

## WYKORZYSTANIE TESTU PCR W MONITOROWANIU POPULACJI ALTERNARIA W UPRAWIE ZIEMNIAKA

### THE USE OF THE PCR TEST IN MONITORING THE ALTERNARIA POPULATION IN POTATO CROPS

mgr inż. Hanna Gawińska-Urbanowicz<sup>1</sup>

mgr Anna Pawłowska<sup>2</sup>, dr inż. Jerzy Osowski<sup>1</sup>

IHAR-PIB Oddział w Boninie, <sup>1</sup>Pracownia Ochrony Ziemniaka

<sup>2</sup>Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Biochemii, e-mail: h.gawinska@wp.pl

#### Streszczenie

Sprawcy alternariozy ziemniaka, *Alternaria solani* i *A. alternata*, od kilkunastu lat mają wpływ na zdrowotność upraw zarówno towarowych, jak i nasiennych. W miarę rozwoju choroby stosunek ilościowy, w jakim występują oba gatunki, zmienia się i zależy m.in. od terminu i regionu występowania. Ocenę zmian sezonowych w składzie populacji grzybów w latach 2016-2018 przeprowadzono w Boninie na materiale pozyskanym z cotygodniowych ekspertyz chorych liści naturalnie zainfekowanych patogenami z rodzaju *Alternaria*. Największy wysyp zarodników konidialnych zarejestrowano w lipcu i sierpniu. W zebranej populacji dominowały zarodniki *A. alternata*. Monitorowanie stanu zagrożenia alternariozą na plantacji ziemniaka w doświadczeniach laboratoryjnych prowadzono metodą molekularną (test PCR) oraz mikroskopową, analizując wyrosłe kultury patogenów.

**Słowa kluczowe:** *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, alternarioza, metoda mikroskopowa, odmiany, reakcja łańcuchowa polimerazy, PCR, ziemniak

#### Abstract

The perpetrators of potato early blight, *Alternaria solani*, and *A. alternata* have had an impact on the health of both commodity and seed crops for several years. As the disease develops, the quantitative ratio in which both species occur varies and depends, among others, by date and region of occurrence. The assessment of seasonal changes in the composition of the mushroom population in the years 2016-2018 was carried out in Bonin on material obtained from the weekly expertise of diseased leaves naturally infected with pathogens of the genus *Alternaria*. The largest outbreak of conidial spores was recorded in July and August. Spores of *A. alternata* dominated in the collected population. The threat of early blight on potato plantations was monitored by molecular (PCR) and microscopic methods, as well as microbiologically by analyzing the grown cultures of field-collected pathogens.

**Keywords:** *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, cultivars, early blight, microscopic method, polymerase chain reaction, PCR, potato

**M**oment pojawienia się alternariozy na roślinach ziemniaka jest bardzo ważny. Im wcześniej zarejestrujemy pojaw, tym większe straty może spowodować choroba. Wczesne jej wystąpienie na roślinach może świadczyć o zaistnieniu korzystnych dla rozwoju patogenu warunków atmosferycznych. Sprawcy alternariozy atakują rośliny osłabione, a infekcja rozpoczyna się na najstarszych, dolnych liściach.

Na początkowym etapie zainfekowania roślin grzybami miejsca zmian chorobowych na powierzchni blaszki liściowej nie różnią się istotnie morfologicznie. Stąd choroba ta określana jest wspólnym mianem – jako alternarioza.

Równoczesne występowanie na roślinach ziemniaka wielu chorób, których objawy są często bardzo podobne do siebie, wymaga od producenta nie tylko poznania ich objawów w celu identyfikacji, ale też zastosowania właściwej ochrony. Dlatego diagnostyka staje się jednym z ważnych elementów w nowoczesnej ochronie roślin. W celu podniesienia jej jakości poszukiwane są możliwie najkorzystniejsze rozwiązania, które polepszą wykrywalność i identyfikację groźnych patogenów (Łozowska, Gawińska-Urbanczyk 2016).

Ocena zagrożeń ze strony agrofagów jest podstawowym elementem w diagnostyce. Systematyczne obserwacje, czyli monitorowanie plantacji przez cały sezon wegetacyjny, umożliwia poznanie aktualnych zagrożeń dla roślin. Celem lustracji jest ocena nasilenia choroby, a następnie wyznaczenie optymalnego terminu zabiegów ochrony.

Monitorowanie stanu zagrożenia alternariozą na plantacji ziemniaka w doświadczeniach obejmuje:

- ocenę makroskopową (wstępna identyfikacja uszkodzeń);
- ocenę mikroskopową (zbiór części roślin z objawami choroby, izolacja na podłoża agarowe i identyfikacja wyrosłych kultur patogenu);
- ocenę wolumetryczną (systematyczna ocena stężenia zarodników grzybów z rodzaju *Alternaria* w powietrzu z wykorzystaniem pułapki Burkarda);

- ocenę molekularną (analiza fragmentu materiału genetycznego – technika PCR, czyli reakcja łańcuchowa polimerazy).

### Materiał i metody

Z uwagi na występujące morfologicznie podobieństwa objawów występowania sprawców alternariozy na roślinie ziemniaka w badaniach wykorzystano test oparty na technice PCR, który pozwala wykryć obecność patogenu w niewielkiej jego koncentracji w ciągu kilku godzin.

Pomiar obecności zarodników grzybów z rodzaju *Alternaria* prowadzono przez cztery miesiące, nieprzerwanie od 1 czerwca do 1 października, od fazy zwarcia roślin w międzyrzędziach (BBCH 30-39) do zbioru plonu (BBCH 90-99). Materiał roślinny z poletek doświadczalnych (odmiany ziemniaka bardzo wczesne i wczesne – Justa, Miłek, Innowator i Oman, średnio wczesne – Cekin i Irga, średnio późne i późne – Danuta, Promyk, Kuras i Pokusa) z objawami alternariozy na liściach pobierano co 7 dni. Liście przeznaczone do izolacji DNA pobierano jałowo i przechowywano w warunkach głębokiego zamrożenia w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ , która zabezpieczała tkanki roślin przed degradacją i kontaminacją. Zebrany cotygodniowo materiał do badań ucierano w mrożdzierzu z 10 ml ciekłego azotu, a następnie rozdrobnioną świeżą masę roślinną w ilości 100 mg przenoszono do odpowiednio oznaczonych probówek typu Eppendorf i zamrażano.

Izolację genomowego DNA z materiału roślinnego przeprowadzono zgodnie z procedurą Genomic Mini AX Plant Spin (A&A Biotechnology).

Kolejnym etapem prac po wyizolowaniu i oczyszczeniu DNA była reakcja PCR. Proces powielenia wybranego fragmentu DNA przeprowadzono z wykorzystaniem urządzenia o nazwie termocykler. Mieszaninę reakcyjną, zachowując proporcje jej składników, przygotowano z nukleotydów, starterów, próbki DNA, polimerazy oraz buforu reakcyjnego zawierającego jony magnezu. Istotnym elementem mieszaniny są startery, czyli zaprojektowane fragmenty DNA komplementarne do poszukiwanego fragmentu, jakim jest *Alternaria solani* i *A. alternata* (tab. 1).

Tabela 1

**Startery wykorzystane w pracy  
do specyficznego wykrywania *A. solani* i *A. alternata* za pomocą PCR\***

Nazwa starterów	Sekwencja nukleotydowa	Długość produktu PCR (liczba par zasad – pz)
<i>Alternaria solani</i>		
A. solani F	5'-CAC CAC AAG GAC CAA CCC A-3'	355 pz
A. solani R	5'-TGG GGC TGG AAG AGA GCG-3'	
<i>Alternaria alternata</i>		
Aalt F1	5'-GCG GGC TGG AAC CTC TC-3'	443 pz
Aalt R1,1	5'-AGA CCT TTG CTG ATA GAG AGT-3'	

\* Według Volz 2014

Analizę produktów PCR przeprowadzono elektroforezą w 2-proc. żelu agarozowym. Równorzędnie liście z objawami alternariozy poddano hodowli agarowej (Potato Dextrose Agar oraz Nutrient Agar) w celu wstępnej identyfikacji patogenu. Wyrosłe izolaty oceniono w cotygodniowej identyfikacji mikroskopowej.

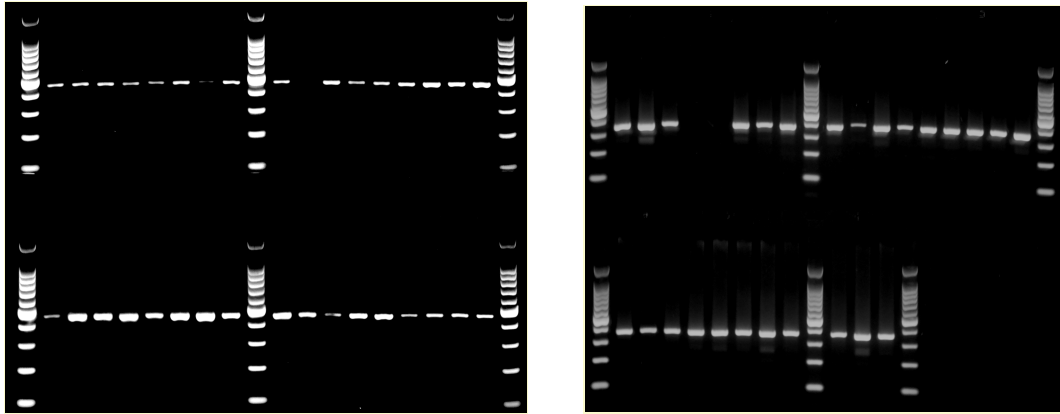
Badania przeprowadzono w Boninie (woj. zachodniopomorskie) w latach 2016-2018.

### Wyniki i dyskusja

Tygodniowe analizy zbieranego materiału roślinnego wskazują na sezonowe zmiany w składzie populacji grzybów. Obecność patogenów zależy od roku obserwacji i panujących w nim warunków agrometeorologicznych. Najwcześniej, bo już 15 czerwca, alternarioza wystąpiła w roku 2016 na bardzo wczesnej odmianie Miłek, w 2018 objawy choroby zarejestrowano siedem dni później (22 czerwca), a najpóźniej (7 lipca) odnotowano je w 2017, również na odmianie Miłek (tab. 2). W poszczególnych tygodniach obecność zarodników grzybów rodzaju *Alternaria* zmieniała się. Obserwowano także wahania sezonowe występowania obu gatunków. Generalnie w zebranych próbach dominował *A. alternata*. Ten czynnik chorobotwórczy był obecny od początku okresu wegetacji ziemniaka aż do zbioru. Natomiast zarodniki *A. solani* występowały w nasileniu znacznie później – między II dekadą lipca a

II dekadą września. Coroczne ekspertyzy, oparte dodatkowo na nowych metodach badawczych, przeprowadzane w krajach Europy Zachodniej przez grupę specjalistów w zakresie ochrony ziemniaka potwierdzają wyniki badań własnych co do terminu pojawiania się i rozwoju sprawców alternariozy (Hansen i in. 2015, Schepers i in. 2017).

Maksymalne stężenie zarodników obu sprawców choroby notowano od II dekady lipca w roku 2016 do końca sezonu wegetacyjnego, od III dekady sierpnia do II dekady września w 2017 i w 2018 między III dekadą lipca a II dekadą września. W tym czasie występowały korzystne warunki meteorologiczne, przemienne opady deszczu i wyższe dobowe temperatury, które sprzyjały zarodnikowaniu patogenów. Niezależnie od sezonu wegetacyjnego początkowa koncentracja zarodników *Alternaria* w powietrzu była niska. Miesięczne sumy zarodników, jak też ich maksymalne stężenie, były najwyższe w sierpniu i niewiele niższe w lipcu. Wysokie stężenie zarodników *Alternaria* odnotowano także na początku września. Stężenie zarodników było wyższe w czasie dojrzewania i zbioru ziemniaków. Obecność zarodników konidialnych w sierpniu potwierdzono również techniką elektroforetyczną produktów PCR w żelu agarozowym (fot. 1AB). Porównując prążki próbki patogenu z prążkami standardu jesteśmy w stanie określić wielkość cząsteczek DNA badanego produktu.

A. *Alternaria alternata* (Aa)B. *Alternaria solani* (As)

Fot. 1. Analiza elektroforetyczna produktów PCR

Czułość testów, do jakich zalicza się reakcję łańcuchową polimerazy (PCR), pozwala ustalić czas początku utajonego postępu choroby zwłaszcza dla izolatów *A. solani*, którego uznaje się za głównego sprawcę alternariozy. Patologiczne zmiany powodowane przez ten patogen we wczesnych infekcjach liści ziemniaka są trudne w jego identyfikacji.

Wzrost zaburzeń w rozwoju roślin ziemniaka powodowanych przez *A. solani* notowano od połowy lipca do III dekady września. Szczególnie w tym czasie narażone są odmiany ziemniaka charakteryzujące się długim okresem wegetacji. Takie zmiany zarejestrowano w badaniu, analizując wytypowane genotypy. Najwięcej zmian chorobowych zarejestrowano w tkankach odmian średnio wczesnych (Irga) oraz średnio późnych i późnych (Danuta, Kuras, Pokusa i Promyk). Natomiast w grupie odmian wczesnych najsilniej porażała się odmiana Miłek. Dlatego tak ważny jest wybór odmiany charakteryzującej się niższą podatnością na choroby, zwłaszcza w sezonach o zmiennych warunkach meteorologicznych.

Wyniki izolacji na podłożach agarowych potwierdzają sezonową cykliczność badanej populacji z rodzaju *Alternaria*. Do badań wykorzystywany był materiał pozyskany z cotygodniowych ekspertyz chorych liści naturalnie zainfekowanych patogenami z rodzaju *Alternaria*. Najwięcej pozytywnych izolatów z hodowli płytkowych otrzymano ze zbiorów sierpniowych (55% oznaczonych kultur), w lipcu było ich mniej, 28%, a w czerwcu i we wrześniu tylko 17%. Badania na ten temat prowadzone są w różnych rejonach Europy (Niemiec, Holandii, Danii, Wielkiej Brytanii,

Estonii). Oceną patogeniczności w stadium początkowej infekcji i rozwoju choroby na terenie Niemiec zajmowali się Leiminger i inni (2014). Za pomocą czułych testów PCR próbowali oni rozwiązać problem sprawcy pierwotnych infekcji chorobowych. Do badań wykorzystywali materiał pozyskany z cotygodniowych ekspertyz chorych liści naturalnie zainfekowanych patogenami z rodzaju *Alternaria* i uzyskali wyniki zbieżne z wynikami badań wykonywanych w naszym kraju.

Izolacje grzybów z typowych nekroz charakterystycznych dla alternariozy, prowadzone zarówno w Boninie, jak i w niektórych innych krajach Europy (np. Holandii, Niemczech, Danii), nie zawsze wskazywały na dominację gatunku *A. alternata*. Stwierdzano również obecność innych patogenów: *Alternaria tenuissima*, *A. infectoria*, *Colletotrichum coccodes*, *Cladosporium*, *Ulocladium*, *Fusarium*, *Alternaria brassicicola*, *A. brassicae* oraz *A. dauci*.

Brak jednoznacznych wyników określających patogeniczność grzybów *Alternaria* wymusza na jednostkach badawczych nieustanne poszukiwanie skutecznych metod.

Cykliczność występowania populacji z rodzaju *Alternaria* w sezonie wegetacyjnym potwierdzono również w badaniu wolumetrycznym, wykorzystując w tym celu pułapkę Burkarda (Gawińska-Urbanowicz, Osowski 2018). Użyta w doświadczeniach siedmiodniowa pułapka w aktywny sposób, przez wąskie wcięcie, zassała powietrze wraz ze znajdującymi się w nim cząstkami biologicznymi, które osiadły na taśmie pokrytej mieszaniną składników (wazelina + toluen + heksan) zamontowanej na bębnie urządzenia.

Tabela 2

Wyniki monitorowania grzybów z rodzaju *Alternaria* w uprawie ziemniaka

Odmiany	Rok	Data pojawu choroby													
		15.06.	22.06.	29.06.	6.07.	13.07.	20.07.	27.07.	3.08.	10.08.	17.08.	24.08.	31.08.	7.09.	14.09.
Bardzo wczesne i wczesne	2016	Aa/ - /As	Aa/Aa - /As	Aa/Aa - /As	Aa/Aa - / -	Aa/Aa - /As	-	Aa/Aa - /As	Aa/Aa	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	- /Aa - / -	- /Aa - / -	Aa/Aa - / -	Aa/Aa - / -	- / -	As/As	Aa/Aa - /As	-	-	-	-
	2018	-	-	-	-	- / -	Aa/Aa - / -	As/As	As/As	As/As	Aa/Aa	As/As	-	-	
Średnio wczesne	2016	Aa/Aa -	Aa/Aa -	Aa/Aa -	Aa/Aa -	Aa/Aa - /As	Aa/Aa - /As	As/As	As/As	Aa/Aa -	Aa/Aa -	-	-	-	
		-	-	-	-	- / -	- / -	- / -	- / -	- /As	- /As	Aa/Aa -	As/As	-	
	2017	-	-	-	-	- / -	- / -	- / -	- / -	- /As	- /As	Aa/Aa -	As/As	Aa/ - /As	
Średnio późne i późne	2016	-	-	-	-	Aa/Aa - /As	Aa/Aa - /As	As/As	As/As	Aa/Aa -	Aa/Aa -	Aa/Aa -	As/As	-	
		-	-	-	-	- / -	- / -	- / -	- / -	- /As	- /As	Aa/Aa -	As/As	Aa/ - /As	
	2017	-	-	-	-	-	-	-	-	Aa/ - / -	Aa/ - / -	Aa/Aa -	As/As	Aa/ - /As	
2018	-	- /As	- /As	- / -	- / -	- / -	- / -	- /As	- /As	- /As	Aa/Aa -	As/As	As/As	Aa/Aa - /As	

Aa – *Alternaria alternata*, As – *Alternaria solani*, ocena mikroskopowa / ocena molekularna



Analiza fragmentu taśmy pozwala ustalić, ile zarodników poszczególnych gatunków grzyba znajduje się w danym czasie i miejscu. Największe nasilenie występowania sprawców suchej i brunatnej plamistości liści notowano od I dekady sierpnia do I dekady września.

Uzyskane wyniki, mimo różnych procedur badań, w efekcie końcowym dostarczają istotnych danych. Są one następczo wykorzystywane do opracowania modelu rozwoju patogenów dla potrzeb tworzenia systemów wspomagających podejmowanie decyzji w ochronie i polepszania jej skuteczności w ograniczaniu alternariozy.

#### Literatura

- 1. Gawińska-Urbanowicz H., Osowski J. 2018.** Monitorowanie stężenia zarodników grzybów *Alternaria* w rejonie Pomorza Zachodniego. – Ziemiak Pol. 4: 37-42;
- 2. Hansen J. G., Andersson B., Sjöholm L., Liljeroth E., Edin E., Bain R., Lees A., Ritchie F., Kildea S., Cooke L., Young G., Fillippov A., Hannukkala A., Hausladen H., Hausvater E., Hermansen A., Naerstad R., Kapsa J., Runno-Paurson E., Koppel M., Musa T., Gulbis G., Ronis A., Vogelaar K., Spoelder J., Evanhuis B., Vanhaverbeke P., Chatot C. 2015.** Epidemics and control of early and late blight 2013 and 2014 in Europe. [In:] Special Report no. 17 (H. T. A. M. Schepers, ed.). Appl. Plant Res., Wageningen UR, PPO 664: 11-31;
- 3. Leiminger J., Bahnweg G., Hausladen H. 2014.** Differentiation of *Alternaria* species and quantification of disease development using real-time PCR. [In:] Special Report no. 16 (H.T. A. M. Schepers, ed.). Appl. Plant Res., Wageningen UR, PPO 568: 189-194;
- 4. Łozowska A., Gawińska-Urbanowicz H. 2016.** Tradycyjne i nowoczesne metody diagnostyczne stosowane w ochronie ziemniaka przed chorobami o podłożu grzybowym i bakteryjnym. – Ziemiak Pol. 2: 46-53;
- 5. Schepers H., Lees A., Hansen J. G., Hausladen H. 2017.** Epidemics and control of early and late blight, 2015 and 2016 in Europe. [In:] Special Report no. 18 (H. T. A. M. Schepers, ed.). Appl. Plant Res., Wageningen UR, PAGV 747: 11-32;
- 6. Volz A. 2014.** Qualitative PCR diagnostics of *A. solani* and *A. alternata*. Euroblight, *Alternaria* Subgroup Protocols. <https://agro.au.dk/forskning/international-platforme/euroblight/alternaria/protocols/>

