

METODIKA VYUŽITÍ REAL-TIME PCR PRO TESTOVÁNÍ REZISTENCE PŠENICE K PŮVODCŮM STÉBLOLAMU



**Jana Palicová, Pavel Matušinsky, Veronika Dumalasová,
Alena Hanzalová, Ivana Svačinová, Jana Chrpová**

**Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
2020**

Dedikace

Metodika je výsledkem řešení institucionálního projektu MZE-RO0418.

Publikaci bylo Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským uděleno osvědčení č. UKZUZ 232916/2020 o uznání uplatněné metodiky v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje“. O uplatnění byla uzavřena smlouva se šlechtitelskou společností SELGEN, a.s.

Oponenti

Ing. Jana Mazáková, Ph.D., Česká zemědělská univerzita v Praze

Ing. Iveta Svobodová, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Autoři

Mgr. Jana Palicová, Ph.D.

Mgr. Pavel Matušinsky^{*}, Ph.D.

RNDr. Veronika Dumalasová, Ph.D.

Mgr. Alena Hanzalová, Ph.D.

Mgr. Ivana Svačinová^{*}

Ing. Jana Chrpová, CSc.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

Drnovská 507

161 06 Praha 6

*Agrotest fyto, s.r.o.

Havlíčková 2787/121

767 01 Kroměříž

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha, 2020

ISBN 978-80-7427-340-7

I. CÍL METODIKY

Cílem metodiky je popsat postup a využití molekulární metody real-time PCR pro kvantitativní detekci DNA původců stéblolamu v pletivech pšenice ozimé pro potřeby šlechtění a odrůdového zkušebnictví. Metodika se opírá o výsledky odrůdových pokusů prováděných v letech 2018–2019 v rámci testování ÚKZÚZ.

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

1. ÚVOD

Houbové choroby bází stébel obilnin se vyskytují každoročně a v oblastech intenzivního pěstování obilnin bývají často problémem i v suchých ročnících, jakým byl např. rok 2018. Patogeny přežívají v půdě déle než 3 roky a mohou způsobit až 40% ztráty na výnosech. Při napadení prorůstá houba stéblem, dochází k oslabení rostliny a následnému polehání, jsou ucpávány cévní svazky a stéblo předčasně dozrává (běloklasost). Jedná se o komplex chorob pat stébel, z nichž nejvýznamnější je stéblolam, jehož původci napadají pšenici, ječmen, žito, rýži a tritikale. Původce stéblolamu byl poprvé publikován před více než 100 lety jako *Cercospora herpotrichoides* Fron (Fron 1912). V současné době jsou známi dva původci stéblolamu *Oculimacula yallundae* (Wallwork et Spooner) Crous et W. Gams a *Oculimacula acuformis* (Nirenberg) Y. Marín et Crous. Oba druhy mají stejný životní cyklus, rozdílly jsou však v hostitelském okruhu, morfologii, epidemiologii a reakci k fungicidům. Z toho důvodu byly původně dvě variety téhož druhu odděleny do dvou samostatných druhů (Crous *et al.* 2003). *O. yallundae* vykazuje rychlejší nárůst mycelia v pletivech pšenice i na umělém živném médiu než *O. acuformis*. Oba druhy se však často vyskytují společně na jednom pozemku i na jednom stéble (Palicová *et al.* 2018b). *Oculimacula yallundae* je v ČR na pšenici dominantním druhem (Palicová *et al.* 2018a). Ve světě je však patrná variabilita v zastoupení jednotlivých druhů v různých populacích způsobená mimo jiné aplikací fungicidů s různou účinností k *O. yallundae* a *O. acuformis* (Lucas *et al.* 2000).

1.1. Ochrana pšenice proti původcům stéblolamu

Ochrana proti stéblolamu je založena především na včasné detekci patogenu a aplikaci fungicidů. Hlavní formou inokula stéblolamu v polních podmínkách jsou konidie produkované na infikované slámě (Lucas *et al.* 2000), které mohou napadat hostitele od podzimu do jara. Optimální teplota pro tvorbu konidií je 10 °C. Již ve fázi 3 až 4 listů (BBCH 13–14) jsou na rostlinách patrné primární symptomy ve formě nespecifických zahnědnutí bází stébel těsně nad povrchem

půdy. Počátkem sloupkování (BBCH 30–32) je proto doporučováno provést první ošetření fungicidem, zejména v oblastech intenzivního pěstování obilnin.

Oba původci se liší citlivostí k účinným látkám fungicidů, což značně komplikuje ochranu hostitelských rostlin (Leroux *et al.* 2013). Měli bychom vždy znát skladbu druhů na daném pozemku a podle toho cílit ochranu a volit vhodné přípravky. Toto je však technicky často nereálné a většina pěstitelů volí opakovaně podobné přípravky na bázi stejných účinných látek. Selekční tlak vyvolaný častým používáním jedné účinné látky ale mnohdy způsobí vznik rezistence, což bylo již v ČR popsáno u látky prochloraz (Palicová *et al.* Matušinsky 2019). Dle mezinárodní organizace FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) jsou původci stéblolamu řazeni mezi patogeny se středním rizikem vzniku rezistence. V registru přípravků na stránkách ÚKZÚZ je registrována celá řada fungicidů, zároveň však dochází k restrikcím účinných látek působících proti oběma patogenům. V roce 2020 byla ukončena platnost některých přípravků na bázi epoxykonazolu, fenpropimorfu a dalších.

Vedle chemické ochrany lze redukovat podzimní infekci orbou, pozdějším termínem setí, střídáním plodin a výběrem odolných odrůd.

1.2. Genetika rezistence odrůd pšenice

Dosud byly popsány tři geny rezistence k původcům stéblolamu: *Pch1*, *Pch2* a *Pch3* a QTL na chromozomu 5A (Burt *et al.* 2011). Geny *Pch1* a *Pch3* jsou odvozeny od planých druhů, *Pch1* od mnohoštetu (*Aegilops ventricosa*) a *Pch3* od kosmáče huňatého (*Dasypyrum villosum*). Gen *Pch1* je nejúčinnější, jeho přítomnost v genomu vede k potlačení a zpomalení vývoje choroby, klíčení spor patogenů však neovlivňuje (Blein *et al.* 2008). Do pšenice byl gen *Pch1* přenesen již v šedesátých letech minulého století (Maia 1967). Gen *Pch1* je v odolných odrůdách lokalizován v translokaci na chromozomu 7DL. Gen *Pch3* je lokalizován na chromozomu 4V (Murray *et al.* 1994).

Další gen rezistence ke stéblolamu *Pch2* pochází z genomu staré francouzské odrůdy Cappelle Desprez. Jeho účinnost byla známá již před využíváním genu *Pch1*, ale při silném výskytu stéblolamu neposkytuje dostatečnou ochranu. Gen *Pch2* je lokalizován na chromozomu 7AL (de la Peña *et al.* 1996). V odrůdě Cappelle Desprez byl zjištěn také zmíněný gen rezistence kvantitativního charakteru QPch.jic-5A, který je účinný k oběma druhům rodu *Oculimacula* jak u mladých rostlin, tak u rostlin v průběhu jejich dospělosti (Burt *et al.* 2011).

Účinnost genů rezistence k jednotlivým původcům stéblolamu se může lišit. Např. na odrůdách s genem *Pch1* se jeví závažnější *O. acuformis* než *O. yallundae*. Pokud tedy v populaci převládne *O. acuformis* nad *O. yallundae*,

účinnost genu *Pch1* bude nižší. Naopak gen *Pch2* je méně účinný k *O. yallundae* než k *O. acufomis* (Burt *et al.* 2011).

Odrůdy ozimé pšenice, které nesou gen rezistence ke stéblolamu *Pch1* a byly registrované v ČR, jsou znázorněny v Tab. 1. Jejich podíl je v souboru všech testovaných odrůd velmi nízký. Některé z nich nesou v rodokmenu odrůdu Hermann (např. Bonanza, LG Imposanto, Partner), jež byla spolu s odrůdou Annie používána jako odolná kontrola při pokusech ve VÚRV. Od roku 2019 ÚKZÚZ rozšířil testování odolnosti šlechtitelských materiálů k houbovým chorobám také o stéblolam a pokusy probíhají ve VÚRV.

Odrůdy s genem rezistence *Pch1* mají mírnější symptomy napadení. Většinou se neobjevuje typická eliptická skvrna ve tvaru oka, ale skvrny na bázích jsou neohraničené (Obr. 1) a ve většině případů nedochází v pozdějším stadiu k lámání stébla.

Tab. 1: Odrůdy ozimé pšenice s genem rezistence ke stéblolamu *Pch1* – detekováno STS (sequence-tagged site) markerem *Xorw1* (Leonard *et al.* 2008).

Odrůda	Registrace
Annie	2014
Beduin	2011–2019
Bonanza	2015
Floki	2020
Hermann	2007
Hyfi	2016
Illusion	2019
Iridium	2009–2016
KWS Donovan	2020
LG Imposanto	2017
Manager	2007–2017
Princeps	2012
Pankratz	2015
Partner	2016
Proteus	2017

Německý Bundessortenamt uvádí v roce 2020 v přehledech odrůd (Beschreibende Sortenliste 2020 – Getreide, Mais, Öl- und Faserpflanzen, Leguminosen, Rüben und Zwischenfrüchte) celkem 44 odrůd s nízkou náchylností ke stéblolamu, které mohou mít potenciální význam pro naše

šlechtění a v rámci Společného katalogu odrůd zemědělských plodin i pro naše pěstitele. Mezi nimi je 6 odrůd registrovaných i u nás: Bonanza, Hyfi, KWS Donovan, LG Imposanto, Nordkap a Partner. Další odrůdy s nízkou náchylností ke stéblolamu podle německých údajů nejsou u nás registrované, ale mají u nás nahlášené množitelské plochy: Campesino (0,02 % ze všech pěstovaných odrůd), Boss (0,05 %), Benchmark (0,13 %), Activus (0,19 %), RGT Aktion (0,31 %), LG Initial (0,35 %) a Rebel (0,9 %). Z této skupiny odrůd má nejvýznamnější množitelské plochy u nás odrůda Rebel s genem rezistence ke stéblolamu *Pch1* detekovaným ve VÚRV pomocí STS markeru *Xorw1*.



Obr. 1: Symptomy stéblolamu na různých odrůdách ozimé pšenice (zleva Annie – *Pch1*, JB Asano, Airbus, Fenomen, Viriato, Jindra)

2. PRACOVNÍ POSTUPY PRO TESTOVÁNÍ REZISTENCE

2.1. Inokulační testy

Ve šlechtění pšenice se v minulosti používaly různé metody pro hodnocení rezistence ke stéblolamu (Wei *et al.* 2011). Byly vyvinuty různé techniky přípravy inokula a jeho aplikace na poli (Bruehl *et Nelson* 1964), v maloparcelových pokusech (Palicová *et al.* 2018c) nebo v růstových komorách (Macer 1966). Polní i maloparcelové testy trvají celé vegetační období a pomocí nich je zjišťována rezistence stébla k invazi patogenem. Testy v růstových komorách jsou prováděny na juvenilních rostlinách (2–3 měsíce) a lze podle nich určit odolnost hostitele k proniknutí patogenu vrstvami listové pochvy. Oba druhy testů se vzájemně doplňují a schopnost proniknutí patogenu do

hostitele není vždy v korelaci s následnou invazí patogenu uvnitř stébla. Proto je optimální sledovat obě tyto veličiny (Doussinault 1973).

V polních podmínkách se nabízí pro testy rezistence využít pozemky dlouhodobě osévané pšenicí či ječmenem, kde se každoročně vyskytují původci stéblolamu, a tudíž je v půdě přítomno inokulum patogenů na posklizňových zbytcích.

2.2. Molekulární markery pro jednotlivé geny rezistence

Polní hodnocení i skleníkové testy založené na vizuálním hodnocení jsou náročné na čas a pracovní sílu a vzhledem k značnému vlivu podmínek prostředí vyžadují dostatečný počet opakování. Pro účely selekce odrůd rezistentních k původcům byla proto identifikována řada molekulárních markerů v úzké vazbě s geny rezistence k stéblolamu (Tab. 2). Molekulární markery přinášejí možnost vývoje elitních odrůd se stabilní a zvýšenou rezistencí s kombinací více genů rezistence.

Tab. 2: Seznam molekulárních markerů a sekvencí primerů využívaných pro detekci genů rezistence ke stéblolamu v odrůdách pšenice (F – forward, R – reverse).

Gen rezistence	Název markeru	Označení	Sekvence primeru 5'→3'	Zdroj
<i>Pch1</i>	<i>Xorw1</i>	F	CTATTACATGAAATCTTATTCTCC	Leonard <i>et al.</i> (2008)
		R	CAGCAGTAACGAGAATGTGG	
<i>Pch2</i>	<i>Xwmc525</i>	F	GTTTGACGTGTTTGCTGCTTAC	Chapman <i>et al.</i> (2008)*
		R	CTACGGATAATGATTGCTGGCT	
<i>Pch2</i>	<i>Xcfa2040</i>	F	TCAAATGATTTTCAGGTAACCACTA	Chapman <i>et al.</i> (2008)*
		R	TTCCTGATCCCACCAAACAT	
QPch.jic-5A	<i>Xgwm639</i>	F	CTCTCTCCATTCGGTTTTCC	Burt <i>et al.</i> (2011)*
		R	CATGCCCCCTTTTCTG	
QPch.jic-5A	<i>Xbarc197</i>	F	CGCATGGTCAGTTTTCTTTAATCCT	Burt <i>et al.</i> (2011)*
		R	GCGCTCTCCTTCATTATGGTTTGTTG	

* Sady primerů jsou popsány na webové stránce GrainGenes (<http://wheat.pw.usda.gov>).

2.3. Kvantitativní detekce patogenů *Oculimacula yallundae* a *O. acufomis* pomocí real-time PCR

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (real-time PCR, qPCR) umožňuje kvantifikaci sledovaného úseku DNA v reálném čase. Výhodou metody real-time PCR je její využití pro hodnocení velkého množství materiálů; metoda je

velice citlivá a detekuje i velmi malé množství patogenu v pletivu hostitele. Navíc lze pomocí real-time PCR rozlišit infekci obou původců stéblolamu – *Oculimacula yallundae* a *O. acuformis*, což není dle symptomů možné. Laboratorní zpracování vzorků může být prováděno v podstatě kdykoli na rozdíl od vizuálního hodnocení, které je třeba provést v období mléčné zralosti.

Při použití metody real-time PCR a jejím vyhodnocení je nutno dodržet zásady označované zkratkou MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments). Jedná se o řadu doporučení ke správnému provedení real-time PCR experimentů tak, aby výstupy byly objektivní (Bustin *et al.* 2009). Doporučujeme tedy před začátkem testování prostudovat metodiku EPPO 2010 PM 7/76 (2) a přílohu EPPO 2019 PM 7/98 (4), kde jsou zásady MIQE specifikovány. V předložené metodice je využito upravené metody dle Walsh *et al.* (2005). Původní metoda využívá značené sondy TaqMan, naše upravená metoda je založena na systému SYBR Green. Složení reakční směsi a seznam použitých primerů znázorňují Tab. 3 a 4.

Jako příklad provedení jsme připravili vzorky s 12 odrůdami pšenice ozimé s rozdílnou úrovní napadení patogenem *O. yallundae* a *O. acuformis*. Z 20 náhodně odebraných rostlin od každé odrůdy jsme oddělili paty stébel, které jsme rozemleli a homogenizovali na jemný prášek. Pomocí kitu Qiagene DNeasy Plant Mini Kit jsme izolovali DNA, kterou jsme dále analyzovali pomocí metody real-time PCR na přístroji CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio Rad). V případě diagnostiky rostlinných patogenů obvykle není nutná absolutní kvantifikace, jelikož stanovení biologické významnosti různých úrovní DNA patogenu ve vzorku pro rozvoj choroby je obtížně interpretovatelné. Z praktického hlediska vystačíme s relativní kvantifikací, kterou můžeme vztáhnout na vnitřní kontrolu, tedy vzorek o známém stupni napadení patogenem. Pro tento účel jsme využili odrůdu Annie, která nese gen odolnosti ke stéblolamu *Pch1*. Rostliny pro tento vzorek byly při vizuálním hodnocení téměř bez příznaků a relativní množství DNA ostatních vzorků byla vztažena k tomuto kontrolnímu vzorku, viz níže.

Tab. 3: Složení reakční směsi (15 µl).

Složka (zásobní koncentrace)	Objem (finální koncentrace)
H ₂ O	5,9 µl
SYBR Green Master Mix (2×)	7,5 µl (1x)
primer F (10 µM)	0,3 µl (0,2 µM)
primer R (10 µM)	0,3 µl (0,2 µM)
templátová DNA	1,0 µl (cca 10 ng)

Tab. 4: Seznam použitých primerů (F – forward, R – reverse) (dle Walsh *et al.* 2005).

Primer	Označení	Sekvence primeru 5'→3'	Druh organismu
Yall F-H	F	GGGGGCTACCCTACTTGGCAG	<i>O. yallundae</i>
Ac F-D	F	GCCACCCTACTTCGGTAA	<i>O. aciformis</i>
Oculimacula-R	R	ATTCAAGGGTGGAGGTCTGRAC	<i>O. yallundae</i> / <i>O. aciformis</i>
Wpal F	F	CGTTCTTGGTCGCGTTGT	<i>Triticum aestivum</i>
Wpal R	R	ACTCTTGACAGCATTCTTGACATTCT	<i>Triticum aestivum</i>

Reakční podmínky

Počáteční denaturace probíhala při 95 °C, 10 min; 40 cyklů denaturace 95 °C, 15 sec a annealing + polymerace 60 °C, 60 sec. Na závěr byla zařazena melting analýza (melting curve analysis).

Zahrnutí referenčního genu PAL

Pro kvantifikaci DNA *O. yallundae* a *O. aciformis* je nezbytné zařadit vnitřní kontrolu neboli referenční gen. Ta nám pomůže vyhodnotit, do jaké míry bylo použito srovnatelné množství vstupního materiálu, a to i přesto, že jsme izolovali DNA ze stejného množství biologického materiálu (homogenizované paty stébel) obvykle kolem 50 mg sušeného jemného prášku a před vlastní real-time PCR reakcí jsme naředili koncentraci DNA u všech vzorků na stejnou úroveň (obvykle 10 ng.μl⁻¹). V našem případě jsme jako referenční gen použili gen pro fenylalanin amonium lyázu (PAL). Do reakce je nutno zařadit pozitivní kontrolu (známý vzorek s přítomností DNA patogenu), negativní kontrolu (DNA pšenice bez patogenu) a negativní kontrolu bez templátu (voda). Pozitivní i negativní kontrola by měly projít celým procesem včetně izolace DNA.

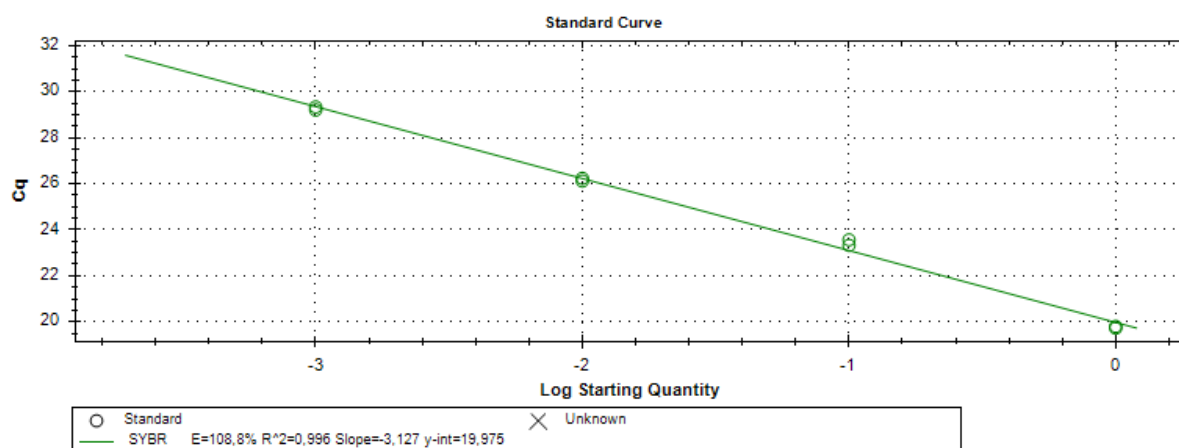
Výpočet relativního množství DNA (pomocí metody $\Delta\Delta Ct$)

Kalkulace s použitím referenčního genu se provádí pomocí vzorce $2^{\Delta Ct1 - \Delta Ct2}$, kde $\Delta Ct1 = Ct_{(target\ 1)} - Ct_{(ref\ 1)}$ a $\Delta Ct2 = Ct_{(target\ 2)} - Ct_{(ref\ 2)}$. Target 1 je cílový lokus *Oculimacula yallundae* a *O. aciformis* u vzorku 1, target 2 cílový lokus u vzorku 2 (kontrolní vzorek), ref 1 je referenční kontrola vzorku 1 a ref 2 je referenční kontrola vzorku 2. Při výpočtu je nutno zohlednit efektivitu PCR, která je ovlivněna celou řadou faktorů, jako je specifita primerů, reakční podmínky, použité chemikálie či přítomnost inhibitorů. Za předpokladu 100% efektivity dojde při každém cyklu ke zdvojnásobení množství DNA ve vzorku tedy 2^n , kdy n

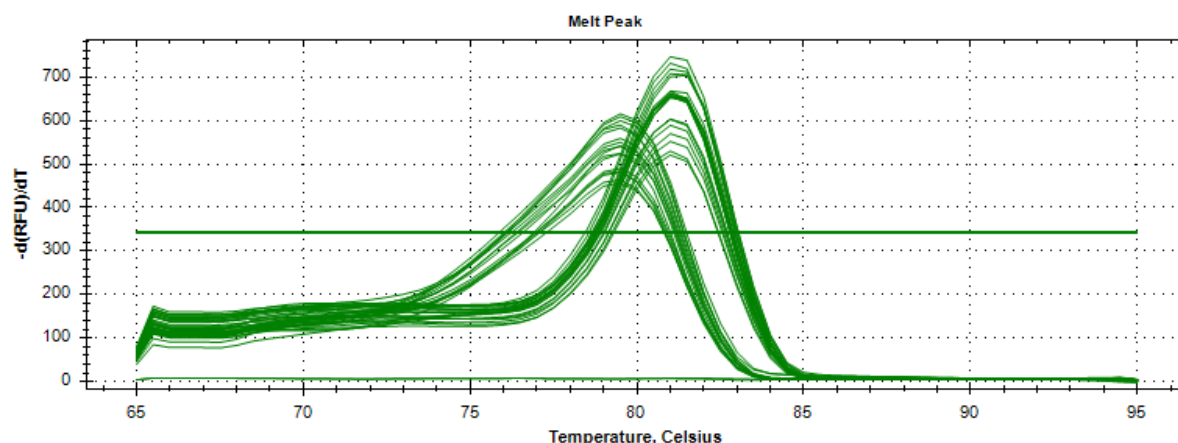
je počet cyklů. V případě např. 90% efektivity je třeba vzorec výpočtu relativního množství DNA upravit na $1,9^n$. Za akceptovatelnou efektivitu je považováno rozmezí 90–110 %. Vyšší efektivita než 100 % indikuje např. nízkou kvalitu vzorku. Efektivitu PCR vyvodíme ze sklonu standardní křivky odvozené od ředící řady vzorku nejlépe desítkovým ředěním (Tab. 5). Pro standardní křivku cílového lokusu (Obr. 2) jsme vytvořili ředící řadu z DNA získané z mycelia *O. yallundae* smíchané s DNA pšenice odrůdy Annie. Takto jsme chtěli ověřit efektivitu reakce u cílového lokusu v DNA hostitele. Pro standardní křivku referenčního genu (PAL) jsme vytvořili ředící řadu z DNA pšenice odrůdy Annie (Tab. 5). Je doporučeno, aby výsledný korelační koeficient R^2 byl roven či vyšší než 0,99.

Tab. 5: Příprava ředící řady pro kontrolu efektivity PCR.

Vzorek	Target	ng.μl ⁻¹			
		10,0	10,0	10,0	10,0
Annie (kontrola)	Cílový lokus (<i>O. yallundae</i>)	10,0	10,0	10,0	10,0
<i>O. yallundae</i> (pozit. kontrola)		1	0,1	0,01	0,001
Annie (kontrola)	Referenční gen (PAL)	30	3	0,3	0,03



Obr. 2: Standardní křivka cílového lokusu *O. yallundae*.



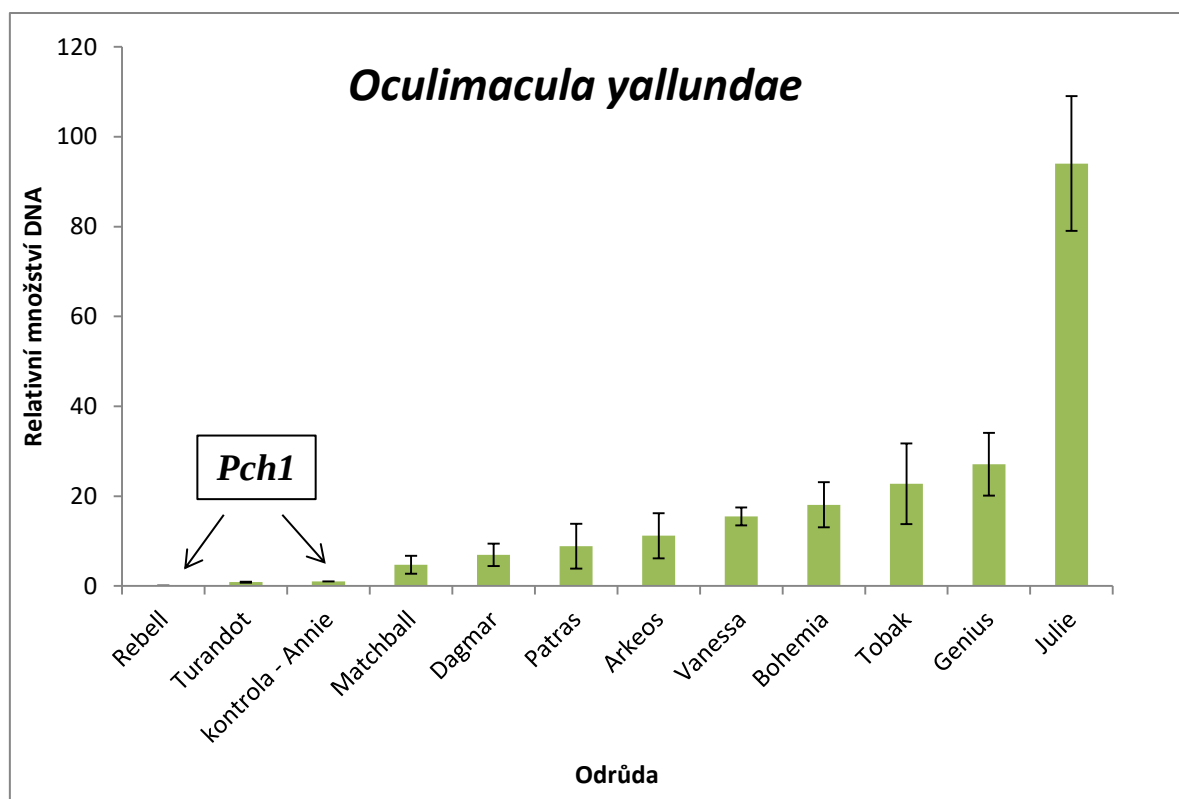
Obr. 3: Křivka tání pro referenční gen PAL a cílový lokus *O. yallundae*.

Křivka tání

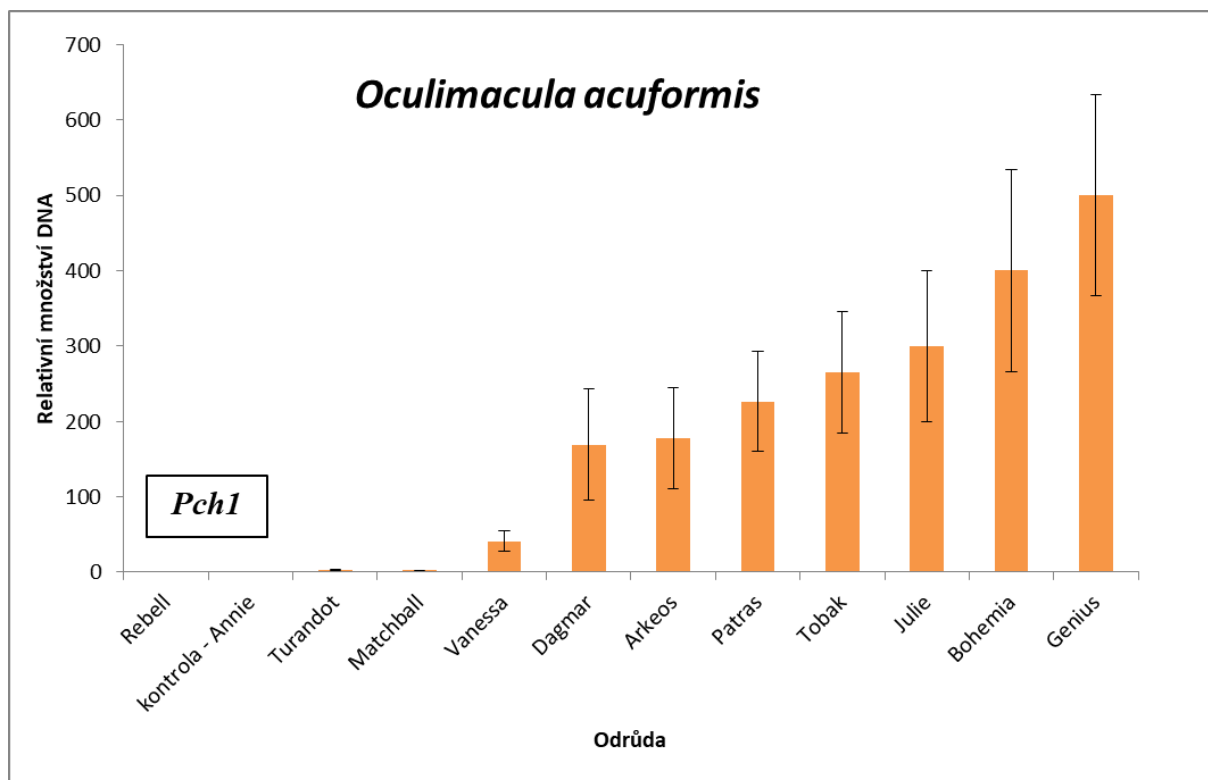
Vzhledem k tomu, že jsme použili metodu založenou na SYBR Green, je nutno ověřit, zda nedochází ke vzniku nespecifických produktů nebo primer dimerů. K tomu lze využít tzv. křivku tání. Nespecifické produkty mívají obvykle jinou (většinou nižší) teplotu tání. Křivka by měla mít pro každý PCR produkt jeden vrchol. V našem případě náleží první nižší vrchol referenčnímu genu PAL, druhý vyšší vrchol je pak tvořen cílovým lokusem (Obr. 3). V grafu je možno pozorovat křivku pro kontrolu bez templátu (rovná nezvlněná křivka ve spodní části grafu).

Výsledná relativní kvantifikace

Relativní kvantifikace DNA patogenu je vypočtena pomocí metody $\Delta\Delta C_t$ (viz výše) a znázorněna graficky, kdy sloupce uvádějí, kolikrát více DNA *Oculimacula yallundae* a *O. acutiformis* se nacházelo v jednotlivých vzorcích v poměru ke kontrolnímu vzorku (Obr. 4, 5).



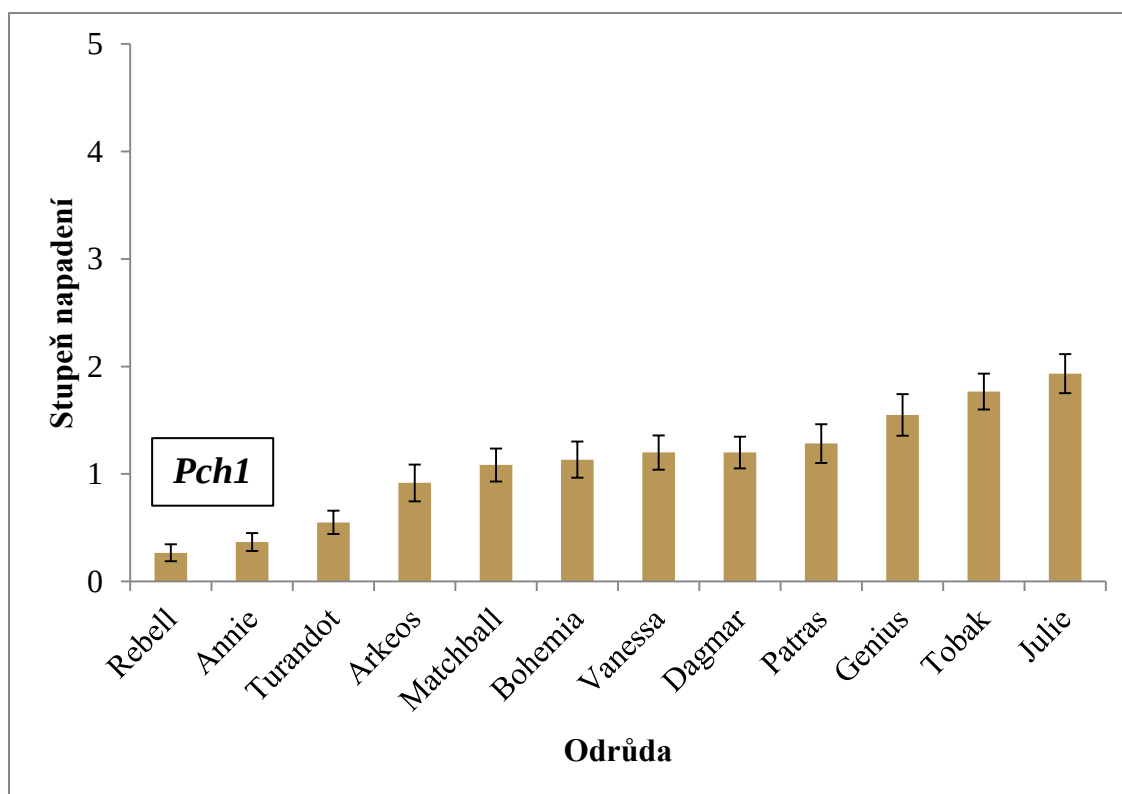
Obr. 4: Relativní kvantifikace DNA *Oculimacula yallundae* u testovaných odrůd pšenice ozimé vztažená ke kontrolní odolné odrůdě Annie (relativní hodnota 1, standard).



Obr. 5: Relativní kvantifikace DNA *Oculimacula acuformis* u testovaných odrůd pšenice ozimé vztažená ke kontrolní odolné odrůdě Annie (relativní hodnota 1, standard).

2.4. Porovnání vizuálního hodnocení a real-time PCR

Studium polní rezistence odrůd ozimé pšenice ke stéblolamu probíhá ve VÚRV, v.v.i. v Praze – Ruzyni každoročně formou maloparcelového pokusu s inokulací původci stéblolamu dle metodiky Palicová *et al.* (2018c). Obr. 6 ukazuje výsledky vizuálního hodnocení v období mléčné zralosti (BBCH 75) stupnicí 0–5 (0 – bez symptomů, 1 – jedna malá skvrna, 2 – více menších skvrn pokrývajících méně než polovinu obvodu stébla, 3 – větší skvrny pokrývající více než polovinu stébla, 4 – skvrny pokrývají téměř celý obvod stébla, 5 – celé stéblo je pokryté skvrnami, může se lámat). Výsledky kvantitativních analýz DNA obou původců stéblolamu pomocí real-time PCR víceméně korespondují s vizuálním hodnocením symptomů (viz Obr. 4–6). Odrůdy Rebell a Annie nesoucí gen rezistence ke stéblolamu *Pch1* vykazovaly nejnižší napadení ze souboru testovaných odrůd při vizuálním hodnocení. Množství DNA *Oculimacula yallundae* a *O. acuformis* stanovené metodou real-time PCR bylo nejnižší také u odrůd Rebell a Annie.



Obr. 6: Vizuální hodnocení symptomů stéblolamu u testovaných odrůd pšenice ozimé dle stupnice 0–5 (0 bez symptomů) v období mléčné zralosti.

III. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Předložená metodika pro praxi se opírá o dlouholeté zkušenosti s problematikou chorob pat stébel ve VÚRV, v.v.i. Praze – Ruzyni. V době postupujících restrikcí chemických přípravků pro ochranu rostlin ze strany Evropské komise se zvyšuje potřeba šlechtění odrůd s kombinovanou rezistencí k houbovým chorobám.

Metodika popisuje nový postup pro kvantitativní detekci DNA patogenů způsobujících stéblolam na základě molekulární metody real-time PCR. Metodický přístup byl opakovaně ověřen a molekulární data byla porovnána s rutinně používaným vizuálním hodnocením. Při šlechtitelském procesu je třeba průběžně testovat obrovské množství materiálů a během zemědělské sezóny je obtížné provádět podrobné vizuální hodnocení. Real-time PCR vyžaduje v sezóně pouze odebrání reprezentativního vzorku bází stébel a testování lze provést ze sušeného materiálu kdykoli později. Zároveň z informací o kvantitativním množství DNA patogenu v pletivech zjistíme zastoupení obou původců stéblolamu v populaci na sledované lokalitě.

V následujícím ročníku je potom možné přizpůsobit strategii chemické ochrany (volbu přípravků apod.).

IV. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika je určena především pro šlechtitelská pracoviště, pracoviště aplikovaného výzkumu, ÚKZÚZ, ale i pro zemědělskou praxi. Metodika popisuje účinné postupy pro hodnocení velkého množství šlechtitelských materiálů s vysokou přesností.

Popsané postupy je možné využít také pro testování účinnosti fungicidů nebo např. pro vyhodnocení rozdílů mezi různými způsoby hospodaření apod.

V. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Pěstováním odolných odrůd ke stéblolamu se minimalizují ztráty na výnosech, které mohou u náchylných odrůd dosáhnout až 40 %.

Dle Situační zprávy Ministerstva zemědělství bylo v roce 2019 sklizeno 4716,5 tis. tun pšenice ozimé. Pěstební plocha pšenice ozimé v roce 2019 byla 814,5 tis. ha a průměrný výnos ozimé pšenice 5,79 t/ha.

Po vyšší produkci obilovin ze sklizně roku 2019 došlo ke stagnaci či mírnému poklesu cen na obilném trhu ČR ihned po žních. U většiny komodit, a to jak v potravinářské, tak i krmné kvalitě, nastoupil stagnující trend či postupné snižování cen. Ceny většiny komodit pozvolna klesaly, ale přesto dosahovaly rentabilních úrovní. U pšenice potravinářské byla dosažena nejvyšší cenová hladina v druhé polovině marketingového roku 2018/2019 v úrovni 4 707 Kč/t. V extrémních případech na plochách se silným infekčním tlakem a vhodnými meteorologickými podmínkami mohou 40% ztráty na výnosech způsobené původci stéblolamu znamenat finanční ztrátu až 10,9 tis. Kč/ha.

Stanovení úrovně rezistence pěstovaných odrůd pšenice je zásadní pro celkovou optimální pěstební technologii dané odrůdy, zda se např. u konkrétní odrůdy vyplatí investovat do chemické ochrany. Při pěstování odrůd ozimé pšenice rezistentních ke stéblolamu je možné ušetřit minimálně na 1 postřiku, což představuje finanční úsporu ve výši přibližně 1000–2000 Kč/ha.

VI. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Blein M., Levrel A., Gautier V., Muranty H., Barloy D. (2008): The specific effects of the *Pch1* resistance gene on the development of *Oculimacula yallundae*, the causing agent of wheat eyespot. Options Méditerranéennes. Serie A, Séminaires Méditerranéennes 81: 159-162.
- Bruehl G. W., Nelson W. L. (1964): Techniques for mass inoculations of winter wheat in the field with *Cercospora herpotrichoides*. Plant Disease Report 48: 863-865.
- Burt C., Hollins T. W., Nicholson P. (2011): Identification of a QTL conferring seedling and adult plant resistance to eyespot on chromosome 5A of Cappelle Desprez. Theoretical and Applied Genetics, 122: 119–128.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., Wittwer, C. T. (2009): The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Clinical Chemistry 55:4 611–622.
- Chapman N. H., Burt C., Dong H., Nicholson P. (2008): The development of PCR-based markers for the selection of eyespot resistance genes *Pch1* and *Pch2*. Theoretical and Applied Genetics 117: 425–433.
- Crous P. W., Groenewald J. Z. E., Gams W. (2003): Eyespot of cereals revisited: ITS phylogeny reveals new species relationships. European Journal of Plant Pathology 109(8): 841-850.
- Doussinault G. (1973): Comportement de douze variétés de Blé tendre vis-à-vis du Piétin-verse (*Cercospora herpotrichoides* Fron). Conséquences pour la sélection. Annales de l'amélioration des plantes 23: 333-346.
- Fron G. (1912): Contribution à l'étude de la maladie du 'pied noir des céréales' ou 'piétin-verse'. Annales de la Science Agronomique Française et Étrangère 4(1): 3-29.
- Leonard J., Watson C., Carter A., Hansen J., Zemetra R., Santra D., Campbell K., Riera-Lizarazu O. (2008): Identification of a candidate gene for the wheat endopeptidase Ep-D1 locus and two other STS markers linked to the eyespot resistance gene *Pch1*. Theor Appl Genet 116:261–270.
- Leroux P., Gredt M., Remuson F., Micoud A., Walker A.-S. (2013): Fungicide resistance status in French populations of the wheat eyespot fungi *Oculimacula aciformis* and *Oculimacula yallundae*. Pest Management Science 69: 15-26.
- Lucas J. A., Dyer P. S., Muray T. D. (2000): Pathogenicity, hostspecificity, and population biology of *Tapesia spp.*, causal agents of eyespot disease in cereals. Advances in Botanical Research 33: 226-258.

- Macer R. C. F. (1966): Resistance to eyespot disease (*Cesosporella herpotrichoides*) determined by a seedling test in some forms of *Triticum*, *Aegilops*, *Secale*, *Hordeum*. Journal of Agricultural Science 67:389-397.
- Maia N. (1967): Obtention de blés tendres résistants au Piétin-verse par croisements interspécifiques blé x *Aegilops*. Comptes rendus de l'Académie d'Agriculture de France 53: 149-154.
- Murray T. D., de la Peña R. C., Yildirim A., Jones S. S. (1994): A new source of resistance to *Pseudocercosporella herpotrichoides*, cause of eyespot disease of wheat, located on chromosome 4V of *Dasypyrum villosum*. Plant Breeding 113: 281-286.
- Palicová J., Matušinsky P. (2019): Reaction of Eyespot Causal Agents to some Active Ingredients of Fungicides In Vitro. Cereal Research Communications 47(1):88-97.
- Palicová, Hanzalová, Matušinsky (2018a): Stéblolam v České republice a odolnost odrůd ozimé pšenice. Úroda 66(5): 34-36.
- Palicová J., Matušinsky P., Dumalasová V., Hanzalová A., Bížová I. (2018b): Resistance of winter wheat cultivars to eyespot and characterisation of causal agents of the disease. Plant Protection Science 54(1): 24-30.
- Palicová J., Hanzalová A., Dumalasová V., Bížová I., Chrpová J., Bartoš P. (2018c): Metodika testování rezistence pšenice k původcům stéblolamu. ISBN 978-80-7427-285-1.
- de la Peña R. C., Murray T. D., Jones S. S. (1996): Linkage relations among eyespot resistance gene *Pch2* endopeptidase Ep-A1b, and RFLP marker *Xpsr121* on chromosome 7A of wheat. Plant Breeding 115: 273-275.
- Walsh K., Korimbocus J., Boonham N., Jennings P., Hims M. (2005). Using real-time PCR to discriminate and quantify the closely related wheat pathogens *Oculimacula yallundae* and *Oculimacula acuformis*. Journal of Phytopathology 153 (11–12): 715–721.
- Wei L., Muranty H., Zhang H. (2011): Advances and prospects in wheat eyespot research: Contribution from genetics and molecular tools. Journal of Phytopathology 159: 457-470.

VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Dumalasová V. (2014): Choroby obilnin přenosné osivem. Agromanuál 9 (8): 37–40. Dedikace: QJ1210189, RO0414.
- Dumalasová V., Bartoš P. (2012): Houbové choroby ozimých obilnin přenosné osivem. Úroda 60 (7): 68-70. Dedikace: QJ1210189, MZE-0002700604.

- Dumalasová V., Leišová-Svobodová L., Sumíková T., Bartoš P. (2013): Odrůdová odolnost pšenice vůči stéblolamu. *Úroda* 61(6): 24–27. Dedikace: MZE-0002700604, QJ1210189.
- Dumalasová V., Palicová J., Hanzalová A., Bartoš P. (2017): Metodika diagnostiky a postupů ochrany proti chorobám pat stébel pšenice. Praha, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 36 pp. Dedikace QJ1530373.
- Dumalasová V., Palicová J., Hanzalová A., Bížová I., Leišová-Svobodová L. (2015): Eyespot resistance gene *Pch1* and methods of study of its effectiveness in wheat cultivars. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 51 (4): 166-173. Dedikace: MZE-RO0415, QJ1210189.
- Hanzalová A., Dumalasová V., Palicová J., Bartoš P. (2013): Choroby bází stébel a kořenů pšenice z hlediska odrůdové odolnosti. *Rostlinolékař* 24 (3): 12-14. Dedikace: QJ1210189, MZE-0002700604.
- Palicová J. (2015): Houbové choroby obilnin v jarním období. *Úroda* 63 (3): 14-16. Dedikace: QJ1210189, MZE-RO0414.
- Palicová J., Bartoš P. (2012): Houbové choroby obilnin od podzimu do jara. *Úroda* 60 (9): 10-11. Dedikace: QJ1210189, MZE-0002700604.
- Palicová J., Bartoš P. (2014): Časný napadení ozimých obilnin houbovými chorobami. *Agromanuál* 9: 28-30. Dedikace: QJ1210189, MZE-RO0414.
- Palicová J., Hanzalová A. (2016): Choroby pat stébel ozimé pšenice a rezistence k fungicidům. *Úroda* 64 (6): 26-27. Dedikace: QJ1210189, QJ1530373, MZE-RO0416.
- Palicová J., Chrpová J. (2020): Jarní ochrana porostů ozimé pšenice před stéblolamem. *Úroda* 4: 22-26. Dedikace: MZE-RO0418.
- Palicová J., Matušinsky P. (2019): Reaction of Eyespot Causal Agents to some Active Ingredients of Fungicides In Vitro. *Cereal Research Communications* 47(1):88-97. Dedikace: QJ1530373, MZE-RO0418.
- Palicová J., Matušinsky P. (2019): Stéblolam a rezistence k fungicidům v České republice od roku 2015. *Úroda* 67(5): 86-89. Dedikace: QK1910041, MZE-RO0418.
- Palicová J., Dumalasová V., Hanzalová A. (2019): Odolnost ozimé pšenice ke stéblolamu založená na přítomnosti genu *Pch1*. *Úroda* 12/2019, vědecká příloha časopisu: 151-153. Dedikace: MZE-RO0418, QK1910041.
- Palicová J., Hanzalová A., Bížová I. (2014): Choroby pat stébel. Pšenice 2014 "Rez nikdy nespí". Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha: 50-51. Dedikace: QJ1210189, MZE-RO0414.
- Palicová J., Hanzalová A., Bížová I. (2014): Odrůdová odolnost pšenice k chorobám pat stébel. *Úroda* 62(12 věd. př.): 229-232. Dedikace: QJ1210189.
- Palicová J., Hanzalová A., Bížová I. (2015): Stéblolam a odolnost odrod pšenice. *Naše pole* 19 (5): 43-45. Dedikace: QJ1210189.

- Palicová J., Hanzalová A., Matušinsky P. (2018): Stéblolam v České republice a odolnost odrůd ozimé pšenice. *Úroda* 66 (5): 34-36. Dedikace: QJ1530373, MZE-RO0418.
- Palicová J., Hanzalová A., Bartoš P., Bížová I. (2013): Reakce vybraných odrůd ozimé pšenice na stéblolam. *Úroda* 61(11): 21-23. Dedikace: QJ1210189.
- Palicová J., Matušinsky P., Dumalasová V., Hanzalová A., Bížová I. (2018): Resistance of winter wheat cultivars to eyespot and characterisation of causal agents of the disease. *Plant Protection Science* 54(1): 24-30. Dedikace: MZE-RO0416, QJ1210189, QJ1530373.
- Palicová J., Hanzalová A., Dumalasová V., Bížová I., Chrpová J., Bartoš P. (2018): Metodika testování rezistence pšenice k původcům stéblolamu. ISBN 978-80-7427-285-1. Dedikace: QJ1530373.
- Palicová J., Matušinsky P., Hanzalová A., Svačinová I., Dumalasová V., Chrpová J. (2020): Reaction of winter wheat cultivars to eyespot assessed visually and by real-time PCR. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 56(1): 9–14. Dedikace: MZE-RO0418, QK1910041.
- Sumíková T., Dumalasová V., Trávníčková M. (2016): Metodika použití molekulárních markerů k detekci genů rezistence ke rzem, padlí travnímu a stéblolamu a genů pro krátkostébelnost u pšenice. Praha, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 19 pp. Dedikace: QJ1210189.

Poděkování

Děkujeme Šárce Bártové, Ingrid Rutrlové a Lence Urbánkové za technickou podporu při polních pokusech i při zpracování metodiky.



Poznámky

Autoři:

Mgr. Jana Palicová, Ph.D.

Mgr. Pavel Matušinsky, Ph.D.

RNDr. Veronika Dumalasová, Ph.D.

Mgr. Alena Hanzalová, Ph.D.

Mgr. Ivana Svačinová

Ing. Jana Chrpová, CSc.

VÚRV, v.v.i.

Agrotest fyto, s.r.o.

VÚRV, v.v.i.

VÚRV, v.v.i.

Agrotest fyto, s.r.o.

VÚRV, v.v.i.

Název: METODIKA VYUŽITÍ REAL-TIME PCR PRO TESTOVÁNÍ REZISTENCE
PŠENICE K PŮVODCŮM STÉBLOLAMU

Vydal: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

Drnovská 507, Praha 6 – Ruzyně 161 06

Náklad: 60 výtisků

Vyšlo: 2020, první vydání

Foto: Jana Palicová

Metodika je poskytována bezplatně a je veřejně přístupná na www.vurv.cz

Vydáno bez jazykové úpravy

Kontakt na vedoucího autorského kolektivu: palicova@vurv.cz

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha, 2020

ISBN 978-80-7427-340-7



Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2020