

Joanna Kaczmarek¹, Małgorzata Jędrzycka¹,
Bruce D.L. Fitt², John A. Lucas², Akinwunmi O. Latunde-Dada²

¹ Instytut Genetyki Roślin PAN, Poznań

² Rothamsted Research, Harpenden, Wielka Brytania

Molekularna detekcja inokulum pierwotnego chorobotwórczych grzybów *Leptosphaeria maculans* i *L. biglobosa* w próbach powietrza z regionu Dolnego Śląska

Molecular detection of the primary inoculum of the pathogenic fungi
Leptosphaeria maculans and *L. biglobosa* in Lower Silesia air samples

Słowa kluczowe: *Leptosphaeria maculans*, *L. biglobosa*, uwalnianie zarodników, pułapka na zarodniki, detekcja molekularna

Inokulum pierwotne grzybów *Leptosphaeria maculans* i *L. biglobosa* stanowią zarodniki workowe tworzone na resztkach poźniwnych rzepaku. Stężenie askospor w powietrzu można określać na podstawie liczby zarodników na taśmach celofanowych z pułapki wolumetrycznej. Wartość tego wskaźnika jest funkcją liczby zarodników obserwowanych na preparatach mikroskopowych. Ze względu na podobieństwo morfologiczne zarodników na podstawie tej metody nie jest możliwe ustalenie ich przynależności gatunkowej.

W celu oznaczenia proporcji pomiędzy gatunkami *L. maculans* i *L. biglobosa* zastosowano metodę ilościowego PCR (Real-time PCR) i startery gatunkowo specyficzne. Badania dotyczyły prób zebranych w Tarnowie (Dolny Śląsk) jesienią 2004 roku. Łącznie dla badanego okresu suma dobowych stężeń DNA obu gatunków była zbliżona, ale termin maksymalnego stężenia DNA grzyba *L. maculans* był o 12 dni wcześniejszy niż w przypadku *L. biglobosa*. Wyniki uzyskane metodą molekularną były skorelowane ze stężeniem zarodników obliczonym na podstawie metody mikroskopowej.

Keywords: *Leptosphaeria maculans*, *L. biglobosa*, ascospore release, spore trap, molecular detection

The ascomycete fungal species *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* are the cause of stem canker — one of the most important diseases of oilseed rape in Poland and worldwide. The fungi account for great yield losses in this crop and differ in biochemical and molecular characteristics as well as in pathogenicity to host plants.

Ascospores are the primary inoculum responsible for the first leaf spot symptoms on plants. These spores originate from pseudothecia – sexual fruiting bodies formed on oilseed rape stubble from the previous season's crop. Monitoring of ascospore release enables identification of the optimal time for plant protection by fungicide application. The concentration of ascospores in the air is calculated from spore counts obtained by light microscopic examination of Melinex tapes taken from volumetric spore traps. However, this visual method of assessment cannot distinguish between *L. maculans* and *L. biglobosa* ascospores due to the identical shape and size of these sexual spores.

In this study, ratios between airborne propagules of both species were evaluated using a molecular approach based on species-specific primers and quantitative Real-time PCR. Tapes from a spore trap that was operated in Tarnów (Lower Silesia) during the autumn months of 2004 were processed for DNA extraction, diagnostics and quantification. The sums of the daily DNA concentrations of fungal propagules were similar for both pathogens, reaching 1124.7 pg/μl for *L. maculans* and 1146.07 pg/μl for *L. biglobosa*. The maximum concentration of DNA was attained 12 days earlier for *L. maculans* than for *L. biglobosa*. The results of molecular detection correlated positively with those of spore counts obtained using light microscopy.

Wstęp

Sucha zgnilizna kapustnych jest jedną z najgroźniejszych chorób rzepaku w Polsce i na świecie (West i in. 2001, Fitt i in. 2006, Jędrzycka 2006). Przyczyną są dwa pokrewne gatunki: *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not. oraz *L. biglobosa* (Shoemaker i Brun 2001). Grzyby te wywołują podobne objawy chorobowe lecz są odmienne pod względem genetycznym; różnią się też szkodliwością wobec rośliny – gospodarza (Mahuku i in. 1996). W Polsce występują oba gatunki, ale proporcja pomiędzy nimi jest zmienna w zależności od lat i regionów uprawy (Jędrzycka 2006).

Grzyby *L. maculans* i *L. biglobosa* bytują na resztkach poźniwnych w formie grzybni i owocników (Weber i Karolewski 1997). Rozmnażanie płciowe zachodzące w pseudotecjach — owocnikach stadium generatywnego, prowadzi do wytwarzania zarodników workowych — askospor (Petrie 1995). Dojrzewanie pseudotecjów oraz uwalnianie askospor zależy od przebiegu pogody, a zwłaszcza opadów deszczu (West i in. 2002, Huang i in. 2005). Ważnym elementem podejmowania decyzji dotyczącej ochrony rzepaku przed suchą zgnilizną kapustnych jest znajomość rozwoju inokulum pierwotnego, tj. poszczególnych stadiów dojrzałości pseudotecjów oraz okresów uwalniania zarodników workowych (Thürwächter i in. 1999, Jędrzycka i in. 2006).

W 2004 roku z inicjatywy Instytutu Genetyki Roślin PAN oraz firmy DuPont Poland powstał system, którego zadaniem jest określenie optymalnego terminu wykonania zabiegów fungicydowych na podstawie informacji o dostępności inokulum pierwotnego patogenów. System Prognozowania Epidemii Chorób (SPEC) bazuje na znajomości szybkości dojrzewania pseudotecjów oraz stężenia zarodników workowych grzybów *L. maculans* i *L. biglobosa*. W badaniu zarodników stosuje się aparaty wolumetryczne typu Hirsta (Burkard Manufacturing, Rickmansworth, Wielka Brytania oraz Lanzoni, Bolonia, Włochy). Są to urządzenia, które aktywnie zasysają powietrze z otoczenia. Zarodniki obecne w powietrzu przyklejają się do taśmy znajdującej się na obrotowym bębnie w środku pułapki (Jędrzycka i in. 2004). Ze względu na podobieństwo morfologiczne askospor gatunków *L. maculans* i *L. biglobosa* metoda mikroskopowa pozwala na łączne określenie stężenia ich zarodników. Znajomość proporcji występowania *L. maculans* i *L. biglobosa* jest istotna ze względu

na ich odmienną wrażliwość na fungicydy. Ochrona plantacji rzepaku przed grzybem *L. biglobosa* wymaga stosowania znacznie większych dawek substancji biologicznie czynnej, niż w przypadku *L. maculans* (Eckert i in. 2004). Opracowanie starterów gatunkowo specyficznych umożliwiło molekularną detekcję poszczególnych gatunków (Calderon i in. 2002, Latunde-Dada i in. 2007).

W niniejszej pracy porównano liczebność zarodników obserwowanych pod mikroskopem oraz stężenie DNA grzybów *L. maculans* i *L. biglobosa* oznaczonych metodą molekularną. Wykorzystano próby uzyskane z taśm z pułapki na zarodniki działającej w okresie jesiennym w Tarnowie koło Ząbkowic Śląskich. Celem pracy było obliczenie korelacji pomiędzy wynikami uzyskanymi przy pomocy obu metod oraz oznaczenie proporcji pomiędzy gatunkami *L. maculans* i *L. biglobosa* metodą ilościowego PCR.

Material i metody

Miejsce prowadzenia badań

Materiał badawczy stanowiły zarodniki na taśmach z pułapki Burkarda umieszczonej w Stacji Doświadczalnej Oceny Odmian w Tarnowie koło Ząbkowic Śląskich (województwo dolnośląskie) w okresie od 1.09. do 4.12.2004 roku (95 prób).

Oznaczenie stężenia zarodników metodą mikroskopową

Oznaczanie zmian w dobowym stężeniu askospor patogenicznych grzybów *Leptosphaeria* spp. w powietrzu prowadzono metodą wolumetryczną z wykorzystaniem siedmiodniowej pułapki na zarodniki (Burkard Manufacturing Ltd., Wielka Brytania) otoczonej słomą rzepakową z poprzedniego sezonu wegetacyjnego, pobraną z roślin z objawami suchej zgnilizny kapustnych. Taśmę z pułapki cięto w poprzek na odcinki długości 48 mm, odpowiadające jednej dobie pracy pułapki. Każdy odcinek ponownie przecinano wzdłuż na dwie równe części — jedną z nich wykorzystywano do obserwacji mikroskopowych, a drugą do analiz molekularnych. Dla zwiększenia dokładności analizy odrzucono preparaty z pęcherzykami powietrza (16 sztuk).

Analizę mikroskopową wykonywano pod dwustukrotnym powiększeniem. Dla każdego otrzymanego preparatu oznaczono liczbę zarodników, a uzyskane wyniki przeliczono na stężenie askospor w 1 metrze sześciennym powietrza.

Oznaczenie stężenia zarodników metodą molekularną

Odczyt metodą molekularną przeprowadzono przy zastosowaniu techniki Real-time PCR (qPCR). Izolację warstwy woskowej z taśmy Burkarda, zawierającej materiał biologiczny, wykonano przy użyciu młynkomiksera typu FastPrep (FP120

Bio101 Thermo Savant, USA). Ekstrakcję DNA prowadzono według procedury z wykorzystaniem CTAB i mieszaniny chloroformu oraz alkoholu izoamyloвого w proporcji 24 : 1, według Grahama i in. (1994) z modyfikacjami własnymi. Do reakcji qPCR zastosowano startery specyficzne wobec *L. maculans* i *L. biglobosa* (Mahuku i in. 1996). Ocenę przyrostu produktu reakcji dokonywano na podstawie wzrostu sygnału fluorescencji barwnika Sybr Green. W reakcji amplifikacji użyto Sybr Green Jumpstart Taq Readymix (Sigma, UK) oraz 2,5 μ l produktu uzyskanego w wyniku izolacji DNA z poszczególnych prób. Profil temperaturowo-czasowy reakcji był następujący: 95°C — 2 min (wstępna denaturacja), następnie 38 cykli; 95°C — 15 s (denaturacja), 60°C — 30 s (przyłączanie starterów), 72°C — 45 s (elongacja). W celu wyznaczenia krzywej topnienia zastosowano następujące warunki reakcji: 95°C — 15 s, 60°C — 1 min i 95°C — 15 s.

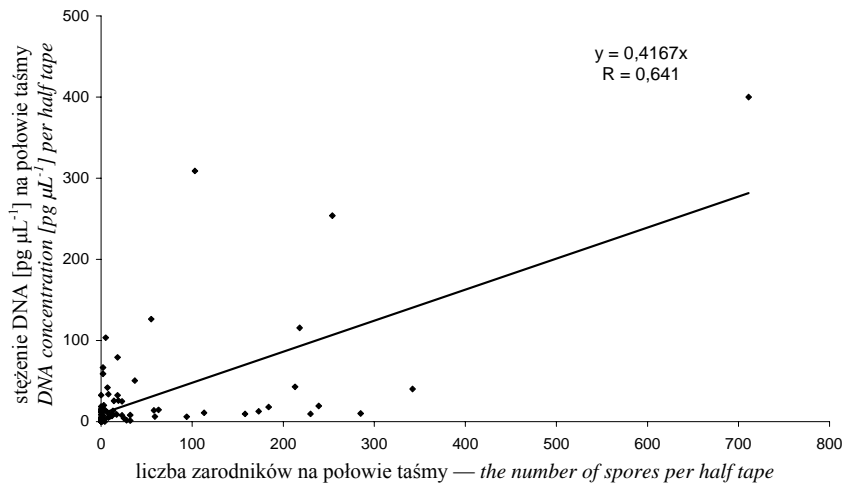
Do wyznaczenia wydajności reakcji wykorzystano standardy stanowiące szereg pięciu kolejnych 10-krotnych rozcieńczeń DNA (od 10 ng do 1 pg DNA), będące specyficznymi produktami reakcji PCR dla obu badanych gatunków. W celu identyfikacji reakcji niespecyficznych przeprowadzono analizę krzywej topnienia produktów PCR po zakończeniu właściwej reakcji amplifikacji.

Wyniki

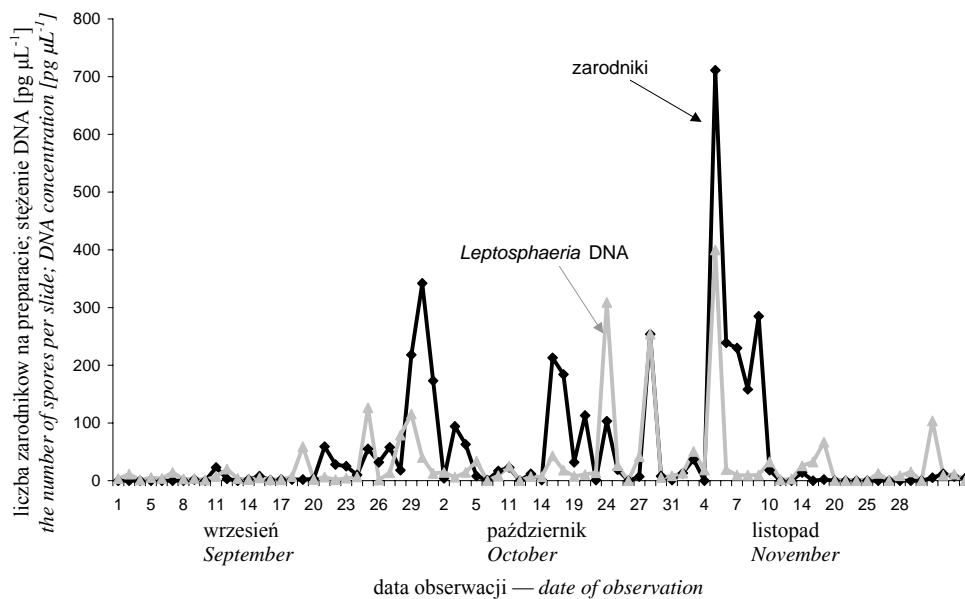
Na podstawie analizy mikroskopowej oznaczono stężenie zarodników workowych grzybów *L. maculans* i *L. biglobosa*. Metodą molekularną oznaczono sumę DNA i proporcję pomiędzy gatunkami. Współczynnik korelacji (R) pomiędzy liczbą zarodników na preparacie a całkowitą sumą DNA badanych grzybów wyniósł 0,641 (rys. 1).

Zarodniki workowe zaobserwowano w 55 próbach (69,6%), a ich łączna liczba w badanym okresie wynosiła 3959 sztuk. Średnio na preparacie obserwowano 72 zarodniki, co stanowiło około 10 askospor w 1 metrze sześciennym powietrza. Liczba zarodników w poszczególnych próbach wahała się od 1 do 711 askospor (98,8 zarodników w 1 m³), przy czym w 16,5% prób liczba zarodników na połowie preparatu przewyższała 100 sztuk (rys. 2).

W przypadku 61 preparatów (77,2%) obserwacja mikroskopowa była zgodna z wynikami detekcji molekularnej, przy czym w większości była to sytuacja, kiedy na preparacie obserwowano zarodniki i wykrywano DNA co najmniej jednego z badanych gatunków *Leptosphaeria* spp. (53 preparaty, 67,1%). W ośmiu przypadkach (10,1%) nie obserwowano zarodników i nie stwierdzono DNA żadnego z badanych gatunków. W szesnastu przypadkach (20,3%) stwierdzono DNA *Leptosphaeria* spp., lecz na drugiej połowie taśmy nie obserwowano askospor grzybów żadnego z badanych gatunków. Przeciwną sytuację odnotowano tylko dwukrotnie (2,5% przypadków).



Rys. 1. Zależność między liczbą askospor grzybów rodzaju *Leptosphaeria* a stężeniem DNA grzybów *L. maculans* i *L. biglobosa* oznaczonych na podstawie ilościowego PCR
Correlation between the number of ascospores of the genus *Leptosphaeria* and the concentration of *L. maculans* and *L. biglobosa* DNA evaluated by quantitative PCR



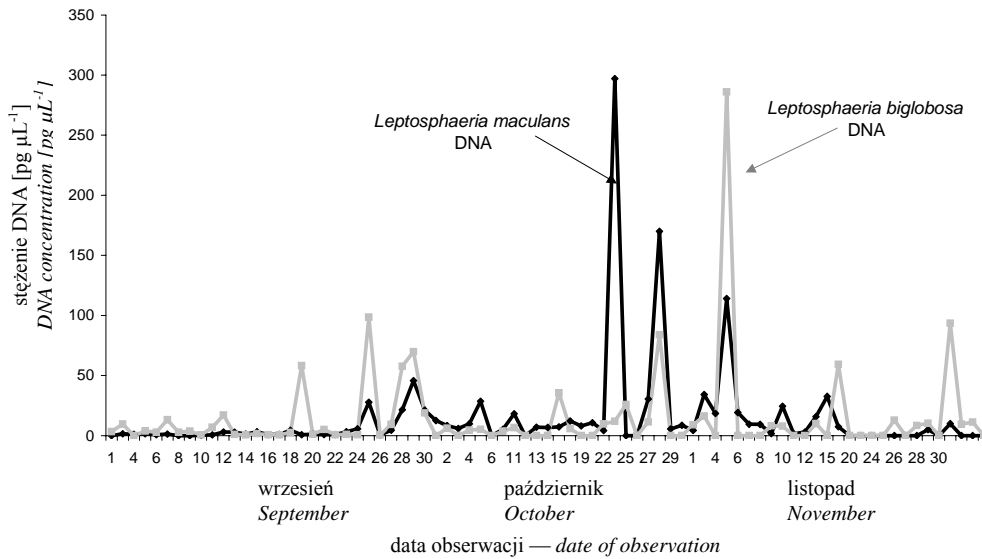
Rys. 2. Zmiany liczby askospor grzybów *L. maculans* i *L. biglobosa* na preparatach mikroskopowych (czarna linia) i zmiany stężenia DNA tych gatunków oznaczonego metodą ilościowego PCR (szara linia) — Seasonal fluctuations in numbers of *L. maculans* and *L. biglobosa* ascospores observed on microscope slides (black line) and concentrations of their DNA evaluated by quantitative PCR (grey line)

Z wzoru krzywej regresji wynika, że przy zastosowanej metodyce ekstrakcji i ilościowej detekcji DNA badanych grzybów, w jednej askosporze znajduje się 0,4167 pg DNA. Przyjmując założenie, że na obu połowach taśmy znajduje się taka sama liczba zarodników workowych i są one jedynym źródłem DNA grzybów *L. maculans* i *L. biglobosa* na taśmach z pułapki wolumetrycznej oraz biorąc pod uwagę całkowitą liczbę odłowionych askospor obliczono, że w jednym zarodniku znajdowało się 0,574 pg DNA. Dane te reprezentują nieco inny typ kalkulacji tego samego parametru, lecz są zbliżone pod względem wyniku końcowego. Należy jednak pamiętać, że na każdym etapie badań, począwszy od przygotowania próby a skończywszy na detekcji, z pewnością traci się część badanego materiału, a więc oznaczona tą metodą wartość liczbowa jest obciążona błędem.

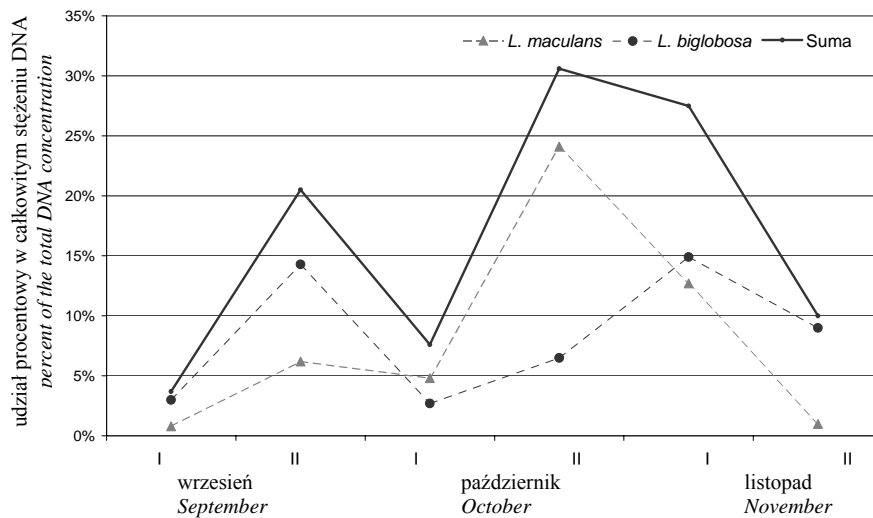
Metoda Real-time PCR z zastosowaniem starterów gatunkowo specyficznych umożliwiła oznaczenie proporcji pomiędzy gatunkami *L. maculans* i *L. biglobosa*. Suma stężeń DNA uzyskanych w tym okresie przez gatunek *L. maculans* wynosiła 1124,7 pg/ μ l, co stanowiło 49,5% DNA uzyskanego przez cały okres jesienny. W przypadku *L. biglobosa* wartość ta była bardzo zbliżona i wynosiła 1146,1 pg (50,5%). Gatunek *L. maculans* dominował nad *L. biglobosa* przez 35 dni, natomiast odwrotną sytuację odnotowano przez 34 dni, w pozostałym okresie (10 dni) nie wykryto DNA żadnego z wymienionych gatunków. Obserwacja ta w 80% przypadków (8 dni) była zgodna z wynikami detekcji mikroskopowej. W pozostałych dwóch przypadkach liczba zarodników na preparacie mikroskopowym była minimalna (odpowiednio 1 i 4 zarodniki). W szesnastu przypadkach stwierdzono wyłącznie obecność gatunku *L. maculans*, natomiast gatunek *L. biglobosa* występował samodzielnie przez 9 dni.

Najwyższe stężenie DNA grzyba *L. maculans* stwierdzono 24. października (297 pg/ μ l). Wysokie stężenie DNA tego samego gatunku stwierdzono także 4 dni później (28. października, 170 pg/ μ l). Z kolei najwyższe stężenie DNA gatunku *L. biglobosa* wykazano 5. listopada (286 pg/ μ l). Stężenia znacznie przewyższające wartości tego parametru uzyskane dla gatunku *L. maculans* stwierdzono także w dniach 9 października i 1 grudnia — odpowiednio 59,2 i 93,5 pg/ μ l — a także w dniach 19, 25, 28 i 29 września — wartości parametru mieściły się w granicach pomiędzy 50 a 100 pg DNA *L. biglobosa* na 1 μ l produktu reakcji Real-time PCR (rys. 3).

Stężenie DNA gatunków *L. maculans* i *L. biglobosa* ulegało znacznym zmianom w trakcie sezonu jesiennego (rys. 4). W pierwszej połowie września było niewielkie i stanowiło zaledwie 3,7% całkowitego stężenia DNA w badanym okresie. W drugiej połowie września uzyskano 20% całkowitego DNA, przy czym gatunek



Rys. 3. Stężenia DNA grzybów *L. maculans* (czarna linia) i *L. biglobosa* (szara linia) uzyskane z prób pochodzących z taśm z pułapki na zarodniki, po reakcji Real-time PCR z zastosowaniem starterów gatunkowo specyficznych i barwnika SYBR green — *Seasonal variation in the concentration of *L. maculans* (black line) and *L. biglobosa* DNA (grey line) extracted from spore trap tapes and quantified by Real-time PCR detection using species-specific primers and SYBR green chemistry*



Rys. 4. Udział procentowy DNA grzybów *L. maculans* i *L. biglobosa* łącznie i rozdzielnie dla każdego gatunku w poszczególnych okresach sezonu jesiennego (Tarnów, 2004) — *Proportions of the total extractable DNA in sampled air accounted for, jointly or singly, by *L. maculans* and *L. biglobosa* over consecutive periods of the autumn months (Tarnów, 2004)*

L. biglobosa ponad dwukrotnie dominował nad *L. maculans*. W pierwszej połowie października wartość parametru ponownie uległa obniżeniu (7,6%). Największy udział DNA grzybów rodzaju *Leptosphaeria* stwierdzono w drugiej połowie października i pierwszej połowie listopada, było to odpowiednio 30,6 i 27,5% łącznej puli DNA uzyskanego w wyniku reakcji ilościowego PCR z taśm pochodzących z pułapki na zarodniki. W drugiej połowie października stwierdzono znaczną dominację gatunku *L. maculans*, natomiast w pierwszej połowie listopada oba gatunki były równo liczne (rys. 4). W drugiej połowie listopada i pierwszych kilku dniach grudnia uzyskano 10% całkowitego DNA. Wykazano, iż w 90% był to gatunek *L. biglobosa*.

Dyskusja

Określenie struktury populacji grzybów rodzaju *Leptosphaeria* jest ważnym elementem dobrej praktyki rolniczej związanej z ochroną tej uprawy. W Polsce zakres i nasilenie występowania obu patogenów są zróżnicowane i podlegają ciągłym zmianom. Dwadzieścia lat temu obserwowano niemal wyłącznie gatunek *L. biglobosa* (Jędrzycka i in. 1994, 1999; Karolewski 1999), jednak od tamtego czasu obserwuje się wzrost udziału gatunku *L. maculans* i jego ekspansję na wschód, przy czym nadal stwierdza się zmiany składu populacji patogenów w czasie i przestrzeni (Jędrzycka 2006). Oba gatunki różnią się chorobotwórczością, przy czym *L. maculans* jest gatunkiem bardziej agresywnym. Objawy choroby powodowanej przez *L. maculans* pojawiają się już we wczesnych fazach rozwoju rośliny w postaci plam na liściach, po czym grzyb przerasta w głąb łodygi i szyjki korzeniowej powodując nekrozę podstawy łodygi. Gatunek *L. biglobosa* z reguły powoduje bardziej powierzchniowe objawy na łodydze (Gladders i Musa 1980). W Polsce grzyb ten jest często izolowany także z wewnętrznych tkanek rośliny (Jędrzycka 2006). Ponadto *L. biglobosa* jest gatunkiem bardziej odpornym na fungicydy, a jego zwalczanie wymaga zastosowania większych dawek substancji czynnych (Eckert i in. 2004).

W niniejszej pracy porównano wyniki monitorowania stężenia inokulum pierwotnego grzybów rodzaju *Leptosphaeria* uzyskane metodą mikroskopową i molekularną. Stwierdzono statystycznie istotną korelację pomiędzy liczbą askospor obserwowanych na preparatach mikroskopowych a łącznym stężeniem DNA grzybów *L. maculans* i *L. biglobosa*. Oznacza to, że zmiany w dobowym stężeniu DNA są proporcjonalne do zmian w liczbie zarodników i mają podobny przebieg. Statystycznie istotne korelacje pomiędzy liczbą zarodników na taśmach uzyskanych z pułapek na zarodniki a ilościową detekcją DNA badanych gatunków grzybów stwierdzono także w badaniach prób pochodzących z północnej części Polski, przy czym wartość współczynnika korelacji była silnie uzależniona od liczby zarodni-

ków (Kaczmarek i in. 2008). Im więcej zarodników stwierdzano w powietrzu, tym łatwiej było wykryć je metodą PCR. Przy licznej obecności zarodników stwierdzano korelacje od $R = 0,83$ do $R = 0,84$. Niewielkie stężenie askospor w powietrzu, wynoszące poniżej 15 sztuk, co odpowiadało stężeniu około 2 zarodników w 1 m^3 , wiązało się ze spadkiem współczynnika korelacji do wartości poniżej $R = 0,3$.

W przypadku badania preparatów uzyskanych w warunkach naturalnych nie ma możliwości oceny tego samego fragmentu taśmy. Badaniom podlegają dwie części tej samej taśmy, lecz oznaczany materiał nie jest identyczny. Przy niewielkiej liczbie zarodników na preparatach istnieje duże prawdopodobieństwo ich nierównomiernego rozkładu, co prowadzi do sytuacji, iż część taśmy badana przy pomocy metody wizualnej różni się od części badanej metodą PCR. Także w przypadku niniejszych badań najprawdopodobniej zaistniała taka sama sytuacja. Negatywny wynik detekcji molekularnej stwierdzono tylko w dwóch przypadkach, kiedy na pozostałej części taśmy obserwowano askospory, ale był tam tylko jeden lub kilka zarodników (4 sztuki). Istnieje zatem bardzo duże prawdopodobieństwo, że na pozostałej połowie taśmy mogło ich nie być wcale.

Niezgodność wyników uzyskanych metodą mikroskopową i molekularną stosunkowo często (20,3% prób) dotyczyła przypadku pozytywnej detekcji DNA jednego lub obu badanych gatunków rodzaju *Leptosphaeria*, lecz braku askospor na komplementarnej części taśmy z pułapki na zarodniki. Na podstawie wstępnych analiz prób uzyskanych z innych lokalizacji można przypuścić, że w 1 askosporze znajduje się od 1 do 4 pg DNA, co daje średnią 2,5 pg/zarodnik (Kaczmarek i in. 2008). Uwzględniając średnią z tej wartości (2,5 pg) jako prawdopodobną ilość DNA w askosporze, biorąc pod uwagę stężenia DNA uzyskane w niniejszym doświadczeniu i zakładając równomierny rozkład askospor na powierzchni taśmy, hipotetyczna liczba zarodników w tych próbach powinna wynosić od 0,4 (fragment zarodnika) do 13 zarodników, a średnio wynosiłaby 3,5 zarodnika. Wynik taki oznacza, że w powyżej opisanych przypadkach brak zgodności ponownie dotyczy dni z minimalną liczbą askospor w powietrzu.

Na podstawie wyników niniejszych badań — przyjmując założenie, że na obu połowach taśmy występuje taka sama liczba zarodników i wykrywamy 100% DNA grzybów *L. maculans* i *L. biglobosa* — należałoby uznać, że w jednej askosporze znajduje się jedynie 0,417–0,574 pg DNA. W takim przypadku prawdopodobna liczba zarodników workowych na taśmach wynosiłaby średnio 15 askospor i wahałaby się w granicach od 2 do 78 zarodników. Przeoczenie niewielkiej liczby zarodników jest możliwe, jednak niezauważenie prawie 80 zarodników na preparacie jest bardzo mało prawdopodobne. W tym przypadku przyczyna niezgodności obu metod może mieć inne źródło. Askospory nie stanowią jedynej formy grzybów *L. maculans* i *L. biglobosa* w powietrzu. Zgodnie z wynikami uzyskanymi przez Guo i Fernando (2005) na preparatach przygotowywanych z taśm w pułapkach wolumetrycznych stwierdza się także obecność zarodników konidialnych zwanych

piknidiosporami. Źródłem materiału genetycznego mogą być także fragmenty grzybni i owocników. Mogą one także przyczyniać się do porażenia roślin rzepaku. Jednakże, jako mniej charakterystyczne i rozpoznawalne ze względu na kształt (grzybnia, fragmenty owocników) lub niewielkie rozmiary (piknidiospory), nie są przedmiotem obserwacji mikroskopowych. Doświadczalnie wykazano, że detekcja molekularna materiału genetycznego zawartego w zarodnikach konidialnych przyklejonych do taśm w pułapce wolumetrycznej jest technicznie możliwa, nawet w przypadku niezbyt wielkiej liczby tych zarodników (Stachowiak i in. 2005). Można przyjąć, że poza nierównomiernym rozkładem askospor na taśmach, obecność innych fragmentów grzyba jest prawdopodobną przyczyną zaburzenia korelacji pomiędzy obserwacjami mikroskopowymi a wynikami detekcji molekularnej.

Badania prowadzone metodą ilościowego PCR wykazały zbliżone sumaryczne stężenie DNA gatunków *Leptosphaeria* odpowiedzialnych za suchą zgniliznę kapustnych. Stwierdzono jednak znaczną rozbieżność terminu najwyższego stężenia DNA. Największą koncentrację DNA *L. maculans* stwierdzono w drugiej połowie października, natomiast w przypadku *L. biglobosa* był to początek listopada. Różnica pomiędzy tymi terminami wynosiła 12 dni. Pseudotecja *L. biglobosa* charakteryzują się dłuższą szyjką, przez którą muszą się przecisnąć zarodniki, aby wydostać się na zewnątrz owocnika (Shoemaker i Brun 2001). Owocniki tego gatunku są także bardziej zagłębione w epidermie (Toscano-Underwood i in. 2003), co także może stanowić przeszkodę w uwalnianiu askospor. Te dwa powody mogą przyczyniać się do późniejszej obecności zarodników *L. biglobosa* w powietrzu. W porównaniu do *L. maculans* materiał genetyczny grzyba *L. biglobosa* dwukrotnie rzadziej występował w próbach samodzielnie. Z kolei niewątpliwa przewaga liczebna owocników tego gatunku prawdopodobnie równoważyła trudności związane z uwalnianiem zarodników workowych z pseudotecjów, co częściowo może tłumaczyć stosunkowo wysokie stężenie DNA gatunku *L. biglobosa* w zestawie prób pochodzących z pierwszej połowy września.

Określenie terminu dojrzewania owocników stadium doskonałego oraz askospor ma duże znaczenie praktyczne dla zwalczania suchej zgnilizny kapustnych (Dawidziuk i Jędryczka 2009). Dla przykładu zabieg chemiczny w okresie dominacji *L. maculans* przyczynia się głównie do zwalczania tego gatunku, natomiast w mniejszym stopniu może niszczyć grzyb *L. biglobosa*, zwłaszcza przy jego większej odporności na substancje aktywne zawarte w fungicydach. Uzupełnienie metody mikroskopowej o detekcję molekularną — umożliwiającą rozróżnienie sprawców suchej zgnilizny kapustnych — może przyczynić się do skuteczniejszego zwalczania tej groźnej choroby rzepaku, z pożytkiem dla konkurencyjności gospodarstw rolnych oraz ochrony środowiska przed niewłaściwym i nadmiernym stosowaniem pestycydów.

Wnioski

1. Metoda Real-time PCR umożliwia poznanie składu gatunkowego oraz proporcji ilościowych w obrębie populacji *Leptosphaeria* spp.
2. Gatunki *L. maculans* i *L. biglobosa* mogą różnić się pod względem terminu przebiegu poszczególnych stadiów rozwojowych cyklu życiowego.
3. Połączenie metody molekularnej z metodą mikroskopową stwarza szansę precyzyjnego monitorowania stężenia zarodników obu sprawców suchej zgnilizny kapustnych.

Podziękowanie

Serdecznie dziękujemy firmie DuPont Poland za finansowanie działania punktu badawczego w Tarnowie. Dziękujemy panu prof. Edwardowi Gackowi – dyrektorowi COBORU za współpracę Ośrodka w ramach systemu SPEC, a pani Agacie Kudryńskiej z SDOO w Tarnowie za obsługę techniczną pułapki Burkarda. Niniejsza praca jest efektem grantu promotorskiego NN310 086436 finansowanego przez MNiSzW oraz współpracy w ramach projektu WAR/342/88 z funduszy British Council. Finansowanie badań uzyskano także z UK Biotechnology and Biological Sciences Research Council (Rothamsted Research) oraz programu OREGIN z funduszy DEFRA.

Literatura

- Calderon C., Ward E., Freeman J., Foster S.J., McCartney H.A. 2002. Detection of airborne inoculum of *Leptosphaeria maculans* and *Pyrenopeziza brassicae* in oilseed rape crops by polymerase chain reaction (PCR) assays. *Plant Pathol.*, 51: 303-310.
- Dawidziuk A., Jędryczka M. 2009. Identyfikacja molekularna przynależności gatunkowej owocników grzybów kompleksu *Leptosphaeria maculans* – *L. biglobosa*. *Rozprawy i monografie IGR PAN* (w druku).
- Eckert M.R., Fitt B.D.L., Selley A. 2004. *Leptosphaeria maculans*, *L. biglobosa* and fungicides: preliminary results from *in vitro* and winter oilseed rape experiments. *IOBC Bull.*, 27 (10): 157-164.
- Fitt B.D.L., Brun H., Barbetti M.J., Rimmer S.R. 2006. World-wide importance of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*). *Eur. J. Plant Pathol.*, 114: 3-15.
- Gladders P., Musa T.M. 1980. Observations on the epidemiology of *Leptosphaeria maculans* stem canker in winter oilseed rape. *Plant Pathol.*, 29: 28-37.
- Graham G.C., Mayers P., Henry R.J. 1994. A simplified method for the preparation of fungal genomic DNA for PCR and RAPD analysis. *Biotechniques*, 16: 48-50.
- Guo X.W., Fernando W.G.D. 2005. Seasonal and diurnal patterns of spore dispersal by *Leptosphaeria maculans* from canola stubble in relation to environmental conditions. *Plant Disease*, 89: 97-104.
- Huang Y.J., Fitt B.D.L., Jędryczka M., West J.S., Gladders P., Steed J.M., Li Z.Q. 2005. Patterns of ascospore release in relation to phoma stem canker epidemiology in England (*Leptosphaeria maculans*) and Poland (*Leptosphaeria biglobosa*). *Eur. J. Plant Pathol.*, 111: 253-277.

- Jędrzycka M., Kaczmarek J., Czernichowski J. 2006. Development of a decision support system for control of stem canker of oilseed rape in Poland. IOBC Bull., 29 (7): 269-278.
- Jędrzycka M., Lewartowska E., Frencl I. 1994. Properties of *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm. isolates from Poland. I. Pathogenicity characterization. Phytopathologia Polonica, 7 (19): 71-79.
- Jędrzycka M., Matysiak R., Bandurowski R., Rybacki D. 2004. SPEC – system wspierający ochronę rzepaku przed suchą zgnilizną kapustnych w Polsce. Rośliny Oleiste – Oilseed Crops, 25 (2): 637-644.
- Jędrzycka M. 2006. Epidemiologia i szkodliwość suchej zgnilizny kapustnych na rzepaku ozimym w Polsce. Rozprawy i Monografie IGR PAN, 17: 1-150.
- Jędrzycka M., Fitt B.D.L., Kachlicki P., Lewartowska E., Balesdent M.H., Rouxel T. 1999. Comparison between Polish and United Kingdom populations of *Leptosphaeria maculans*, cause of stem canker of oilseed rape. J. Plant Pathology and Plant Protection, 106 (6): 608-617.
- Kaczmarek J., Fitt B.D.L., Jędrzycka M., Latunde-Dada A.O. 2008. Detection by real-time PCR and quantification of *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* in air samples from north Poland. Aspects of Appl. Biol., 89: 71-76.
- Karolewski Z. 1999. Characteristics of *Leptosphaeria maculans* isolates occurring in Wielkopolska region in 1991-1996. Phytopathologia Polonica, 18: 103-111.
- Latunde-Dada A.O., West J.S., Measures S., Huang Y.J., Pirie E., Fitt B.D.L. 2007. New methods to understand quantitative resistance to *Leptosphaeria maculans* and *Pyrenopeziza brassicae* in oilseed rape. Proceedings of the 12th International Rapeseed Congress. Wuhan, China. Book of abstracts: 310.
- 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. Physiol. Mol. Plant Pathol., 49: 61-72.
- Petrie G.A. 1995. Patterns of ascospore discharge by *Leptosphaeria maculans* (blackleg) from 9- to 13-month-old naturally infected rapeseed/canola stubble from 1977 to 1993 in Saskatchewan. Canadian Plant Disease Survey, 75: 35-43.
- Shoemaker R.A., Brun H. 2001. The teleomorph of the weakly aggressive segregate of *Leptosphaeria maculans*. Can. J. Bot., 79: 412-419.
- Stachowiak A., Irzykowski W., Jędrzycka M. 2005. Molecular detection of *L. maculans* and *L. biglobosa* spores from Burkard tapes. IOBC Bull., 29 (7): 255.
- Toscano-Underwood C., Huang Y.J., Fitt B.D.L., Hall A.M. 2003. Effects of temperature on maturation of pseudothecia of *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* on oilseed rape stem debris. Plant Pathology, 52: 726-736.
- Thürwächter F., Garbe V., Hoppe H.H. 1999. Ascospore discharge, leaf infestation and variations in pathogenicity as criteria of predict impact of *Leptosphaeria maculans* on oilseed rape. J. Phytopathol., 147: 215-222.
- Weber Z., Karolewski Z. 1997. Porażone fragmenty roślin rzepaku ozimego z poprzedniego sezonu wegetacyjnego jako źródło suchej zgnilizny roślin kapustnych (*Leptosphaeria maculans* Desm. Ces. et de Not.). Rośliny Oleiste, 18 (2): 321-324.
- West J.S., Jędrzycka M., Leech P.K., Dakowska S., Huang J., Fitt B.D.L. 2002. Biology of *Leptosphaeria maculans* (stem canker) ascospore release in England and Poland. IOBC Bull., 25 (2): 21-30.
- West J.S., Kharbanda P.D., Barbetti M.J., Fitt B.D.L. 2001. Epidemiology and management of *L. maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe. Plant Pathol., 50: 10-27.