
VIRULENCE OF ISOLATES OF *COLLETOTRICHUM ACUTATUM* TO SELECTED HOST PLANTS AND DETECTION OF ISOLATES BY PCR

Staňková B., Vichová J., Pokorný R., Hrudová E., Holková L.

Department of Crop Science, Breeding and Plant Medicine, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00, Brno, Czech Republic

E-mail: Stankova.b@seznam.cz

ABSTRACT

Colletotrichum acutatum belongs to the polyphagous fungal pathogens in temperate, subtropical and tropical climate. The biggest losses are caused in strawberry production (anthracnose of strawberry) in Central Europe and *Colletotrichum acutatum* has become the most important pathogen of safflower recently. The aim of work was the assessment of the virulence of *Colletotrichum acutatum* isolates obtained from different host plants to young plants of two varieties of safflower (*Carthamus tinctorius* L) and ripe fruits of two strawberry varieties (*Fragaria x ananassa* Duch.).

Conventional PCR using specific primers Col1, Col2, CaInt2 and ITS4 was demonstrated that selected isolates belong to the species *Colletotrichum acutatum* and the specific differences between isolates was detected.

Among the various varieties of safflower was not shown a statistical difference. The most important virulence to experimental plants of both varieties had isolate 1209, isolate thus obtained from safflower. Ripe fruits of variety Pegasus of strawberry were more susceptible to *Colletotrichum acutatum* than fruits of variety Elkas. Isolate 710, isolated from *Hypericum perforatum* L., showed the highest virulence in terms of the index of infection intensity. The frequency of infection of strawberry fruits almost always reached 100%, which led to the conclusion that the strawberry fruits were sensitive to selected isolates of the pathogen significantly. We proved that isolates of pathogen had different virulence to different plant species.

Key words: *Colletotrichum acutatum*, *Carthamus tinctorius*, *Fragaria x ananassa*, virulence, cross-infection, PCR

Acknowledgments: This project was supported by IGA AF MENDELU Brno No. IP 17/2010, IGA AF MENDELU Brno No. TP 4/2010 and NAZV Mze No. QH811029: Innovation protection of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) against important fungal pathogens.

ÚVOD

Colletotrichum acutatum J. H. Simmonds patří mezi polyfágní houbové patogeny s kosmopolitním rozšířením způsobující významné ztráty na produkci hospodářských plodin (Peres et al., 2005) jako jsou např. jahodník velkoplodý (*Fragaria x ananassa* Duch.), jablňo (*Malus pumila* Mill. a *Malus sylvestris* Mill.), třešeň (*Prunus cerasus* L.), paprika roční (*Capsicum annuum* L.), rajče jedlé (*Lycopersicon esculentum* Mill.), lupina mnoholistá (*Lupinus polyphyllus* Lindl.) (Sreenivasaprasad, Talhinhos, 2005), mandloň obecná (*Prunus dulcis* Mill.), olivovník evropský (*Olea europaea* L.), papája melounová (*Carica papaya* L.), citrusy (*Citrus* spp.). Hostiteli *C. acutatum* jsou i některé okrasné rostliny a jehličnany (Guerber et al., 2003). *Colletotrichum acutatum* je v současnosti hospodářsky nejzávažnějším patogenem světlice barvířské (*Carthamus tinctorius* L.) (Víchová, 2009).

Colletotrichum acutatum je původcem onemocnění nazývaného antraknóza, jenž je především u jahod klíčovým onemocněním způsobujícím až 80% odumírání rostlin a 50% ztráty na produkci (Debode et al., 2009). Všeobecně patogen napadá jak klíčící, tak i plně vzrostlé rostliny a příznaky choroby se projevují na listech, stoncích, květních částech. Typickými příznaky onemocnění na plodech jsou okrouhlé či hranaté, propadlé skvrny, na kterých je po určité době zřetelná naoranžovělá masa spor. Při silnějším infekčním tlaku léze splývají (Lewis Ivey et al., 2004). U rostlin, kde patogen napadá bylinnou část, jsou charakteristickými symptomy nepravidelné či okrouhlé skvrny na listech, které se později slévají a listy zasychají. Na stoncích jsou rovněž nepravidelné, vpadlé, hnědé skvrny, na nichž se po určité době objevují oranžové masy spor. U *C. acutatum* byla také prokázána latentní infekce (Šindelková et al., 2008), jež je hlavní příčinou velkého rozšíření patogena (Debode et al., 2009). U *Colletotrichum acutatum* existuje i značná vnitrodruhová variabilita projevující se fenotypově, ale i genotypově, což by mohlo mít vliv na virulenci patogena (Sreenivasaprasad, Talhinhos, 2005; Guerber et al., 2003).

Z hlediska systému patří *Colletotrichum acutatum* do třídy *Ascomycetes*. Rozmnožuje se konidiami (velikost 8 - 16 x 2,5 - 4 µm, většinou oválného tvaru s tenkou buněčnou stěnou, bez přehrádek, barva je hyalinní) (Kloutvorová et al., 2007), které se tvoří neomezeně a šíří se větrem a vodou, např. prosakováním, zálivkou, deštěm. Optimální podmínky pro rozvoj infekce je teplota 25 °C a oteplení po dešťových srážkách. K infekci však dochází i při širším rozmezí teplot (18 - 33 °C), vysoké relativní vlhkosti vzduchu (95 - 100 %) a ovlhčení závlahou, rosou či srážkami po dobu 13 hodin a více. Inkubační doba je pouze několik dní (Šindelková et al., 2008).

Pro detekci rodu *Colletotrichum*, jeho druhů a popřípadě i vnitrodruhových skupin se v současné době, kromě klasických diagnostických metod, používá molekulární genetická metoda PCR. Pro

tuto práci byla zvolena konvenční PCR a specifické primery pro ověření rodové a následně druhové pravosti.

Cílem této práce bylo stanovit virulenci vybraných izolátů *Colletotrichum acutatum* získaných z různých hostitelských rostlin na vybrané hostitele - jedná se o tzv. křížovou infekci - a pomocí PCR stanovit rodovou i druhovou pravost a zjistit vnitrodruhové odlišnosti prostřednictvím primerů navržených do variabilních oblastí DNA patogena.

MATERIÁL A METODIKA

Pro hodnocení virulence vybraných izolátů patogena *Colletotrichum acutatum* byly zvoleny dva hostitelské rostlinné druhy – světlice barvířská (*Carthamus tinctorius* L.) a jahodník velkoplodý (*Fragaria x ananassa* Duch.). Od obou druhů byly vybrány dvě odrůdy.

Izoláty. Celkem bylo zkoušeno devět izolátů *Colletotrichum acutatum* různého rostlinného původu (viz *Tabulka č. 1*). Pro zajištění čistoty byly ze všech izolátů patogena připraveny monosporecké izoláty a kultury byly kultivovány na PDA za vhodných podmínek pro sporulaci.

Tabulka č. 1 Testované izoláty Colletotrichum acutatum a jejich původ

Izolát	Rostlina	Dodavatel		Provedený test
CBS 786.86	<i>Malus sylvestris</i>	CBS		Virulence, PCR
CBS 292.67	<i>Capsicum annuum</i>	CBS		Virulence, PCR
CBS 112202	<i>Fragaria x ananassa</i>	CBS		PCR
PCF 231	<i>Fragaria x ananassa</i>	PCFruit		Virulence, PCR
PCF 437	<i>Lupinus alba</i>	PCFruit		Virulence, PCR
710	<i>Hypericum perforatum</i>	ÚPŠRR Brno	MENDELU	Virulence, PCR
608	<i>Carthamus tinctorius</i>	ÚPŠRR Brno	MENDELU	PCR
1109	<i>Carthamus tinctorius</i>	ÚPŠRR Brno	MENDELU	PCR
1209	<i>Carthamus tinctorius</i>	ÚPŠRR Brno	MENDELU	Virulence, PCR

Inokulace světlice barvířské. U světlice barvířské byla virulence jednotlivých izolátů testována na odrůdách Sabina (registrovaná v ČR) a India. Obě tyto odrůdy byly získány z VÚP Troubsko. Na třítydenní rostliny světlice barvířské se dvěma až třemi páry pravých listů bylo pomocí ručního postřikovače aplikováno 20 ml roztoku inokula o koncentraci $8,1 \times 10^4$ konidií/ml. Rostliny byly zabaleny na 48 hodin do mikroténové fólie, aby byla udržena potřebná vlhkost vzduchu a ovlhčení listů pro správný růst patogena, a umístěny do kultivační místnosti s řízenou teplotou 25 °C. Po 4 - 5 dnech od inokulace bylo hodnoceno napadení rostlin, pozornost byla vždy soustředěna na poslední (tedy nejmladší) tři listy, dle vytvořené stupnice: stupeň 1 – zdravý list, stupeň 2 – jednotlivé skvrny na listu, stupeň 3 – polovina listu napadena (seschlá), stupeň 4 – celý list napaden (suchý) viz *Obr. 1*.

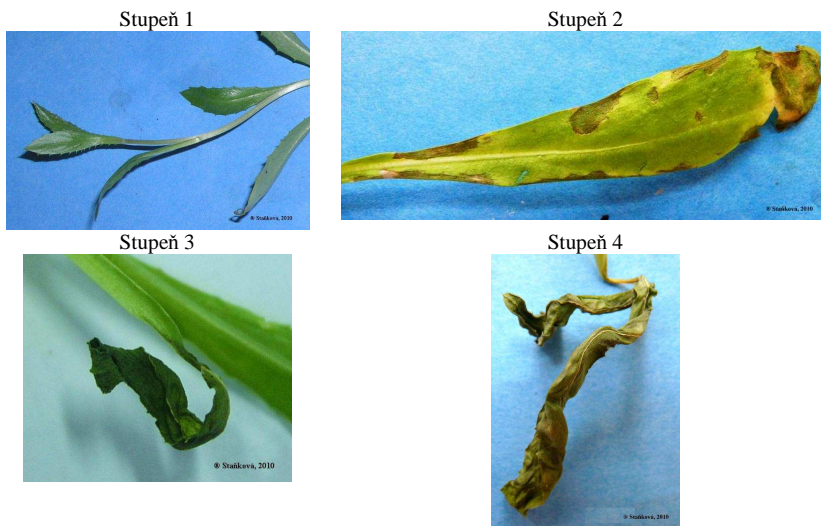
Inokulace jahodníku velkoplodého. U jahodníku velkoplodého byla virulence hodnocena na zralých plodech odrůd Elkas a Pegasus zakoupených v Jahodárně Bratčice. Plody byly pečlivě umyty, aby se odstranily posklizňové nečistoty, povrchově vydezinfikovány 3% chlornanem sodným a opláchnuty destilovanou vodou. Po osušení byly plody poraněny sterilní jehlou a do rány bylo pomocí pipety nainokulováno 10 μ l suspenze se spory o koncentraci $8,1 \times 10^4$ konidií/ml. Plody byly vyskládány dle jednotlivých izolátů na umělohmotná plata, kde před tím byla na dno - pro následné udržení zvýšené vlhkosti vzduchu v okolí vzorku - položena textilie a filtrační papír dostatečně nasycené destilovanou vodou. Plata s plody byla přenesena do kultivační místnosti a důkladně zabalena do mikrotenové fólie na 48 hodin. Inkubace probíhala při teplotě kolem 25 °C. Po 4 dnech od inokulace byla vizuálně hodnocena schopnost patogenity jednotlivých kmenů *Colletotrichum acutatum* dle vytvořené stupnice: 1 – zdravý plod, 2 – do 20 % plodu napadeno včetně, 3 – do 50 % plodu napadeno včetně, 4 – do 75 % napadeno včetně, 5 – do 100 % napadeno (viz Obr. 2).

Extrakce DNA. Izoláty *Colletotrichum acutatum* byly kultivovány na Petriho miskách na PDA při teplotě 25 °C po dobu 10 – 14 dnů. Pomocí tekutého dusíku bylo mycelium v třecí misce důkladně rozmělněno a dále se při extrakci DNA postupovalo dle protokolu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

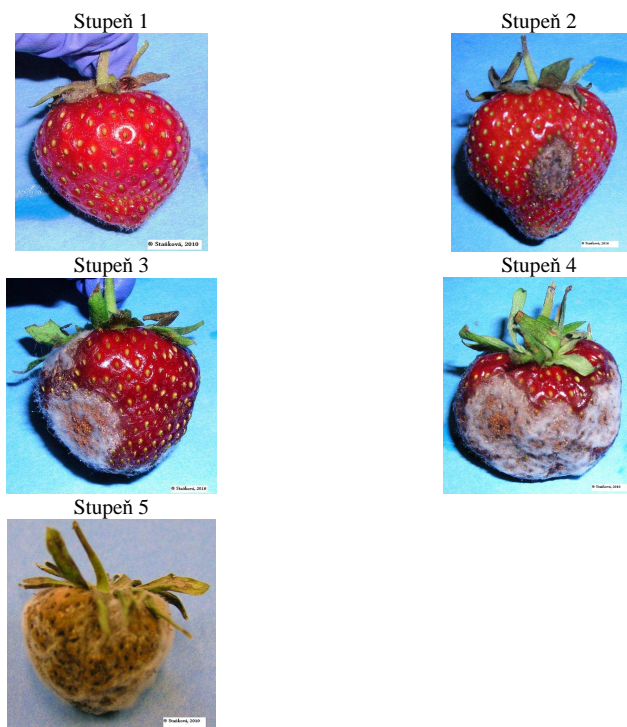
PCR reakce. Pro rodovou detekci byl použit primer Col1 a reverzní primer Col2, pro druhovou detekci byl použit druhově specifický primer CaInt2 a reverzní primer ITS4 nasedající do variabilnějších oblastí ITS1 a ITS2 genu 5.8S (Garrido et al., 2009).

Amplifikace s rodově specifickými primery probíhala: počáteční denaturace 3 min při 94 °C, následovalo 40 cyklů 1 min při 94 °C, 1 min při 56 °C a 1 min při 72 °C a na závěr jeden 10 min cyklus při 72 °C. Amplifikace s druhově specifickými primery se skládala: počáteční denaturace 3 min při 94 °C, následovalo 35 cyklů 30 s při 94 °C, 30 s při 60 °C, 2 min při 72 °C a na konec jeden cyklus 10 min při 72 °C. Produkty byly odděleny na 1% agarose pomocí elektroforézy a zviditelněny ethidium bromidem pod UV lampou (Garrido et al., 2008).

Sekvenování. Jednotlivé produkty byly izolovány z gelu, přečištěny dle protokolu MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) a odeslány na sekvenování na Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat MENDELU v Brně. Přečtené sekvence byly porovnány se sekvencemi v GenBank.



Obr. 1 Stupnice napadení světlice barvířské *Colletotrichum acutatum*



Obr. 2 Stupnice napadení plodů jahodníku velkoplodého *Colletotrichum acutatum*

Statistické vyhodnocení. V rámci testování byly nezávisle hodnoceny tři soubory izolátů.

Výsledky byly statisticky zpracovány programem UNISTAT, a to nejprve vícefaktorovou ANOVA (pro světlici barvířskou - faktor: odrůda, izolát, list, pro jahodník – faktor: odrůda, izolát) a následně vyhodnoceny Tukey-HSD testem. Dále byla provedena jednofaktorová analýza (faktor izolát) odděleně pro každou odrůdu jednotlivých testovaných souborů pro porovnání virulence izolátů v rámci dané odrůdy (*Tabulka č. 2, č. 3, č.4*).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Ze statistického zpracování dat získaných z hodnocení virulence pro světlici barvířskou a jahodník velkoplodý lze stanovit tyto výsledky.

Soubor A - světlice barvířská: Mezi odrůdami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl, jak v četnosti napadení, tak i v indexu napadení. Mezi jednotlivými listy rovněž nebyl statisticky významný rozdíl v četnosti a i v indexu napadení. Statistické rozdíly mezi testovanými izoláty u odrůdy Sabina a India demonstruje *Tabulka č. 2*. U odrůdy Sabina i India byly všechny izoláty mezi sebou statisticky rozdílné v indexu i četnosti napadení, přičemž nejnižší míru virulence vykazoval izolát 231 a nejvyšší izolát 1209, a to u obou odrůd.

Soubor B - světlice barvířská: Mezi odrůdami z hlediska četnosti a indexu napadení nebyly statisticky významné rozdíly. V indexu napadení byly statistické rozdíly mezi 1. a 2. - 3. listem, v četnosti napadení se již odlišnosti nevykázaly. *Tabulka č. 3* ukazuje rozdíly mezi sledovanými izoláty u jednotlivých odrůd. Při hodnocení indexu a četnosti napadení byly statistické rozdíly mezi izoláty 710, 29267 a 1209 jak u odrůdy Sabina, tak u odrůdy India, přičemž nejméně virulentní byl izolát 710 a nejvíce izolát 1209.

Soubor C - jahodník: Mezi odrůdami Pegasus a Elkas byly zjištěny statisticky průkazné rozdíly. Mezi izoláty – při testování napříč odrůdami – v indexu napadení statistické rozdíly nebyly, v četnosti napadení se statistické rozdíly potvrdily mezi izoláty 29267 a 1209. Při hodnocení izolátů u jednotlivých odrůd (viz *Tabulka č. 4*) nebyly zjištěny v indexu napadení ani u jedné odrůdy statistické rozdíly. U četnosti napadení nebyly potvrzeny žádné statistické rozdíly mezi izoláty u odrůdy Pegasus, u odrůdy Elkas byly statisticky průkazné rozdíly mezi izolátem 29267 a izoláty ostatními. Nevyšší míru virulence vykazoval u odrůdy Pegasus izolát 710 a nejnižší izolát 231, u odrůdy Elkas nejvyšší opět izolát 710 a nejnižší izolát 29267.

Tabulka č. 2 Stanovení hladiny virulence u izolátů Colletotrichum acutatum pro jednotlivé odrůdy světlice – soubor A

Izolát	Sabina		India	
	Index průměr	Četnost průměr	Index průměr	Četnost průměr
231	1,02 ^A	2,22 ^A	1,23 ^A	13,33 ^A
437	1,59 ^B	23,33 ^B	1,89 ^B	41,11 ^B
1209	2,99 ^C	88,89 ^C	2,97 ^C	86,67 ^C

Pozn.: Odlišná velká písmena označují statisticky průkazně odlišné skupiny ($\alpha=0,05$)

Tabulka č. 3 Stanovení hladiny virulence u izolátů *Colletotrichum acutatum* pro jednotlivé odrůdy světlice - soubor B

Izolát	Sabina		India	
	Index	Četnost	Index	Četnost
	průměr	průměr	průměr	průměr
710	1,08 ^A	7,78 ^A	1,17 ^A	12,22 ^A
29267	1,19 ^A	13,33 ^A	1,24 ^A	16,67 ^A
1209	3,02 ^B	100,00 ^B	3,19 ^B	82,22 ^B

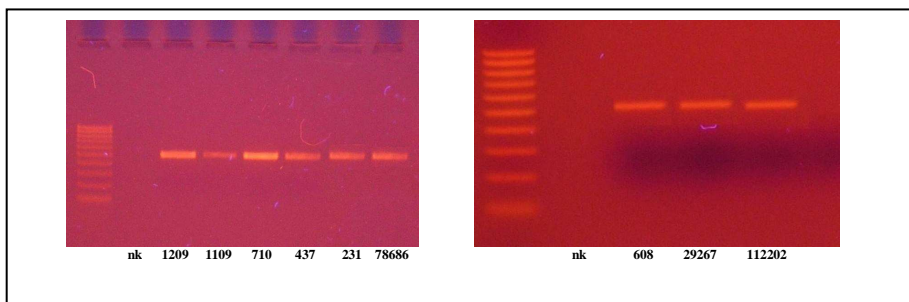
Pozn.: Odlišná velká písmena označují statisticky průkazně odlišné skupiny ($\alpha=0,05$)

Tabulka č. 4 Stanovení hladiny virulence u izolátů *Colletotrichum acutatum* pro jednotlivé odrůdy jahodníku – soubor C

Izolát	Pegasus		Elkas	
	Index	Četnost	Index	Četnost
	průměr	průměr	průměr	průměr
231	3,60 ^A	96,67 ^A	2,63 ^A	100,00 ^B
29267	3,87 ^A	100,00 ^A	2,17 ^A	73,33 ^A
78686	4,00 ^A	100,00 ^A	2,67 ^A	96,67 ^B
1209	4,07 ^A	100,00 ^A	2,23 ^A	100,00 ^B
437	4,20 ^A	100,00 ^A	2,67 ^A	96,67 ^B
710	4,23 ^A	100,00 ^A	2,70 ^A	96,67 ^B

Pozn.: Odlišná velká písmena označují statisticky průkazně odlišné skupiny ($\alpha=0,05$)

Molekulárně genetickou metodou PCR pomocí specifických primerů Col1 a Col2 bylo u všech testovaných izolátů potvrzeno, že náleží do rodu *Colletotrichum*. Velikost produktu byla stanovena na 460 bp. Prostřednictvím druhově specifických primerů Calnt2 a ITS4 bylo prokázáno, že všechny izoláty patří do druhu *Colletotrichum acutatum* o velikosti produktu 490 bp (Obr. 3)



Pozn.: nk znamená negativní kontrola

Obr. 3 Vizualizace PCR produktů: *C. acutatum* – specifické produkty o velikosti 490 bp získané primery Calnt2-ITS4

Osekvenováno bylo celkem 6 izolátů - izolát 1209, 1109, 710, 437, 231, 78686 - izoláty z rozdílných druhů rostlin a pomocí programu ClustalW2 byly porovnány mezi sebou za účelem

hodnocení jejich vnitrodruhové variability. Bylo zjištěno, že vybraná oblast ITS1, 5.8S, ITS2 není příliš variabilní oblastí, přesto zde byly objeveny bodové mutace, kterými vznikly určité malé rozdíly mezi jednotlivými izoláty získaných z různých druhů rostlin. Izolát 78686 se bodovou mutací lišil od ostatních izolátů. Izoláty 78686 a 231 byly odlišné třemi bodovými mutacemi od zbylých a izoláty 710, 437 a izoláty 1209 a 1109 byly od ostatních rozdílné v jedné bodové mutaci. Testované izoláty byly srovnány s jinými izoláty *Colletotrichum acutatum* z genové banky Genbank, kde byly potvrzeny další vnitrodruhové odlišnosti.

ZÁVĚR

Na základě provedených hodnocení lze říci, že virulence jednotlivých izolátů *Colletotrichum acutatum* pro světlíci barvířskou a jahodník velkoplodý byla různá. Nejvýznamněji na pokusné rostliny světlíce působil izolát 1209, tedy izolát získaný ze světlíce. U jahodníku velkoplodého byla ke *Colletotrichum acutatum* náchylnější pozdní odrůda Pegasus a nejvyšší virulenci vykazoval pro obě odrůdy z hlediska indexu napadení izolát 710 vyzolovaný z třešalky, naopak nejnižší virulenci pro odrůdu Pegasus měl izolát 231 vyzolovaný z jahodníku a pro odrůdu Elkas izolát 29267 z papriky. Izolát 710 prokázal i odlišnou virulenci v rámci hostitelských druhů rostlin – zatímco pro obě odrůdy jahodníku měl nejvyšší hodnotu indexu napadení, tedy virulence, pro odrůdy světlíce (hodnotícího souboru B) vykazoval virulenci nejnižší. Četnost napadení plodů jahodníku téměř vždy dosahovala 100 %, z čehož plyne závěr, že plody jahodníku byly k vybraným izolátům patogena výrazně citlivé.

Pokus tedy potvrdil rozdílnou virulenci *Colletotrichum acutum* schopného infikovat různé rostlinné hostitele napříč rody i čeleděmi a metodou PCR prokázal, že mezi vybranými izoláty byla mírná vnitrodruhová variabilita určitým způsobem mající i pravděpodobně souvislost s hostitelským rostlinným druhem (izoláty 78686, 231 čeleď *Rosaceae* 3 bodové mutace, izoláty 1209, 1109 čeleď *Asteraceae* 1 bodová mutace odlišující tyto izoláty od ostatních).

LITERATURA

- Debode, J. et al. Quantitative detection and monitoring of *Colletotrichum acutatum* in strawberry leaves using real-time PCR. *Plant Pathology* 58, 2009. s. 504 - 514.
- Garrido, C. et al. Development of protocols for detection of *Colletotrichum acutatum* and monitoring of strawberry anthracnose using real-time PCR. *Plant Pathology* 58, 2009. s. 43 – 51.
- Garrido, C. et al. Isolation and pathogenicity of *Colletotrichum* spp. causing anthracnose of strawberry in south west Spain. *Eur J Plant Pathology* 120, 2008. s. 409 – 415.
- Guerber, J., C. et al. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum sensu lato* by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. *Mycologia*, 95(5), 2003. s. 872–895.
- Kloutvorová, J. et al. *Colletotrichum acutatum* Simmonds - biologie, hospodářský význam, možnosti ochrany - 2007. Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy, 2007, literární rešerše.

Lewis Ivey, M., L. et al. Identification and management of *Colletotrichum acutatum* on immature bell peppers. *Plant Disease* 88, 2004. s. 1198 - 1204.

Peres, N., A. et al. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease* 89 (8), 2005. s. 784-796.

Sreenivasaprasad, S., Talhinhos, P. Genotypic and phenotypic diversity in *Colletotrichum acutatum*, a cosmopolitan pathogen causing anthracnose on a wide range of hosts. *Molecular Plant Pathology* 6 (4), 2005. s. 361-378.

Šindelková, M. et al. *Původce antraknózy jahodníku Colletotrichum acutatum*. Ministerstvo zemědělství ve spolupráci se Státní rostlinolékařskou správou. Praha, 2008.

Víchová, J. Ústní sdělení. [cit. 2009-10-04].