

Ing. Blanka Pekárová: **Využití imunochemických metod pro diagnostiku
fytopatogenních hub**
Školitel: **Prof. Ing. Jan Káš, DrSc. - VŠCHT
RNDr. Jiřina Krátká, DrSc. - VÚRV**
Studijní program: **Chemie**
Studijní obor: **Biochemie**
Datum obhajoby: **29.3.2001**

SOUHRN

Předkládaná dizertační práce se zabývá využitím imunochemických metod pro diagnostiku hub *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae* (patogen rajčete), *Phytophthora fragariae* (karanténní patogen jahodníku) a *Fusarium culmorum* (hospodářsky významný patogen ozimé pšenice).

Z myceliální hmoty jmenovaných hub byly ve formě rozpustných proteinových extraktů izolovány antigeny, které byly použity k imunizaci laboratorních králíků a myši a pro imunochemická stanovení. Antigeny byly připraveny i z myceliální hmoty dalších druhů rodů *Phytophthora* a *Fusarium*. V antigenech byl stanoven celkový obsah proteinů a byla provedena elektroforetická separace nativních a disociovaných proteinů. Na základě této analýzy bylo zjištěno, že složení kultivačních médií ovlivnilo kvalitu a kvantitu antigenních proteinů.

Polyklonální protilátky (frakce IgG) byly izolovány ze séra intramuskulárně imunizovaných králíků. Monoklonální protilátky (frakce IgG) byly izolovány ze supernatantů hybridomů rostoucích *in vitro*. Pomocí ELISA byla stanovena jejich citlivost a specifita.

Specifita polyklonálních i monoklonálních protilátek vyvinutých pro diagnostiku *P. nicotianae* var. *nicotianae* a *P. fragariae* byla rodová – protilátky reagovaly i s ostatními druhy rodu *Phytophthora*. Polyklonální protilátky proti *P. nicotianae* var. *nicotianae* měly slabou křížovou reakci s houbou *Verticillium albo-atrum* a protilátky proti *P. fragariae* s houbou *Pythium ultimum*. Křížové reakce protilátek s dalšími patogeny, které byly izolovány z hostitelských rostlin, nebyly zjištěny. Protilátky vyvinuté pro diagnostiku *P. nicotianae* var. *nicotianae* byly použity k detekci tohoto patogena v mladých rostlinách rajčete. *P. nicotianae* var. *nicotianae* byla detekována v kořenech a kořenových krčcích rostlin, které byly uměle inokulovány. Tyto protilátky detekovaly i houbu *Phytophthora infestans* v přirozeně infikovaných plodech a rostlinách rajčete a v uměle infikované bramborové hlíze. K detekci byla použita PTA-ELISA. Protilátky připravené pro diagnostiku *P. fragariae* byly použity k detekci *P. fragariae* v uměle inokulovaných rostlinách jahodníku. Detekce patogena byla optimální v nepoškozených kořenech, případně v kořenech s nekrotizovanými špičkami. Při větší nekrotizaci kořene bylo vhodné stanovit přítomnost houby v kořenovém krčku. K detekci byly použity PTA-ELISA a imunoprint. Těmito protilátkami byla v kořenech uměle inokulovaného jahodníku detekována i houba *Phytophthora cactorum* – další patogen jahodníku.

Specifita polyklonálních a monoklonálních protilátek vyvinutých pro diagnostiku *F. culmorum* byla testována pomocí PTA-ELISA, imunoblotu a nepřímé imunofluorescenční mikroskopie. Protilátky reagovaly s ostatními druhy rodu *Fusarium*. Křížové reakce s dalšími patogeny, které napadají ozimou pšenici, nebyly zjištěny. Protilátky byly použity k detekci *F. culmorum* v uměle inokulovaných obilkách a koleoptilích ozimé pšenice. Detekce patogena byla optimální 1-2 dny po inokulaci, kdy nebyly na rostlinném materiálu pozorovány symptomy infekce. Patogen byl detekován použitím technik PTA-ELISA, imunoblot a nepřímá imunofluorescenční mikroskopie.

Phytophthora nicotianae var. *nicotianae*, *Phytophthora fragariae*, *Fusarium culmorum*, rajče, jahodník, ozimá pšenice, antigeny, monoklonální a polyklonální protilátky, detekce, PTA-ELISA, imunoprint, dot-blot, nepřímá imunofluorescenční mikroskopie.

Ing. Blanka Pekárová: Use of immunochemical methods for the diagnosis of phytopathogenic fungi
Supervisor: Prof. Ing. Jan Káš, DrSc. – ICT
RNDr. Jiřina Krátká, DrSc. - RICP
Study programme: Chemistry
Study subprogramme: Biochemistry
Date of defence: 29.3.2001

SUMMARY

This thesis deals with the use of immunochemical methods for the diagnosis of *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae* (a pathogen of tomato), *Phytophthora fragariae* (a quarantine pathogen of strawberry) and *Fusarium culmorum* (an important pathogen of winter wheat).

Antigens, in the form of soluble protein extracts, were isolated from the mycelial mats of these fungi. The antigens were used for the immunization of laboratory rabbits and mice as well as for immunochemical estimations. Another antigens were prepared from the mycelial mats of other *Phytophthora* and *Fusarium* species. Total content of proteins was estimated and electrophoretic separation of native and dissociated proteins was performed on obtained antigens. Based on this analysis, it was found that the cultivating media affected both quality and quantity of antigen proteins.

Polyclonal antibodies (IgG fraction) were isolated from serum of intramuscularly immunized rabbits. Monoclonal antibodies (IgG) were isolated from the supernatant of hybridomas growing *in vitro*. In both cases, ELISA was used to estimate antibody sensitivity and specificity.

Polyclonal and monoclonal antibodies developed for the diagnosis of *P. nicotianae* var. *nicotianae* a *P. fragariae* were genus specific. Polyclonal antibodies raised against *P. nicotianae* var. *nicotianae* had weak cross-reactions with *Verticillium albo-atrum* while antibodies raised against *P. fragariae* slightly cross-reacted with *Pythium ultimum*, only. Cross-reactions of antibodies with other pathogens isolated from host plants were not detected. Polyclonal and monoclonal antibodies developed to *P. nicotianae* var. *nicotianae* were used to detect this pathogen in young tomato plants. *P. nicotianae* var. *nicotianae* was detected in roots and crowns of artificially inoculated plants. These antibodies also detected pathogen *Phytophthora infestans* in naturally infected tomato fruits and plants and in artificially inoculated potato tubers. The pathogen was detected using PTA-ELISA. Antibodies to *P. fragariae* were used for the detection of this pathogen in artificially inoculated strawberry plants. Detection of the pathogen was reliable in undamaged roots or in roots with necrotised tips. If roots were damaged, it was still possible to detect the pathogen in the crown. PTA-ELISA and immunoprint were used to detect the pathogen. Using these antibodies, another pathogen of strawberry, *Phytophthora cactorum*, was detected in artificially inoculated plants.

The specificity of antibodies developed for the diagnosis of *F. culmorum* was tested using PTA-ELISA, immunoblot and indirect immunofluorescent microscopy. All antibodies (either polyclonal or monoclonal) were genus specific and did not cross-react with other fungal pathogens of winter wheat. Antibodies were used to detect *F. culmorum* in artificially inoculated kernels and coleoptiles of winter wheat. Detection of this pathogen was reliable 1-2 days after inoculation, i.e. when no disease symptoms were visible. The pathogen was detected using ELISA, immunoblot and indirect immunofluorescent microscopy.

Phytophthora nicotianae var. *nicotianae*, *Phytophthora fragariae*, *Fusarium culmorum*, tomato, strawberry, winter wheat, antigens, monoclonal and polyclonal antibodies, detection, PTA-ELISA, immunoprinting, dot-blot, indirect immunofluorescent microscopy.