenů řepky ozimé. Pomocí této uplatněné metodiky mohou zemědělské laboratoře, vybavené pro metody molekulární biologie, samostatně provádět detekce a odlišování houbových patogenů řepky ozimé *Verticillium spp.* a *Leptosphaeria maculans* již v časných fázích vývoje řepky.

7. EKONOMICKÉ ASPEKTY

V případě pracoviště s běžně vybavenou laboratoří pro metody molekulární biologie (termocykler pro PCR, centrifuga, elektroforéza, váhy, pipety) budou náklady na zavedení postupů uvedených v metodice spočívat zejména v nákupu specifických oligonukleotidů pro PCR a izolačního kitu pro rostlinnou genomovou DNA (pokud již pracoviště obdobný kit nepoužívá). Cena 4 oligonukleotidů o velikosti 20bp v množství 20nmol, které vystačí pro několik stovek detekcí, je cca 800 Kč. Cena izolačního kitu pro 250 izolací je cca

15tis.Kč. Ostatní položky (termostabilní DNA polymeráza, agarosa pro elektroforézu) jsou v molekulárně-biologických laboratořích běžně používány. Celkové náklady na analýzu jednoho vzorku jsou cca 80Kč, z čehož největší část (60Kč) tvoří náklady na izolaci kvalitní genomové DNA. V případě izolace genomové DNA metodou CTAB/chloroform se materiálové náklady na izolaci jednoho vzorku sníží na třetinu, metoda je však pracnější a zdouhavější. Ekonomické přínosy pro uživatele spočívají ve včasné detekci houbových chorob v porostu řepky ozimé (dříve, než je napadení viditelné okem) a v možnosti včasné aplikace fungicidů. Ztráta na výnosu může dosahovat až 20% (Plachká a Odstrčilová, 2008).

8. DEDIKACE

Metodika byla vypracována v rámci řešení a za finanční podpory projektu Ministerstva zemědělství, číslo projektu: QI111A075: Využití biotechnologických metod, nových výchozích materiálů a efektivních postupů ve šlechtění ozimé řepky. Metodika je určena pro praxi.

9. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Kučera, V., Vyvadilová, M., Klíma, M., Vrbovský, V., Plachká, E., Macháčková, I., Šmirous, P., Poslušná, J., Buzek, Z. (2011): Výsledky sdružení Česká Řepka v roce 2011. S. 81–88. In Sborník referátů z 28. vyhodnocovacího semináře, HLUK, 24. –25.11.2011, SPZO s. r. o., Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin, Praha, 303 s. ISBN: 978-80-87065-36-5

10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Bittner, V. (2006). Škodlivé organismy řepky. Biotická poškození, choroby, škůdci. Agro tisk s. r. o., p. 16–17, ISBN: 80-903764-0-1.

Gall, J. (2011). Přehled ochrany rostlin od září do konce vegetace. Rostlinolékař 6. Profi Press., p. 5–9

Gómez-Alpízar, L. (2001). *Verticillium dahliae*. [online][cit. 11-05-2012]. Dostupné z: <http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/Verticillium/Vertifin.htm>

Häni, F., Popow, G., Reinhard, H., Schwarz, A., Tanner, K., Vorlet, M. (1993). Obrazový atlas chorob a škůdců polních plodin. Příručka ochrany rostlin v integrované produkci. Scientia, s. r. o. Pedagogické nakladatelství. Praha. 194 s. ISBN 80-85827-12-3.

Hayden H.L., Cozijnsen A.J., Howlett B.J. (2007). Microsatellite and Minisatellite Analysis of *Leptosphaeria maculans* in Australia Reveals Regional Genetic Differentiation, *Phytopathology* Vol 97, No.7, p. 879–887

Chadová, J. (2006). Přehled chorob a skladištních škůdců na osivu vybraných druhů plodin. Metodika zkoušení zdravotního stavu osiva. Kurent, s.r.o., p. 53– 54.

Inderbitzin, P., Davis, R. M., Bostock, R. M., Subbarao, K. V. (2001). The Ascomycete *Verticillium longisporum* is hybrid and a plant pathogen with an expanded host range.

- Jedryczka M., Rouxel T., Balesdent M.H. (1999). Rep-PCR based genomic fingerprinting of isolates of *Leptosphaeria maculans* from Poland, *European Journal of Plant Pathology* 105, p. 813–823
- Johansson, A. (2006). *Verticillium Longisporum*, Infection, Host Range, Prevalence and Plant Defence Responses. Licentiate thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala. 2006. 28 s. Dostupné z: <http://pub.epsilon.slu.se/1119/1/LicAvh.pdf>
- Kazda, J., Mikulka, J., Prokinová, E. (2010). Encyklopedie ochrany rostlin. Polní plodiny. Profi Press. 23 - 24, 103–117, 301 s. ISBN: 978-80-86726-34-2.
- Kulovaná E. (2001). Akutní výskyt houby *Verticillium dahliae* na ozimé řepce. [online][cit. 11-05-2012]. Dostupné z: http://www.agroweb.cz/Akutni-vyskyt-houby-Verticillium-dahliae-na-ozime-repce__s44x10261.html
- Matthews–Berry, S. (2007). First UK findings of *Verticillium longisporum* on oilseed rape (*Brassica napus*). Central Science Laboratory, CSL Pest Risk Analysis for *Verticillium longisporum*, 11 September 2007 (amended 02 October 2007). Dostupné z: <http://www.fera.defra.gov.uk/plants/plantHealth/pestsDiseases/documents/verticillium.pdf>
- Mazáková, J., Zouhar, M., Ryšánek, P., Plachká, E. (2008). Detection of winter rape fungal pathogens by PCR and their survey in Czech Republic. IOBC Conference Paris, 29th September – 1st October 2008. In: IOBC Oilseed rape meeting Réunion OILB Colza, Abstracts, Résumés. S. 7
- Plachká, E., Odstrčilová, L. (2008). Významné choroby řepky, zdroje infekce a výskyt v ČR. In: *Významné choroby hlavních hospodářských plodin: šlechtitelský seminář 2008* : Praha, 28. února 2008, p. 27–31, ISBN 978-80-87011-44-7.
- Poslušná J., Plachká E. (2009). Odolnost vybraných genotypů ozimé řepky olejky vůči fomové hnilobě brukvovitých (*Leptosphaeria maculans*) a bílé hnilobě řepky (*Sclerotinia sclerotiorum*) hodnocených na zkušebních lokalitách v Šumperku a Opavě, Úroda 12/2009, vědecká příloha s. 191–194
- Rimmer, S. R., Shattuck, V. I., Buchwaldt L. (2007). Compendium of Brassica Diseases. The American Phytopathological Society. p. 19–22
- Rouxel, T., Balesdent, M. H. (2005). The stem canker (blackleg) fungus, *Leptosphaeria maculans*, enters the genomic era. *Molecular Plant Pathology* 6: p. 225–241 Dostupné z: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1364-3703.2005.00282.x/full>>.
- Rouxel, T., Mendes-Pereira, E., Brun, H., Balesdent, M. H. (2004). Species complex of fungal phytopathogens: the *Leptosphaeria maculans* - *L. biglobosa* case study. In *Plant Genome. Biodiversity and Evolution*. 2: p. 33–75
- Shoemaker, R. A., Brun, H. (2001). The teleomorpha of the weakly aggressive segregate of *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal of Botany*. 79: p. 412–419
- Spitzer, T. (2010). Determinace chorob – *Verticillium* versus ostatní choroby. p. 57–58. In: Sborník referátů z 27. vyhodnocovacího semináře, HLUK, 25. – 26.11.2010, SPZO s.r.o., svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin, Praha, 387 s.
- Steventon L.A., Fahleson J., Hu Q., Dixelius Ch. (2002). Identification of the causal agent of *Verticillium* wilt of winter oilseed rape in SWeden, *V. longisporum*. *Mycol. Res.* 106 (5): p. 570–578.
- Šaroun, J. (2009). Houbové choroby a výnos řepky. Úroda 4. Profi Press. p. 30–36

Šlechtitelský seminář 2008. Českomoravská šlechtitelská a semenářská asociace. Praha. 27–31/ 63 s.

Tiedemann, A. (2012). *Verticillium longisporum* on oilseed rape [online][cit. 11-05-2012]. Dostupné z: <http://wwwuser.gwdg.de/~instphyt/app/research/verticillium.html>

Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes, *Nucleic Acid Research*, Vol.19, No.24, p. 6823–6831

Zeise, K., Tiedemann, A. v. (2001). Morphological and physiological differentiation among vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae* and *V. longisporum*. *J. Phytopathology*, 149, p. 469–475.

Zeise, K., Tiedemann, A.v. (2002). Host specialization among vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae* in relation to *V. longisporum*. *J. Phytopathology*, 150, p. 112–119.