

Michał Starzycki, Eligia Starzycka

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Zakład Roślin Oleistych w Poznaniu

Deformacje rodziców i potomstwa roślin rzepaku (*B. napus*) zakażonych przez *Phytoplasma* sp.

Parents and progeny plant deformation of *Brassica napus* L. infected by *Phytoplasma* sp.

Słowa kluczowe: rzepak ozimy, fitoplazmy, DNA patogena, deformacja w haploidalnym i diploidalnym pokoleniu F₂

Key words: winter oilseed rape, phytoplasma, DNA of pathogen, deformation of haploid and diploid F₂ generation

W Polsce, na plantacjach produkcyjnych rzepaku ozimego z różną częstością można zauważyć charakterystyczne „miotlasto” wyglądające rośliny. Przyczyną tego rodzaju deformacji są z reguły fitoplazmy zasiedlające wiązki sitowe (floem) porażonych roślin. Dotychczas nie sklasyfikowano w Polsce patotypów fitoplazm występujących na rzepaku. W polu, oprócz miotlastych można zaobserwować także inne morfologicznie zniekształcone rośliny. Przy użyciu dwóch par starterów odróżniających fitoplazmatyczne DNA, zidentyfikowano patogena w rzepaku ozimym. Z roślin porażonych otrzymano nasiona. Większość z nich była zniekształcona i popękana. Po wysianiu w warunkach szklarniowych otrzymano 70% roślin normalnych i 30% z objawami staśmienia. Formy staśmione zapyłano wsobnie oraz pobrano z nich mikrospory do hodowli in vitro. Wszystkie otrzymane rośliny haploidalne, w liczbie około 200 były silnie zniekształcone i nie posiadały wyróżnionego stożka wzrostu pędu. Identyczne objawy towarzyszyły obserwowanym 453 roślinom diploidalnym otrzymanym z nasion z chowu wsobnego. Z roślin porażonych fitoplazmami otrzymano klony rzepaku, u których na skutek prowadzonej hodowli z antybiotykami ustąpiły objawy chorobowe.

On winter oilseed rape plantations in Poland sporadically some „shaggy” looking plants can be observed. This deformation is usually caused by phytoplasmas, that settle the sieve tubes (phloem) of affected plants. The pathotypes of phytoplasmas occurring in Poland have not been classified yet. In field conditions other morphological deformations, apart from shaggy-like plants, are observed. The pathogen has been identified in winter oilseed rape plants by using two pairs of primers, which are able to recognize phytoplasma's DNA. Seeds were obtained from infected plants. Most of seeds received from infected plants were misshaped and covered with cracks. After seeding and growing in glasshouse conditions 70 per cent healthy plants and 30 per cent shaggy-like plants were received. Shaggy-like plants were self-pollinated and their microspores were put into in vitro culture. All received 200 haploid plants were strongly misshaped without distinguishable apical growing points. The same symptoms were observed on 453 diploid plants received from self-pollination. Healthy clones were obtained from phytoplasmas infected plants by growing on medium with antibiotics.

Wstęp

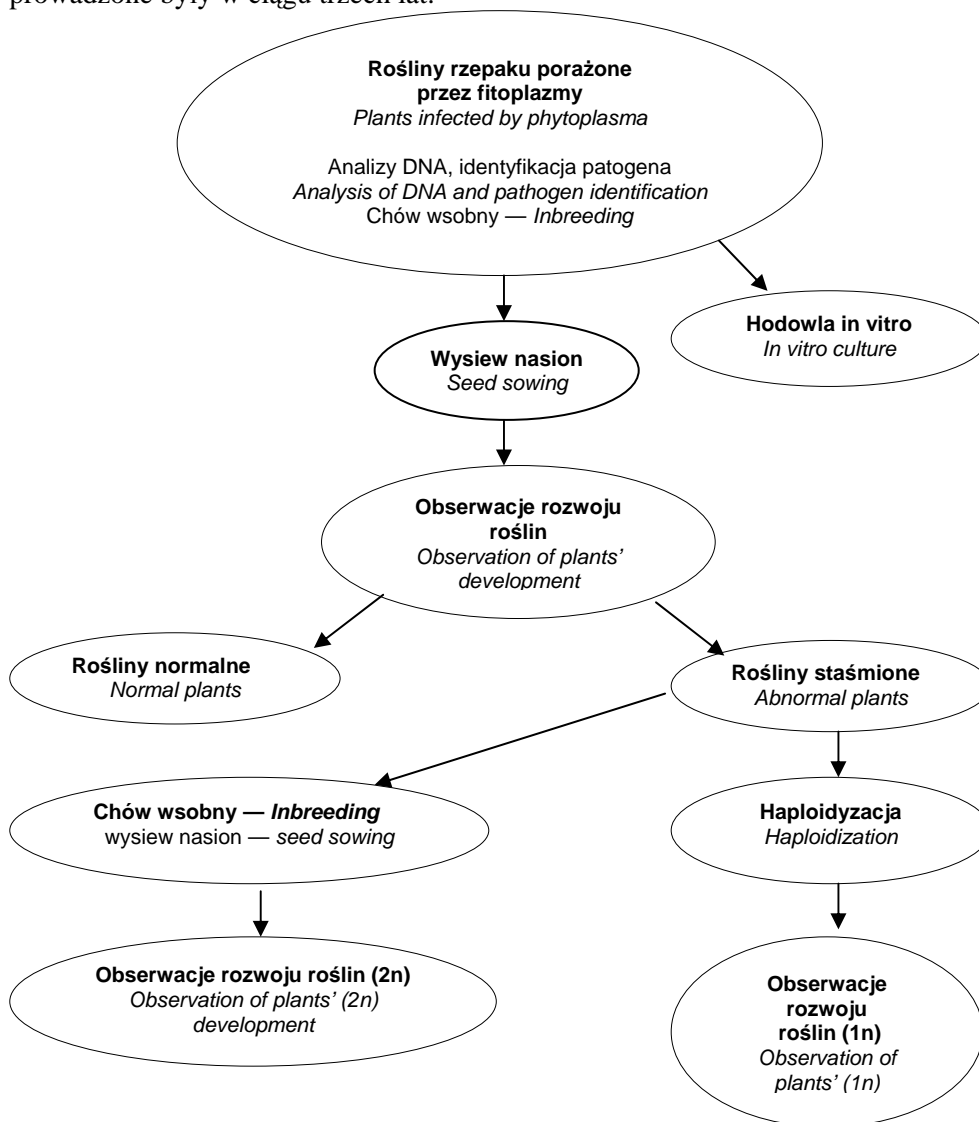
Morfologiczne zmiany kwiatostanu i pojedynczych kwiatów rzepaku po raz pierwszy opisał Schmidt (1955). W następnych latach autorzy — Lehmann (1969), Horvath (1969), Gundersen i in. (1994) — opisali przyczynę silnych zniekształceń roślin oraz etiologię i symptomatologię patogena odpowiedzialnego za zakłócenia wzrostu i nieprawidłową organogenezę. Początkowo sądzono, że za istniejący stan rzeczy odpowiedzialne są wirusy (Valenta, Musil 1963) powodujące żółtaczkę (yellows type viruses). Jednak późniejsze badania wykluczyły tę hipotezę wskazując jednoznacznie właściwych sprawców, którymi okazały się organizmy mykoplazmopodobne (Sears, Kirkpatrick 1994, Gundersen i in. 1994). Dla odróżnienia od bakteryjnych patogenów zwierząt, zwanych mykoplazmami, wprowadzono odrębny termin dla bakterii zasiedlających rośliny i nazwano je fitoplazmami. Wektorami fitoplazm są owady z rodziny skoczkwatych (Jasside), u których patogen występuje w postaci inkluzji. Obecnie przy pomocy technik z zakresu biologii molekularnej jest możliwa identyfikacja samych fitoplazm i ich różnych patotypów. Na plantacjach rzepaku ozimego corocznie sporadycznie, można zauważyć „miotlasto” wyglądające rośliny. W celu potwierdzenia obecności fitoplazm w roślinach *B. napus* przeprowadzono wstępne badania przy pomocy analizy DNA-PCR.

Materiały i metody

Rośliny rzepaku ozimego z oznakami porażenia przez fitoplazmy pobrano z trzech różnych miejscowości: Borowa, Małyszyna i Bąkowa. Silnie zdeformowane górne części roślin odcinano skalpelem i przenoszono do woreczków polietylenowych, a następnie transportowano do Pracowni Metod Hodowli Odpornościowej w Poznaniu. Fragmenty roślin pobrane z pól leżących bliżej Poznania, a więc z Borowa i Małyszyna przewożono w temperaturze 20°C, a z dalej leżącej miejscowości — Bąkowa w około 0°C. Odcięte pędy zalewano ciekłym azotem i przechowywano w temperaturze -27°C. Izolację całkowitego DNA wykonano metodą Doyle J.J., Doyle J.L. (1990). Do analizy PCR użyto dwie pary uniwersalnych starterów identyfikujących fitoplazmy: rU3/fU5 — amplifikujące około 880 pz (Lorenz i in. 1995) oraz rA16/fA16 (Ahrens, Seemuller 1992, Schneider i in. 1993) amplifikujące 558 pz. Jako wzorca fitoplazm z grupy AAY (Kamińska, Korbin 1999) użyto DNA porażonej rośliny *Catharanthus roseus* L. (Kamińska i in. 1996).

Do klonowania porażonych roślin rzepaku wykorzystano pożywkę agarową B₅ (Gamborg i in. 1968) wzbogaconą w carbenicylinę (800 mg/l).

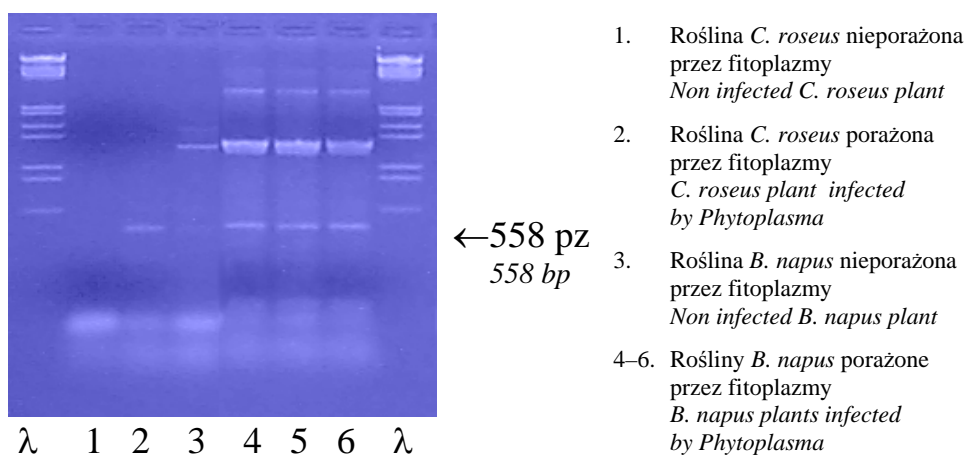
Z niektórych słabiej porażonych roślin otrzymano nasiona, które wysiano. Po okresie jaryzacji izolowano oraz poddano haploidyacji tylko rośliny staśmione wchodzące w fazę kwitnienia (Cegielska-Taras, Szała 1997). Obserwacje rozwoju haploidów (1n) prowadzono od stadium siewki in vitro do stadium dorosłej rośliny (in vivo). Podobnie postępowano z roślinami diploidalnymi (2n) otrzymanymi z nasion pochodzących z chowu wsobnego roślin staśmionych (rys. 1). Badania prowadzone były w ciągu trzech lat.



Rys. 1. Schemat wykonanych badań — *Scheme of the research*

Wyniki

Porównując pola Zakładów Doświadczalnych Hodowli i Aklimatyzacji Roślin Borowa, Małyszyna i Bąkowa, w 1999 roku odnotowano występowanie podobnej liczby porażonych przez fitoplazmy roślin *B. napus*. Na powierzchni około 100 m² zaobserwowano od 2 do 5 roślin z typowymi morfologicznymi deformacjami kwiatów i kwiatostanów. Aby potwierdzić występowanie fitoplazm w rzepaku ozimym użyto analizy PCR jednoznacznie stwierdzającej obecność patogena w roślinach (Bertaccini i in. 1998). We fragmentach porażonych roślin transportowanych zarówno w temperaturze wyższej (około 20°C) jak i niższej (około 0°C), a następnie analizowanych z zastosowaniem PCR stwierdzono obecność fitoplazm (rys. 2, 3). Wyjątek stanowiła próba szósta na rys. 3, gdzie nie znaleziono fragmentu DNA długości 880 pz.

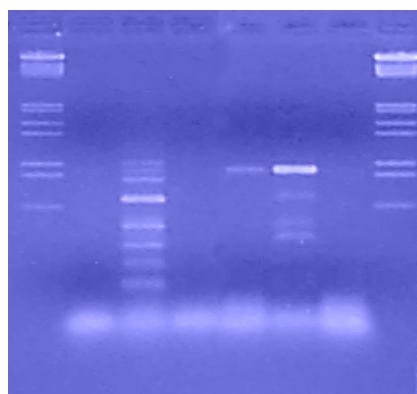


Rys. 2. Amplifikowane DNA fitoplazm (558 pz) przy zastosowaniu PCR ze starterami fA16/rA16 (Ahrens, Seemuller 1992, Schneider i in. 1993) — *PCR analysis specific for phytoplasma fA16/rA16 (558bp)*

Wszystkie rośliny, u których za pomocą PCR stwierdzono obecność patogena, po rozklonowaniu na pożywce agarowej (Gamborg B₅ z antybiotykiem), po 12 miesiącach hodowli w warunkach *in vitro* nie wykazywały żadnych zmian chorobowych. Po przeniesieniu ich do gleby rozwijały się w sposób normalny, do zawiązania nasion włącznie.

Z roślin porażonych przed kwitnieniem (fot. 1) nie otrzymano nasion. Z roślin, u których objawy pojawiły się w czasie kwitnienia (fot. 2) oraz po kwitnieniu (fot. 3) otrzymano nasiona w połowie zniekształcone (popękane), w połowie normalne. Bez względu na to, czy nasiona były dobrze uformowane, czy też nie, otrzymano z nich 30% roślin z objawami staśmienia i 70% roślin

normalnych. Dalsze badania dotyczyły już tylko roślin staśmionych, które poddano haploidyżacji i izolowano. Wszystkie otrzymane rośliny z zarodków mikrosporowych, w liczbie około 200, były silnie zniekształcone i nie posiadały wyróżnionego stożka wzrostu pędu (fot. 4). Identyczne objawy towarzyszyły obserwowanym 453 roślinom diploidalnym otrzymanym z nasion pochodzących z izolowanych roślin staśmionych (fot. 5).



←880 pz
880 bp

1. Roślina *C. roseus* nieporażona przez fitoplazmy — *Non infected C. roseus plant*
2. Roślina *C. roseus* porażona przez fitoplazmy — *C. roseus plant infected by Phytoplasma*
3. Roślina *B. napus* nieporażona przez fitoplazmy — *Non infected B. napus plant*
- 4-6. Rośliny *B. napus* porażone przez fitoplazmy — *B. napus plants infected by phytoplasma-like organisms*

Rys. 3. Amplifikowane DNA fitoplazm (880 pz) przy zastosowaniu PCR ze starterami fU5/rU3 (Lorenz i in. 1995) — *PCR analysis specific for Phytoplasma fU5/rU3, (880 bp)*



Fot. 1. Zdeformowana roślina rzepaku ozimego w fazie przed kwitnieniem porażona przez fitoplazmy *Plant deformation before flowering stage due to the Phytoplasma infection*



Fot. 2. Zdeformowana roślina rzepaku ozimego w fazie kwitnienia porażona przez fitoplazmy
Plant deformation at flowering stage due to the Phytoplasma infection



Fot. 3. Zdeformowana roślina rzepaku ozimego w fazie po kwitnieniu porażona przez fitoplazmy.
Plant deformation after flowering stage due to the Phytoplasma infection



Fot. 4. Potomstwo haploidalne ($1n$) rzepaku ozimego otrzymane z mikrospor zdeformowanych roślin ($2n$)
*Plants of haploid ($1n$) progeny of winter oilseed rape obtained from deformed plants ($2n$) of the *B. napus**



Fot. 5. Potomstwo diploidalne ($2n$) rzepaku ozimego otrzymane z nasion zebranych z izolowanych zdeformowanych roślin. W głębi rośliny wzorcowe —
*Plants of diploid ($2n$) of winter oilseed rape grown from the seeds collected on deformed *B. napus* plants after inbreeding. In the background — normal plants*

Dyskusja

Morfologiczne symptomy porażenia roślin przez fitoplazmy są na tyle widoczne, że identyfikacja chorych roślin w warunkach polowych nie przedstawia większej trudności. Zniekształcenia uwidaczniają się z reguły przed kwitnieniem, mogą być widoczne w czasie kwitnienia oraz po kwitnieniu rzepaku (fot. 1, 2, 3). Czas wystąpienia objawów chorobowych decyduje o powstawaniu nasion. Jeżeli symptomy porażenia są widoczne przed kwitnieniem, to u takich roślin najczęściej nie dochodzi do zawiązywania nasion. W przypadku, gdy symptomy infekcji występują później można oczekiwać niewielkiej liczby normalnie wykształconych nasion, a także zdeformowanych i splekanych. Na polach rzepaku spotkać można także rośliny staśmione, zbliżone wyglądem do roślin porażonych przez fitoplazmy, lecz z prawidłowo rozwiniętymi kwiatami. U roślin porażonych kwiaty rzepaku ulegają silnej deformacji. Płatki korony z reguły przekształcają się w twory liściopodobne o barwie jasnozielonej, słupki są puste, rozdęte i wyrastają do około 5 cm. Bertaccini i in. (1998) opisali i przedstawili podobne symptomy związane z porażeniem roślin rzepaku przez fitoplazmy, lecz nie analizowali potomstwa roślin zainfekowanych. W swoich badaniach wykorzystali oni szereg metod badawczych identyfikujących patogena, np. mikroskopię elektronową, RFLP oraz sekwencjonowanie fragmentów otrzymanych po działaniu enzymów restrykcyjnych, analizę PCR ze starterami P1 i P7 (Deng, Hiruki 1991; Kirpatrick i in. 1994).

W przedstawionej pracy potwierdzono obecność fitoplazm w rzepaku przy użyciu dwóch par starterów: rU3/fU5 (Lorenz i in. 1995), rA16/fA16 (Ahrens, Seemuller 1992). Po amplifikacji DNA długości 880 pz z fitoplazm, w jednym przypadku (pozycja 6) nie otrzymano charakterystycznego prążka. Dla tej samej próby otrzymano amplikowane DNA długości 558 pz. Sytuacja ta nie została wyjaśniona (Kamińska 1998 – informacja ustna).

Potomstwo roślin staśmionych we wszystkich przypadkach było zdeformowane morfologicznie zarówno w pokoleniu haploidalnym (fot. 4), jak i w diploidalnym (fot. 5). Należy przypuszczać, że za istniejący stan są odpowiedzialne nieznanne jeszcze i niezidentyfikowane metabolity fitoplazm o działaniu mutagennym, które mogą mieć bezpośredni wpływ na deformację roślin porażonych, jak i ich gamet.

Podobne do porażenia fitoplazmami symptomy obserwowane są przez hodowców i plantatorów rzepaku po opryskaniu różnymi herbicydami (np. Command – informacja ustna).

Podczas prowadzenia badań w zakresie hodowli *in vitro* zarodków mikrosporowych czy embrionów diploidalnych na pożywkach z wysokimi stężeniami fitohormonów (IAA, BAP, 2,4D) obserwowano pewien niewielki procent roślin *B. napus* podobnych do potomstwa roślin porażonych przez fitoplazmy.

Deformacje roślin potomnych otrzymanych z nasion roślin porażonych mają charakter trwały, mimo braku patogena, co stanowi informację o dużym prawdopodobieństwie, że nastąpiły zmiany genetyczne (mutacja) rzepaku. Hipoteza ta powinna jednak zostać potwierdzona za pomocą technik z zakresu biologii molekularnej.

Znamienny wydaje się fakt uzdrowienia roślin porażonych przez fitoplazmy (Borecki 1996). Po roku hodowli w warunkach *in vitro* na pożywce Gamborg B₅ z carbeniciliną, z odciętych, zdeformowanych działaniem fitoplazm pędów porażonych roślin otrzymano normalne rośliny nie różniące się od form zdrowych.

Wnioski

- Zaprezentowana w opracowaniu analiza PCR jest przydatna dla stwierdzenia obecności fitoplazm w roślinach rzepaku ozimego.
- Dotychczasowy brak danych o odporności odmian rzepaku jarego i ozimego na porażenie przez fitoplazmy, związane z nim zagrożenie obniżenia plonu nasion jest nowym zadaniem dla badaczy i hodowców.
- Wysoce niepokojący fakt trwałych deformacji potomstwa otrzymanego z roślin porażonych przez fitoplazmy stanowi impuls do dalszych badań w zakresie poznania przyczyn fizjologicznych i genetycznych wywołujących to zjawisko.

Podziękowanie

Autorzy opracowania serdecznie dziękują Pani prof. dr hab. Marii Kamińskiej za przekazanie roślin wzorcowych *C. roseus* oraz specyficznych starterów odróżniających fitoplazmy, co umożliwiło wykonanie pracy.

Literatura

- Ahrens U., Seemüller E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832.
- Bertaccini A., Vorackova Z., Vibio M., Franova J., Navratil M., Špak J., Nebesarova J. 1998. Comparison of phytoplasmas infecting winter oilseed rape in the Czech Republic with Italian *Brassica* phytoplasmas and their relationship to the aster yellows group. *Plant Pathology* 47: 317-324.
- Cegielska-Taras T., Szała L. 1997. Regeneracja roślin z mikrosporowych zarodków rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.). *Rośliny Oleiste XVIII* (1): 21-30.

- Deng S., Hiruki C. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable molecules. *Journal of Microbiological Methods* 14: 53-61.
- Doyle J.J., Doyle J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Gamborg O., Miller R., Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 150: 151-158.
- Gundersen D.E., Lee I.M., Schaff D.A., Harrison N.A., Chang C.J., Davis R.E., Kingsbury D.T. 1996. Genomic diversity and differentiation among phytoplasma strains in 16S rRNA groups I (aster Yellows and related phytoplasmas) and III (X – disease and related phytoplasmas). *International Journal of Systematic Bacteriology* 46: 64-75.
- Horvath J. 1969. Green petal. A new disease of rape in Hungary. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 4: 363-367.
- Kamińska M., Malinowski T., Komorowska B., Rudzińska-Langwald A. 1996. Etiology of yellows and witches' broom symptoms in some ornamental plants. *Proceedings IX Intl. Sym. Virus Dis. Ornam. Plants. Acta Hort.* 432, ISHS 1996.
- Kamińska M., Korbin M. 1999. Graft and dodder transmission of phytoplasma affecting lily to experimental hosts. *Acta Physiologiae Plantarum*, Vol. 21, No 1: 21-26.
- Kirkpatrick B.C., Smart B., Blomaquist C., Guerra L., Harrison N., Ahrens U., Lorenz K.H., Schneider B., Seemüller E. 1994. Identification of MLO strain-specific PCR primers obtained from 16/23S rRNA spacer sequences. *IOM Letters* 3: 261-262.
- Lehmann W. 1969. Blütenvergrünung des Rapes – eine Virose. *Naturwissenschaften* 56: 94-95.
- Lorenz K.H., Schneider B., Ahrens U., Seemüller E. 1995. Detection of apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology* 85: 771-776.
- Schmidt M. 1955. *Landwirtschaftlicher. Pflanzenschutzdienst Deutscher Bauernverlag. Blin. 2, Aufl. 1.*
- Schneider B., Ahrens U., Kirkpatrick B.C., Seemüller E. 1993. Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *J. Gen. Microbiol.* 139: 519-527.
- Sears B.B., Kirkpatrick B.C. 1994. Unveiling the evolutionary relationships of plant pathogenic mycoplasma-like organisms. *ASM News* 60 (6): 307-312.
- Valenta V., Musil M. 1963. Investigation on European Yellows-type viruses. II. The clover dwarf and parastolbur viruses. *Phytopathologische Zeitschrift* 47: 38-65.