

# VÝSKYT PŮVODCŮ FOMOVÉHO ČERNÁNÍ STONKU ŘEPKY NA ÚZEMÍ ČESKÉ REPUBLIKY A JEJICH LOKALIZACE V NAPADENÝCH STONCÍCH

*Leptosphaeria species causing phoma stem canker on winter oilseed rape in the Czech Republic, occurrence and stem colonization*

Pavel RYŠÁNEK, Jana MAZÁKOVÁ, Jan URBAN, Miloslav ZOUHAR

Česká zemědělská univerzita v Praze

**Abstrakt:** Fomové černání stonku je významným onemocněním ozimé řepky. Mohou se na něm podílet dva různí patogeni, *Leptosphaeria maculans* a *L. biglobosa*. V letech 2007-2012 byl proto na území ČR proveden jejich rozsáhlý monitoring. Vzorky byly analyzovány pomocí PCR. V 1159 listových skvrnách odebraných na podzim byla *L. maculans* nalezena v 49 % a *L. biglobosa* v 19 %. V 32 % skvrn byli nalezeni oba patogeni. V bázích stonků 708 rostlin odebraných před sklizní bylo prokázáno, že podíl rostlin infikovaných *L. biglobosa* je vyšší (v průměru let 62 %) než u *L. maculans*. 40 % rostlin bylo přítom infikováno oběma patogeny. Tyto výsledky ukázaly, že zatímco na podzim je v listových skvrnách čtenější výskyt *L. maculans*, na jaře převládá ve stoncích *L. biglobosa*.

**Klíčová slova:** fomové černání stonku, ozimá řepka, *Leptosphaeria maculans*, *Leptosphaeria biglobosa*, PCR (polymerázová řetězová reakce)

**Summary:** Phoma stem canker is an important disease of winter rape. It may be caused by two related pathogens, *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*. A survey of them was conducted from 2007-2012. Samples were analyzed by PCR. Of the 1159 *Leptosphaeria* spp. infected leaf spots, 49 and 19% were detected as *L. maculans*- and *L. biglobosa*-infected, respectively, in case of single species-infected samples, whereas 32% corresponded to co-infection by both species. Altogether 708 bases of oilseed rape plants were also tested. The proportion of plants in which *L. biglobosa* DNA was amplified was greater (62% in average) than that of plants with *L. maculans* DNA and 40% of tested plants were found to be co-infected by both *L. maculans* and *L. biglobosa*. These results suggest that *L. maculans* is predominant species in autumn, while *L. biglobosa* is more successful species than *L. maculans* in colonization of oilseed rape tissues in later growth stages of plant in conditions of the Czech Republic.

**Key words:** phoma stem canker, oilseed rape, *Leptosphaeria maculans*, *Leptosphaeria biglobosa*, PCR (Polymerase Chain Reaction)

## Úvod

Řepka je v současnosti jednou z nejvýznamnějších plodin pěstovaných v ČR. S její vysokou koncentrací na orné půdě však souvisí i stále větší problémy s patogeny a škůdci, kteří se za takové situace snadno šíří i přežívají z roku na rok. Jednou z nejvýznamnějších chorob je v současnosti fomové černání stonku. Na jeho vzniku se mohou podílet dva příbuzní patogeni, *Leptosphaeria maculans* a *L. biglobosa*. Dříve byli oba považováni za jediný druh, *L. maculans*. Nicméně už v té době byly pozorovány značné rozdíly v agresivitě různých skupin izolátů (patotypů) a rozdíly byly nalezeny i v jejich morfologii. Proto byly později oba druhy od sebe odděleny. Agresivnější izoláty zůstaly v druhu *L. maculans*, méně agresivní izoláty byly přeřazeny do nového druhu *L. biglobosa* (Shoemaker a Brun, 2001). Oba patogeni se v různém poměru vyskytují všude, kde se pěstuje řepka. Jejich biologie je obdobná. Přežívají v rostlinných zbytcích, kde se v průběhu léta formují plodnice s askosporami. Ty jsou během podzimu uvolňovány a šířeny větrem. Po dopadu na listy mladé řepky vyklíčí a způsobují jejich infekci. Na listech pak vznikají nekrotické skvrny. Ty jsou u *L. maculans* obvykle popisovány jako světlejší, bez tmavšího okraje, ale s množstvím pyknid. Naopak u *L. biglobosa* by měly být menší, tmavší s tmavým okrajem a s menším počtem pyknid (např. Koch et al., 1989; Kaczmarek a Jędrzycka, 2011). V této fázi jsou patogeni nekrotrofní.

Později dochází k latentnímu prorůstání jejich mycelia pletivem řápků do báze stonků a kořenového krčku. Toto je fáze biotrofní. V těchto částech potom přejdou oba patogeni opět do fáze nekrotrofní a způsobují zde nekrózy. V důsledku nich mohou rostliny vadnout, usychat a v nejhrošším případě dochází i k jejich lámání. Teoreticky by se *L. maculans* měla vyskytovat blíže báze stonku a způsobovat těžší formu onemocnění, zatímco *L. biglobosa* by měla napadat spíše výše položené části stonku a způsobovat jen mírnější povrchové nekrózy stonku (Koch et al., 1989; Johnson a Lewis, 1994). Podle předchozích zjištění se oba druhy liší i např. citlivostí k fungicidům (Eckert et al., 2010) a také v požadavcích na teplotu. *L. maculans* byla v předchozích studiích zjištěna spíše v teplejších oblastech a *L. biglobosa* spíše v oblastech chladnějších (Kaczmarek et al., 2012). Zatímco je známa řada genů rezistence proti *L. maculans*, u *L. biglobosa* je tato oblast zcela neprobádaná. Přestože je z hlediska výše uvedených rozdílných vlastností obou patogenů užitečné znát jejich zastoupení na určitém území, informace o jejich přítomnosti a rozšíření v ČR byly až dosud omezené. Jedinou podobnou studii omezeného rozsahu zveřejnili Jędrzycka et al. (1998). Cílem naší práce bylo tedy zjistit zastoupení obou patogenů na území ČR plošně i časově (podzim, jaro) a určit jejich podíl na příznacích na různých částech stonku napadených rostlin.

### Rostlinný materiál

Monitoring probíhal v letech 2007-2012 v běžných komerčních porostech i na stanicích výzkumných ústavů. Vzorky listových skvrn byly odebrány na celém území ČR v průběhu října a listopadu. Stonky byly odebrány před sklizní řepky koncem června a začátkem července. Rostlinný materiál byl použit přímo v čerstvém stavu, nebo byl vysušen při laboratorní teplotě a uskladněn pro pozdější rozbory. Stonky byly rozděleny po 4-5 centimetrech na 4 části: horní část stonku, báze stonku, kořenový krček a horní část kořene.

### Extrakce DNA a PCR

Listové léze byly rozdrceny v třecí misce za přítomnosti tekutého dusíku a segmenty stonku byly v suchém stavu nahrubo rozemlety pomocí kulového mlýnu Retsch a potom ještě najemno rozdrceny v třecí misce. Extrakce DNA byla provedena za použití CTAB pufru (1% CTAB, 50mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.7 mM NaCl, 10 mM EDTA, a 20 mM merkaptotetanol). Pro rozlišení obou druhů byly použity primery specifické pro *L. maculans* HV17S/HV26C a primery WV17S/5.8C specifické pro *L. biglobosa* (Mahuku et al., 1996).

## Výsledky a diskuze

---

Celkem bylo v letech 2007-2012 odebráno 1894 vzorků rostlin různých odrůd řepky ze 13 krajů a 152 lokalit. Z toho bylo 1132 vzorků listů s celkem 1454 analyzovanými skvrnami. Dále bylo odebráno 708 bází stonků, z nichž bylo připraveno celkem 2635 analyzovaných vzorků (kořen, kořenový krček, spodní část stonku, horní část stonku).

Ve skvrnách analyzovaných PCR byla samotná *L. maculans* zjištěna v 567 případech, samotná *L. biglobosa* v 223 případech a směná infekce byla prokázána v 369 případech. DNA *L. maculans* byla identifikována v 64 % listových skvrn. Z toho bylo 61 % případů samotné *L. maculans* a 39 % případů směsné infekce oběma patogeny. DNA *L. biglobosa* byla zjištěna v 41 % skvrn, z nichž 38 % bylo infikováno samotnou *L. biglobosa* a 62 % bylo spojeno s oběma patogeny. Ve 20 % skvrn nebyl zjištěn žádný z hledaných patogenů. Je tedy možné, že byly způsobeny např. *Alternaria* spp., ale determinace tohoto patogena nebyla provedena, takže původ těchto skvrn zůstává nejasný.

Z 2635 analyzovaných vzorků stonků byla samotná *L. maculans* prokázána v 5 % a samotná *L. biglobosa* v 35 %. Celkem 15 % vzorků obsahovalo oba patogeny a naopak 43 % segmentů stonku neobsahovalo ani jednoho z nich. Ze 169 segmentů obsahujících pouze *L. maculans* bylo 24 % horní části stonku, 25 % spodní části stonku, 33 % kořenového krčku a 18 % horní části kořene. Z 925 vzorků obsahujících pouze *L. biglobosa* bylo 28 % horní části stonku, 31 % spodní části stonku, 26 % kořenového krčku a 15 % horní části kořene. Ze 401 vzorků obsahujícího oba patogeny bylo 15 % horní části stonku, 18 % spodní části stonku, 41 % kořenového krčku a 18 % horní části kořene. Naše výsledky se tedy neshodují s dřívějšími informacemi o tom, že *L. maculans* převládá na bázi rostlin, zatímco *L. biglobosa* by měla být spíše výše na stonku (např. Johnson a Lewis, 1994). Z 1495 stonkových segmentů, které obsahovaly jednoho nebo oba patogeny, bylo v průměru 62 % infikovaných *L. biglobosa*

buď samostatně, nebo ve směsné infekci. V jednotlivých letech 2007-2012 to bylo 79, 43, 54, 75, 69 a 63 % segmentů. Až na výjimky tedy *L. biglobosa* v bázích stonků převládá. Příčina změny v poměru četnosti výskytu *L. maculans*/*L. biglobosa* mezi podzimem a jarem není zcela jasná. Teoreticky by se sice dala vysvětlit deklarovanou nižší citlivostí *L. biglobosa* k fungicidům (Eckert et al., 2010; Huang et al., 2011), ale v našich pokusech jsme žádné podstatné rozdíly v citlivosti obou patogenů neprokázali (Mazáková, nepublikované výsledky). Jedno z vysvětlení lze najít v různém počtu dnů vhodných pro uvolňování spor obou hub na podzim. Spory *L. maculans* byly ve vzduchu zachyceny lapačem spor častěji, než spory *L. biglobosa* (Kaczmarek et al., 2009). Dalším důvodem může být i to, že některé odrůdy jsou proti *L. maculans* částečně rezistentní, takže její přechod do stonku nemusí být úspěšný.

Společný výskyt obou patogenů byl prokázán ve všech 13 krajích, kde byly vzorky odebrány. Z lokalit, kde byl odebrán více než jeden vzorek listů, byl prokázán společný výskyt na 79 (69 %) z nich. Na 36 lokalitách byla nalezena pouze *L. maculans* a na 5 lokalitách pouze *L. biglobosa*. Společný výskyt obou patogenů byl prokázán i na 86 (87 %) lokalitách, kde byly odebrány stonky. Samotná *L. biglobosa* byla nalezena na 13 lokalitách, zatímco *L. maculans* nebyla samostatně nalezena vůbec. Na území ČR tedy není pozorovatelný žádný posun v podílu obou druhů v závislosti na poloze kraje, jak tomu bylo např. v Polsku nebo v Německu, kde *L. maculans* převažuje v teplejších jižních částech a *L. biglobosa* v chladnějších částech severních (Kaczmarek et al., 2012; Thürwächter et al., 1999). My jsme zjistili převahu *L. maculans* nejen na teplé jižní Moravě, ale i v chladnějších okresech Liberec a Jeseník. I přes deklarovanou nižší škodlivost *L. biglobosa* u jednotlivých rostlin (Koch et al., 1989; Johnson a Lewis, 1994) může tento patogen být v ČR celkově významnější díky četnějšímu výskytu na stoncích před sklizní.

## Použitá literatura

---

- Eckert, M. R., Rossall, S., Selley, A., & Fitt, B. D. (2010). Effects of fungicides on in vitro spore germination and mycelial growth of the phytopathogens *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* (phoma stem canker of oilseed rape). *Pest Management Science*, 66(4), 396–405.
- Huang, Y. J., Hood, J. R., Eckert, M. R., Stonard, J. F., Cools, H. J., King, G. J., Rossall, S., Ashworth, M. & Fitt, B. D. (2011). Effects of fungicide on growth of *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* in relation to development of phoma stem canker on oilseed rape (*Brassica napus*). *Plant Pathology*, 60(4), 607–620.
- Jedryczka, M., Lewartowska, E., Plachka, E. & Ziman L. (1998). Badania nad struktur populacji grzyba *Leptosphaeria maculans* na Morawach i w zachodniej Słowacji. *Rosliny Oleiste*, XIX, 475–486.
- Johnson, R. D., & Lewis, B. G. (1994). Variation in host range, systemic infection and epidemiology of *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathology*, 43(2), 269–277.
- Kaczmarek, J., & Jędryczka, M. (2011). Characterization of two coexisting pathogen populations of *Leptosphaeria* spp., the cause of stem canker of Brassicas. *Acta Agrobotanica*, 64(2), 3–14.
- Kaczmarek, J., Jędryczka, M., Fitt, B. D., Lucas, J. A., & Latunde-Dada, A. O. (2009). Analyses of air samples for ascospores of *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* by light microscopy and molecular techniques. *Journal of Applied Genetics*, 50(4), 411–419.
- Koch, E., Badawy, H. M. A., & Hoppe, H. H. (1989). Differences between aggressive and non - aggressive single spore lines of *Leptosphaeria maculans* in cultural characteristics and phytotoxin production. *Journal of Phytopathology*, 124(1), 52–62.
- Mahuku, G. S., Hall, R., & Goodwin, P. H. (1996). Co-infection and induction of systemic acquired resistance by weakly and highly virulent isolates of *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 49(1), 61–72.
- Shoemaker, R. A., & Brun, H. (2001). The teleomorph of the weakly aggressive segregate of *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal of Botany*, 79(4), 412–419.
- Thürwächter, F., Garbe, V., & Hoppe, H. H. (1999). Ascospore discharge, leaf infestation and variations in pathogenicity as criteria to predict impact of *Leptosphaeria maculans* on oilseed rape. *Journal of Phytopathology*, 147(4), 215–222.

## Kontaktní adresa

---

Prof. Ing. Pavel Ryšánek, CSc. Katedra ochrany rostlin, ČZU v Praze, Kamýcká 129, 165 00 Praha Suchbát, [rysanek@af.czu.cz](mailto:rysanek@af.czu.cz)

Tato práce byla financována z projektů NAZV QJ1310227 a QH81127.