

**Identyfikacja wybranych gatunków grzybów z rodzaju  
*Fusarium* z nasion niektórych gatunków roślin uprawnych  
metodą tradycyjną i BIO-PCR**

**TOMASZ KULIK, GABRIEL FORDOŃSKI,  
AGNIESZKA PSZCZÓŁKOWSKA, KRYSZYNA PŁODZIENŃ,  
JACEK OLSZEWSKI**

Katedra Diagnostyki i Patofizjologii Roślin, Uniwersytet Warmińsko – Mazurski w Olsztynie,  
Plac Łódzki 5, 10 – 727 Olsztyn

Department of Diagnostics and Plant Pathophysiology,

University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Plac Łódzki 5, 10 – 727 Olsztyn

Identification of some *Fusarium* species from selected crop seeds using traditional  
method and BIO-PCR

(Otrzymano: 01.04.2005)

### Summary

We identified a species level of the fungal cultures isolated from selected crop seeds using traditional method and BIO-PCR. The use of BIO-PCR did not correspond completely to the morphological analyses. Both methods showed increased infection with *F. poae* in winter wheat seed sample originated from north Poland. Fungal culture No 40 (isolated from faba bean and identified with traditional method as mixed culture with *F. culmorum* and *F. graminearum*) did not produce expected product after PCR reaction with species specific primers OPT18F<sub>470</sub>, OPT18R<sub>470</sub>. However, the use of additional primers Fc01F, Fc01R allowed for reliable identification of *F. culmorum* in the culture.

Key words: *Fusarium* spp., identyfikacja, BIO-PCR, SCAR

### WSTĘP I CEL PRACY

Grzyby z rodzaju *Fusarium* reprezentują liczną grupę gatunków stanowiących poważne zagrożenie dla roślin uprawnych na całym świecie. Patogeny te powodują nie

tylko obniżenie plonu roślin, ale i skażenia płodów rolnych niebezpiecznymi dla ludzi i zwierząt mikotoksynami (Leslie i in. 2001). W Polsce do najgroźniejszych patogenów z rodzaju *Fusarium* zalicza się: *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. poae*, *F. oxysporum* i *F. solani* (K w a ś n a i in. 1991). Często tradycyjna identyfikacja poszczególnych gatunków grzybów z rodzaju *Fusarium* jest utrudniona ze względu na dużą zmienność cech morfologicznych, zależną od warunków hodowli oraz różniących się od siebie systemów klasyfikacji (O ' D o n n e l l i C i g e l n i k 1997; O ' D o n n e l l i in. 1998; Y o d e r i C h r i s t i a n s o n 1997; L e s l i e i in. 2001). W związku z powyższym szerokie zastosowanie w diagnostyce *Fusarium* spp. znalazły metody oparte na reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). Metody molekularne uważane są za niezawodne, opłacalne oraz wysoce czułe i szybkie (Schilling i in. 1996, Paveley i in. 1997). Przy identyfikacji czynników chorobotwórczych z nasion pewne trudności mogą przysparzać inhibitory reakcji PCR zanieczyszczające matrycę (P a v e l e y i in. 1997, S t e v e n s i in. 1997). Rozwiązaniem tego problemu może być zastosowanie metody BIO-PCR. W metodzie tej następuje amplifikacja w reakcji PCR DNA pochodzącego z żywych komórek patogena. W metodzie BIO-PCR wyeliminowano prawdopodobieństwo występowania fałszywych wyników negatywnych oraz pozytywnych (S c h a d i in. 1997). Szczególnie zastosowanie w identyfikacji grzybów z rodzaju *Fusarium* znalazły markery SCARs (ang. Sequence Characterized Amplified Regions). W metodzie SCARs zachodzi amplifikacja w reakcji PCR tylko jednego, określonego gatunkowo fragmentu DNA patogena grzybowego. Obecnie wyżej wymienione markery zostały już opracowane dla większości gatunków z rodzaju *Fusarium*, ważnych z gospodarczego punktu widzenia. Markery opracowano między innymi dla: *F. avenaceum* (T u r n e r i in. 1998), *F. culmorum* (S c h i l l i n g i in. 1996, N i c h o l s o n i in. 1998), *F. graminearum* (S c h i l l i n g i in. 1996, N i c h o l s o n i in. 1998), *F. poae* (P a r r y i N i c h o l s o n , 1996), *F. moniliforme* i *F. subglutinans* (M ö l l e r i in. 1999), *F. sambucinum* (Y o d e r i C h r i s t i a n s o n 1997) oraz *F. oxysporum* (E d e l i in. 2000). Celem niniejszej pracy była identyfikacja *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum* i *Fusarium poae* z nasion wybranych gatunków roślin uprawnych metodą tradycyjną i BIO-PCR.

## MATERIAŁ I METODY

Ziarno pszenicy ozimej (odm. Korweta), pszenżyta ozimego (odm. Lamberto), żyta (odm. Motto) oraz nasiona bobiku (odm. Tom) i grochu siewnego (odm. Rola) uzyskano ze Stacji Doświadczalnych Oceny Odmian (tab. 1), pochodzących ze zbiorów okresu wegetacyjnego 2001 r. z pól uprawnych północnej, środkowej i południowej części Polski.

Tabela 1  
Odmiany i pochodzenie poszczególnych prób nasion

Table 1  
Varieties and origin of seed samples

Odmiana Variety	Polska Poland		
	Północna Northern	Środkowa Central	Południowa Southern
	SDOO		
Korweta	Radostowo	Kościelna Wieś	Przeclaw
Lamberto	Karżniczka	Lubinicko	Kochcice
Motto	Ruska Wieś	Lubinicko	Przeclaw
Rola	Radostowo	Kościelna Wieś	Czesławice
Tom	Radostowo	Chrzastowo	Przeclaw

SDOO – Stacja Doświadczalna Oceny Odmian

### Przygotowanie prób

Ziarno pszenicy ozimej, pszenżyta ozimego, żyta oraz nasiona bobiku i grochu siewnego (po 200 sztuk) odkażono poprzez moczenie przez 5 min w 1%  $H_2O_2$ . Po gruntownym przepłukaniu w wodzie destylowanej ziarno i nasiona osuszono i umieszczono na pożywce PDA z dodatkiem antybiotyku (Amikin). Inkubacja następowała w temperaturze 22°C w cieplarni. Strzępki grzybni charakterystyczne dla grzybów z rodzaju *Fusarium* natychmiast izolowano na osobne szalki Petriego do dalszych analiz.

### Identyfikacja grzybów z rodzaju *Fusarium* metodą opartą na cechach morfologicznych

Do celów tradycyjnej identyfikacji izolatów, kultury grzybów przechowywano w warunkach zmiennego (co 12 godz.) naświetlania UV i temperaturze 21–23°C. Po pojawieniu się stadium konidialnego grzybów nastąpiło ich oznaczenie metodą mikroskopową posługując się dostępnymi pracami monograficznymi (Both 1971, Nelson i in. 1983, Kwaśna i in. 1991). Dodatkowo wykonano serię zdjęć wybranych gatunków grzybów pod mikroskopem skaningowym (JSM 5310 LW JEOL) w Katedrze Fizjologii i Biotechnologii Roślin Wydziału Biologii UWM w Olsztynie. Preparaty uprzednio utrwalono w 2.5% aldehydzie glutarowym, odwodniono w etanolu, a następnie suszono w punkcie krytycznym  $CO_2$  (BAL-TEC CDP 030). Następnie preparaty napyłono w napylni jonowej (JSC 1200 JEOL). Zdjęcia wykonano przy napięciu 25 kV.

## **Analizy BIO-PCR**

### **Izolacja DNA grzybowego poprzez prażenie kultur grzybowych w kuchence mikrofalowej (Ferreira i Glass 1996)**

Izolację DNA przeprowadzono zmodyfikowaną metodą prażenia kultur grzybowych w kuchence mikrofalowej (Ferreira i Glass 1996). Modyfikacja metody polegała na tym, że DNA do analiz wyizolowano z grzybni, a nie z zarodników konidialnych jak w oryginalnej pracy. Grzybnię pobrano z pożywki za pomocą skalpela, przeniesiono do probówek Eppendorfa (1,5 ml) i wysuszono. Następnie osuszoną grzybnię poddano napromieniowaniu o mocy 1000 W w kuchence mikrofalowej (Samsung) przez 10 minut. Do materiału dodano 100  $\mu$ l buforu TE, wymieszano na wortexie i zwirowano przez 5 minut w 14000 r.p.m. w wirówce Eppendorf. Supernatant (DNA rozpuszczone w buforze TE) przeniesiono do sterylnej probówki, po czym przystąpiono do reakcji PCR.

### **Reakcja PCR**

W badaniach użyto zestawu MasterAmp Tfl DNA Polymerase (Epicentre Technologies). Reakcję PCR przeprowadzono w termocyklerze Mastercycler gradient (Eppendorf) w objętości 25  $\mu$ l. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły:

- 9,5  $\mu$ l – H<sub>2</sub>O,
- 1,25  $\mu$ l – MasterAmp Tfl 20X PCR Buffer (4 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 9,0, 10 mM Tris-HCl),
- 4  $\mu$ l – MgCl<sub>2</sub> (2 mM),
- 3  $\mu$ l – MasterAmp 10X PCR Enhancer,
- 0,2  $\mu$ l – dNTP Mix (200  $\mu$ M dla każdego z nukleotydów),
- 1  $\mu$ l – f primer (0,4  $\mu$ M),
- 1  $\mu$ l – r primer (0,4  $\mu$ M),
- 0,2  $\mu$ l – MasterAmp Tfl DNA Polymerase (0,2 U),
- 5  $\mu$ l – DNA (10–100 ng)

Charakterystykę primerów zastosowanych w badaniach oraz warunki reakcji PCR przedstawiono w tabeli nr 2. Każdą z reakcji PCR powtórzono trzykrotnie.

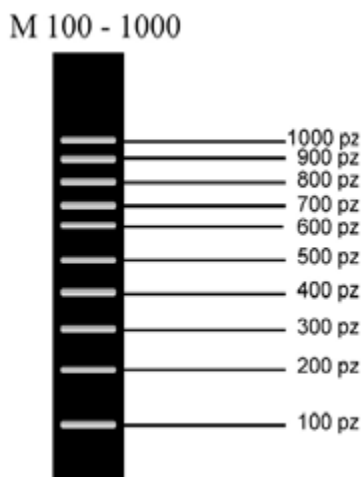
Tabela 2  
Charakterystyka primerów zastosowanych w badaniach oraz warunki reakcji PCR

Table 2  
Primers used in the study and PCR reaction conditions

Nazwa / Sekwencja Name/Sequence	Charakterystyka primerów Primer specificity	Wielkość oczekiwanego produktu Product size	Warunki reakcji PCR PCR reaction conditions	Źródło Reference
P58SL 5'-AGT ATT CTG GCG GGC ATG CCT GT-3' P28SL 5'-ACA AAT TAC AAC TCG GGC CCG AGA-3'	Specyficzny dla rodzaju <i>Fusarium</i>	329 pz	94°C 5 min.; [94°C 1 min, 68°C 1 min., 72°C 1 min.]x40; 72°C 5 min.	Hue i in. 1999.
JIAF 5'-GCT AAT TCT TAA CTT ACT AGG GGC C-3' JIAR 5'-CTG TAA TAG GTT ATT TAC ATG GGC G-3'	Specyficzny dla <i>F. avenaceum</i>	220 pz	94°C 2 min.; [94°C 30 sek., 58°C 30 sek., 72°C 2 min.]x40; 72°C 5 min.	Turner i in. 1998.
OPT18F <sub>470</sub> 5'-GAT GCC AGA CCA AGA CGA AG-3' OPT18R <sub>470</sub> 5'-GAT GCC AGA CGC ACT AAG AT-3'	Specyficzny dla <i>F. culmorum</i>	472 pz	94°C 2 min.; [94°C 1 min., 55°C 1 min., 72°C 2 min.]x40; 72°C 5 min.	Schilling i in. 1996.
UBC85F 5'-GCA GGG TTT GAA TCC GAG AC-3' UBC85R <sub>410</sub> 5'-AGA ATG GAG CTA CCA ACG GC-3'	Specyficzny dla <i>F. graminearum</i>	332 pz	94°C 2 min.; [94°C 1 min., 55°C 1 min., 72°C 2 min.]x40; 72°C 5 min.	
Fp82F 5'-CAA GCA AAC AGG CTC TTC ACC-3' Fp82R 5'-TGT TCC ACC TCA GTG ACA GGT T-3'	Specyficzny dla <i>F. poae</i>	220 pz	94°C 2 min.; [94°C 1 min., 55°C 1 min., 72°C 2 min.]x40; 72°C 5 min.	Parry i Nicholson 1996.
Fc01F 5'-ATG GTG AAC TCG TCG TGG C-3' Fc01R 5'-CCC TTC TTA CGC CAA TCT CG-3'	Specyficzny dla <i>F. culmorum</i>	570 pz	94°C 5 min.; [94°C 20 sek., 66°C 1 min., 72°C 45 sek.]x5, [94°C 20 sek., 64°C 1 min., 72°C 45 sek.]x5, [94°C 20 sek., 62°C 1 min., 72°C 45 sek.]x25; 72°C 5 min.	Nicholson i in. 1998.
Fg16NF 5'-ACA GAT GAC AAG ATT CAG GCA CA-3' Fg16NR 5'- TTC TTT GAC ATC TGT TCA ACC CA-3'	Specyficzny dla <i>F. graminearum</i>	280 pz		

### Elektroforeza i wizualizacja produktu reakcji PCR w świetle UV

Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR nastąpił w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny zanurzonemu w buforze TBE w polu elektrycznym pod napięciem 60V przez 1,5 godz. Wizualizacja produktów po reakcji PCR na żelu agarozowym nastąpiła na transilluminatorze (Fotodyne) w świetle UV. Wielkość produktów reakcji PCR oceniono porównując do markera M100–1000 (rys. 1). Obraz zarchiwizowano za pomocą programu Gel Pro (Fotodyne).



Rys. 1 Wzorzec masowy M 100–1000

Fig. 1 Molecular weight marker

## WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

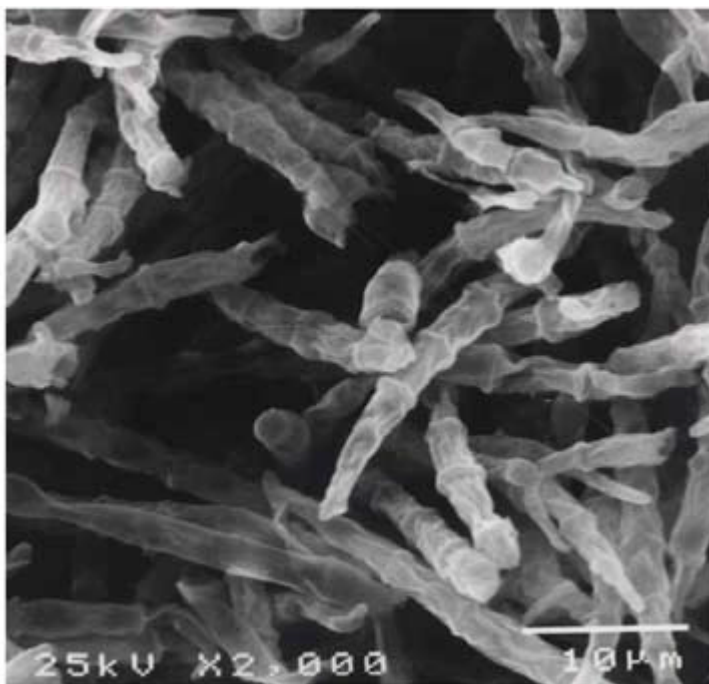
### Tradycyjna metoda identyfikacji grzybów z rodzaju *Fusarium*

W tabeli nr 3 podano wykaz kultur grzybowych zidentyfikowanych metodą tradycyjną oraz BIO-PCR z uwzględnieniem gatunków roślin żywicielskich i miejscowości.

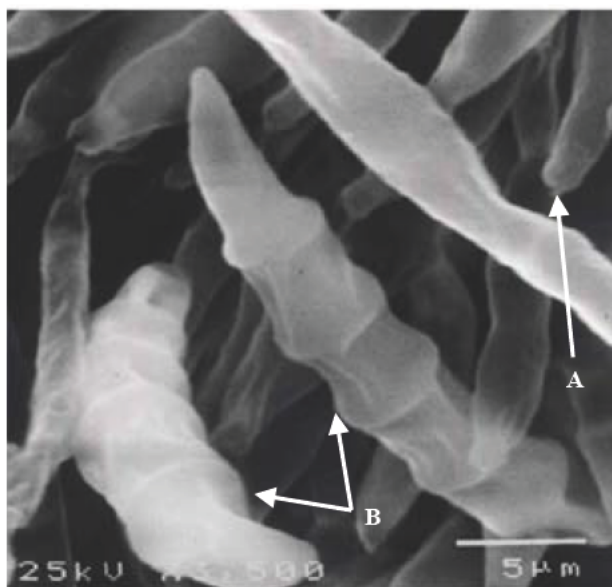
Identyfikacji *F. avenaceum* dokonano na podstawie makrokonidiów pochodzących z grzybni powietrznej i ze sporodochiów, wrzecionowatych lub nieco sierpowato wygiętych (fot. 1). Natomiast podstawą do identyfikacji *F. culmorum* były grube, krótkie i silnie grzbietowo wygięte, 4-6 komórkowe makrokonidia (fot. 2) oraz liczne chlamydospory. Identyfikacji *F. graminearum* dokonano na podstawie makrokonidiów wytworzonych na monofialidach oraz chlamydospor (fot. 3). Makrokonidia były umiarkowanie sierpowate, zawierające do 8 przegród. Z kolei oznaczenia *F. oxysporum* dokonano na podstawie mikrokonidiów, które były owalne (fot. 4) i sierpowatych, 4-6

komórkowych makrokonidiów. Cechą charakterystyczną dla *F. oxysporum* jest wytwarzanie dużej liczby chlamydospor kształtu owalnego występujących pojedynczo lub parami. Gatunek *F. poae* zidentyfikowano na podstawie mikrokonidiów (fot. 5), które były kuliste i występowały licznie w konidioforach. Podstawą do oznaczenia *F. sporotrichioides* były liczne i owalne, zakończone krótkim wyrostkiem u podstawy mikrokonidia (fot. 6). Makrokonidia były krótkie, sierpowate, najszersze w górnej 1/3 części swojej długości. Do identyfikacji *F. sporotrichioides* posłużyło także charakterystyczne dla tego gatunku zakończenie konidiofor z polifialidami. Identyfikacji *F. tricinctum* dokonano na podstawie cytrynowatych, rzadziej gruszkowatych mikrokonidiów (fot. 7).

Zastosowanie metody molekularnej BIO-PCR podyktowane było faktem, że nie wszystkie kultury zostały wstępnie poprawnie sklasyfikowane. Napotkano poważne trudności z jednoznacznym określeniem przynależności gatunkowej kultur nr 1, 12, 13 i 14. Kultury te zostały sklasyfikowane jako *F. culmorum* lub *F. graminearum*. Wynika to z dużego podobieństwa cech morfologicznych tych gatunków, które są blisko spokrewnione (Schilling i in. 1996). Podobną trudność napotkano przy identyfikacji kultur nr 8, 37 i 43 ze względu na duże podobieństwo cech morfologicznych między gatunkami *F. sporotrichioides* a *F. poae*.

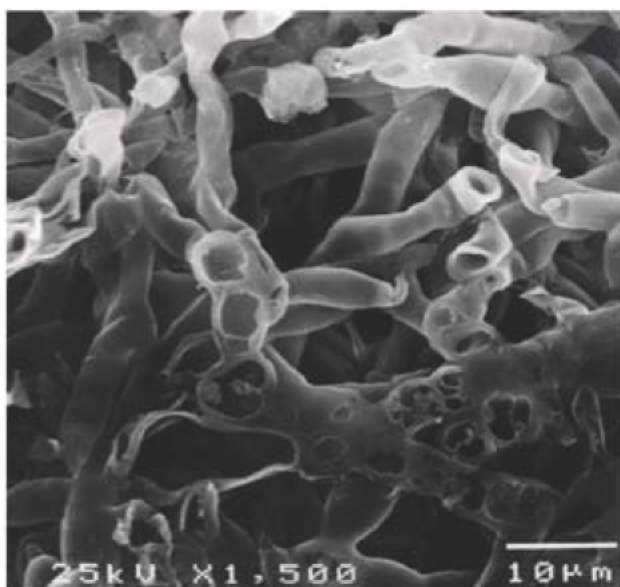


Fot. 1. *Fusarium avenaceum*: makrokonidia,  
Photo 1. *Fusarium avenaceum*: macroconidia,



Fot. 2. *Fusarium culmorum*: A – trzonki konidialne, B – zarodniki

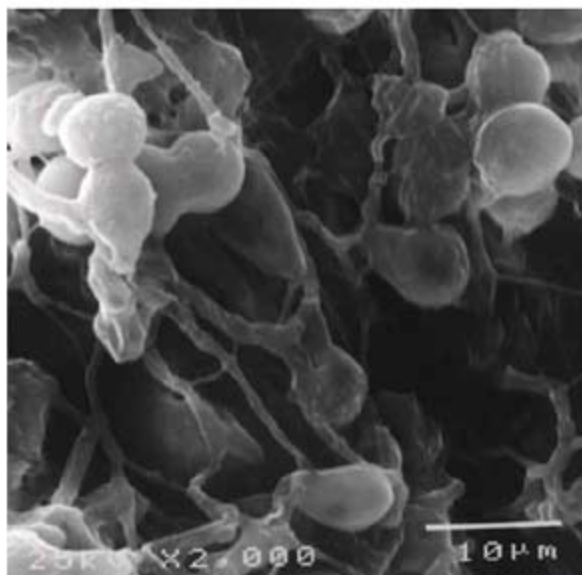
Photo 2. *Fusarium culmorum*: A – conidiofores, B – spores



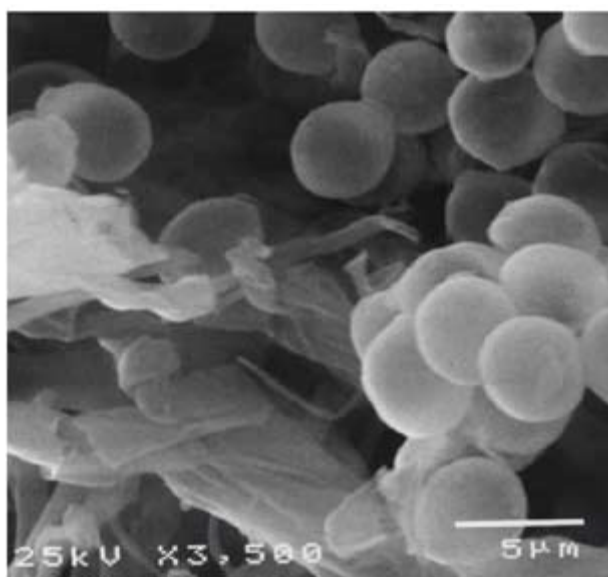
Fot. 3. *Fusarium graminearum*: fialidy,

Photo 3. *Fusarium graminearum*: phialides

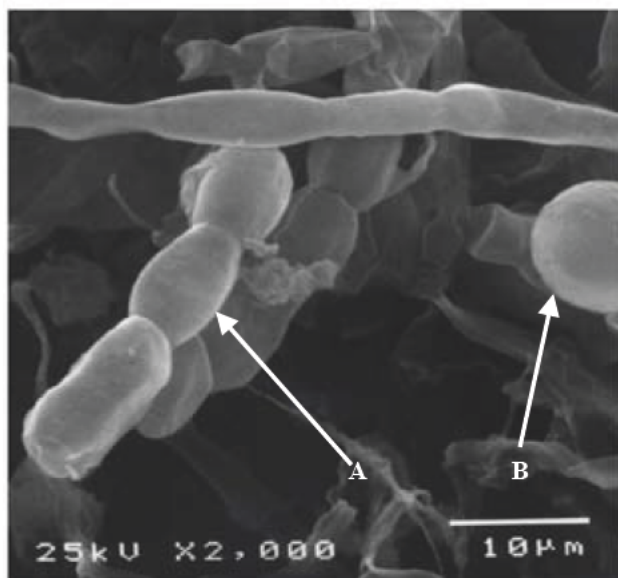




Fot. 4. *Fusarium oxysporum*: chlamydospory  
Photo 4. *Fusarium oxysporum*: chlamydospores

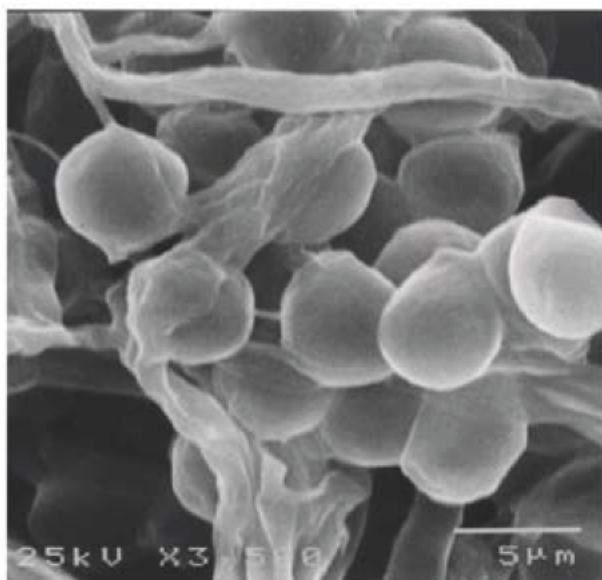


Fot. 5. *Fusarium poae*: zarodniki  
Photo 5. *Fusarium poae*: spores



Fot. 6. *Fusarium sporotrichioides*: A – chlamydospory, B – zarodniki

Photo 6. *Fusarium sporotrichioides*: A – chlamydospores, B – spores



Fot. 7. *Fusarium tricinctum*: zarodniki

Photo 7. *Fusarium tricinctum*: spores

Tabela 3  
Wykaz kultur grzybowych zidentyfikowanych metodą tradycyjną i BIO-PCR  
Table 3  
Fungal cultures identified with traditional method and BIO-PCR

Gatunek Species	SDOO	Gatunek grzyba (Fungal species)							
		Fusarium avenaceum	Fusarium culmorum	Fusarium graminearum	Fusarium oxysporum	Fusarium poae	Fusarium sporotrich.	Fusarium tricinctum	
Pszemica ozima	Radostowo	-		1*	-	2*,3*,4*,5*,6*,7*,8*,9*,10*,11*	-	-	-
	Kościelna Wieś	-	12*,13*,14*	-	-	-	-	-	-
	Przeclaw	-	-	-	-	15*	-	-	-
Pszemczyto ozime	Karżniczka	16*,21*	17*,19*,20*	18*	-	22*	-	-	-
	Lubinicko	-	-	-	-	-	-	-	-
	Kochcice	28*	-	23*,24*,25*,26*	27	-	-	-	-
Żyto ozime	Ruska Wieś	-	-	-	-	-	-	-	-
	Lubinicko	-	-	-	-	-	-	-	-
	Przeclaw	-	-	-	-	-	-	-	-
Groch siewny	Radostowo	-	-	-	-	29*,30*	-	-	-
	Kościelna Wieś	31*,32*	-	-	-	-	-	-	-
	Czesławice	-	-	-	-	33*	-	-	34,35
Bobik	Radostowo	-	-	-	-	-	-	36,37	-
	Chrzastowo	38*	-	-	-	-	-	-	-
	Przeclaw	41*	40*	40*	39	-	-	42,43	-

SDOO – Stacja Doświadczalna Oceiny Odmian, 40 – mieszaną infekcją *F. culmorum* i *F. graminearum*

\*- identyfikacja patogena metodą BIO-PCR, wytuszczoną czcionką oznaczono kultury, których identyfikacja metodą tradycyjną nie była jednoznaczna

SDOO – Experimental Station for Cultivars Evaluation – joint infection *F. culmorum* and *F. graminearum*

\*- pathogen identification with BIO-PCR; cultures which identification was not certain are marked with bold

### **Izolacja DNA grzybowego poprzez prażenie kultur grzybowych w kuchence mikrofalowej (Ferreira i Glass 1996)**

W badaniach własnych zastosowano metodę izolacji DNA z wykorzystaniem kuchenki mikrofalowej (Ferreira i Glass 1996). Jest to metoda szybka (trwa około 1,5 godz.), a przy tym nie używa się w niej związków chemicznych niebezpiecznych dla zdrowia. Ponadto w metodzie tej nie stosujemy substancji inhibujących reakcję PCR (np. etanolu) wykorzystywanych pospolicie przy tradycyjnych metodach izolacji DNA (Hue i in. 1999). W pracy zdecydowano się na izolację DNA z komórek grzybni wyrosniętej nad powierzchnię agaru (grzybnia powietrzna), ponieważ agar może hamować proces reakcji PCR (Gibb i Wong 1998). Dodatkowo wydłużono czas ekspozycji materiału w mikrofalówce do 10 min.

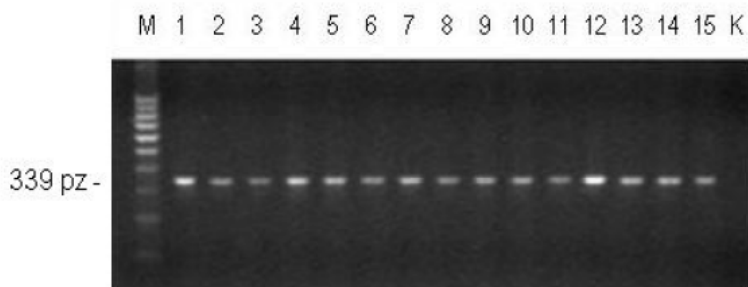
Obserwacje własne przy użyciu mikroskopu optycznego dowiodły, iż ściana komórkowa strzępek grzybni ulega łatwiej zniszczeniu w przeciwieństwie do ściany otaczającej zarodniki. Wyjątek stanowi *F. poae*, którego zarodniki konidialne posiadają ścianę komórkową delikatniejszą i łatwiejszą do zniszczenia w porównaniu z innymi sierpikami. Należy także dodać, że wydajniej następuje izolacja z grzybni świeżej (2–7 dniowej).

Wadą BIO-PCR zdaniem Schaad i in. (1997) przy identyfikacji *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* z nasion jest możliwość identyfikacji słabych fizjologicznie lub częściowo uszkodzonych komórek patogena. Poprzez płukanie nasion w roztworze Tween 20, a następnie posiewie wypłukanych komórek patogena na pożywkę może nastąpić wzrost inokulum nieinfekcyjnego, zanieczyszczającego jedynie okrywę owocowo nasienną. W badaniach własnych etap odkażenia materiału zapewnił zredukowanie rozwoju na pożywce bakterii, grzybów saprotroficznych, a także patogenicznych zanieczyszczających okrywę owocowo nasienną.

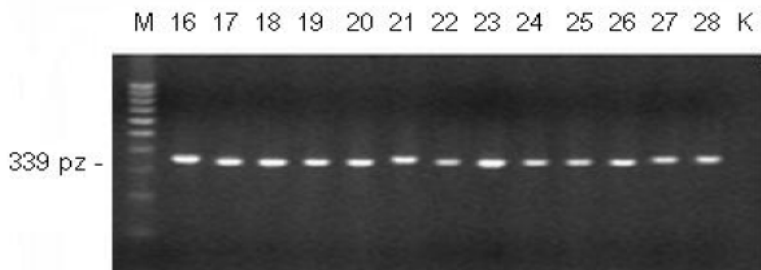
### **Analizy PCR z użyciem specyficznych primerów SCARs**

Identyfikację grzybów z rodzaju *Fusarium* przeprowadzono z użyciem primerów typu SCARs. W związku z tym zweryfikowano przynależność wszystkich 43 uzyskanych kultur do rodzaju *Fusarium*, zamieszczonych w tabeli nr 3.

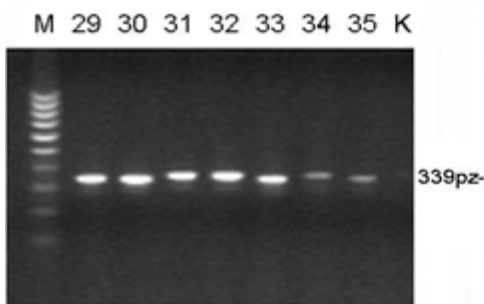
Początkowo w reakcji PCR zastosowano parę starterów P58SL, P28SL uniwersalnych dla rodzaju *Fusarium* (Hue i in. 1999). W wyniku reakcji PCR uzyskano jednakowy produkt wielkości 339 pz u wszystkich 43 testowanych kultur (fot. 8, 9, 10, 11).



Fot. 8. Identyfikacja grzybów z rodzaju *Fusarium* z ziarna pszenicy ozimej metodą BIO-PCR  
 Photo 8. Identification of *Fusarium* spp. from winter wheat grain with BIO-PCR method



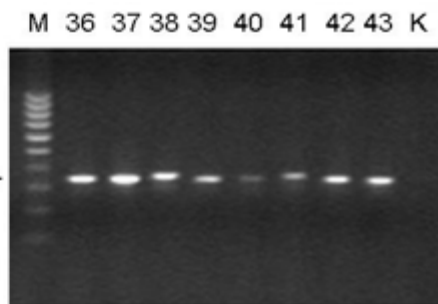
Fot.9. Identyfikacja grzybów z rodzaju *Fusarium* z ziarna pszenżyta ozimego metodą BIO-PCR  
 Photo 9. Identification of *Fusarium* spp. from winter triticale grain with BIO-PCR method



Fot.10 Identyfikacja grzybów z rodzaju *Fusarium* z nasion grochu metodą BIO-PCR

M – marker M100-1000, K – kontrola  
 Photo 10 Identification of *Fusarium* spp. from pea seeds with BIO-PCR method

M– marker M100-1000, K – controls



Fot.11 Identyfikacja grzybów z rodzaju *Fusarium* z nasion bobiku metodą BIO-PCR

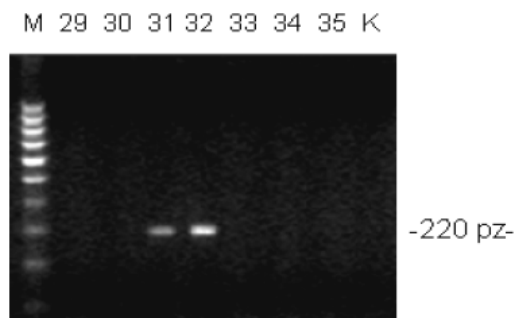
Photo 11 Identification of *Fusarium* spp. from field bean seeds with BIO-PCR method

Następnie w celu detekcji *F. avenaceum* w reakcji PCR użyto pary starterów SCARs JIAF, JIAR (Turner i in. 1998). Za pomocą markera SCARs zidentyfikowano *F. avenaceum* z ziarna pszenżyta ozimego (kultury nr 16, 21 i 28, fot. 12), grochu siewnego (kultury nr 31 i 32, fot. 13), oraz bobiku (kultury nr 38 i 41, fot. 14), otrzymując w wyniku reakcji PCR produkt wielkości 220 pz zgodnie z badaniami Turner i in. (1998).



Fot. 12. Identyfikacja *F. avenaceum* z ziarna pszenżyta ozimego metodą BIO-PCR

Photo 12. Identification of *Fusarium avenaceum* from winter triticale grain with BIO-PCR method

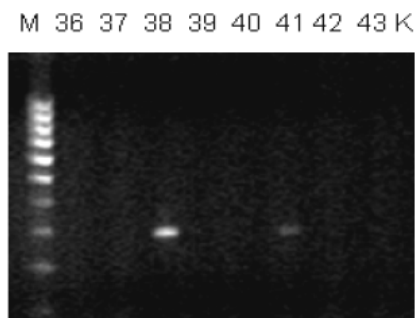


Fot. 13. Identyfikacja *F. avenaceum* z nasion grochu metodą BIO-PCR

M – marker M100-1000,  
K – kontrola (brak DNA)

Photo 13. Identification of *F. avenaceum* from pea seeds with BIO-PCR method

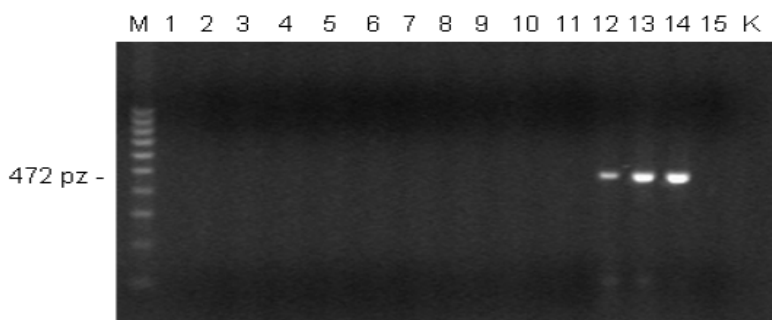
M – marker M100-1000  
K – controls (no DNA)



Fot. 14. Identyfikacja *F. avenaceum* z nasion bobiku metodą BIO-PCR

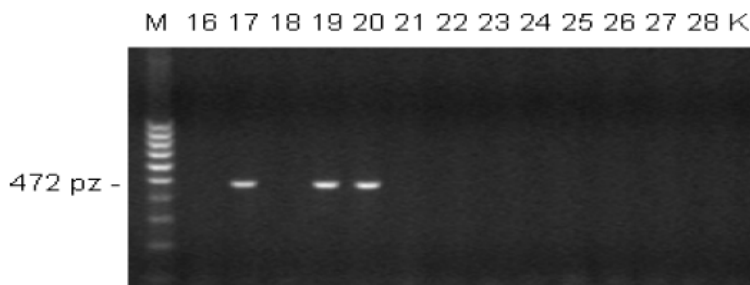
Photo 14. Identification of *F. avenaceum* from field bean seeds with BIO-PCR method

Z kolei zastosowanie pary starterów SCARs: OPT18F<sub>470</sub>, OPT18R<sub>470</sub> opracowanych przez Schilling i in. (1996), w reakcji SCARs umożliwiło na zakwalifikowanie kultur nr 12, 13 i 14 pochodzących z ziarna pszenicy ozimej jako *F. culmorum* (fot. 15). Także kultury nr 17, 19 i 20 pochodzące z ziarna pszenżyta ozimego oznaczono jako *F. culmorum* (fot. 16). W reakcji SCARs uzyskano produkt wielkości 472 pz u wszystkich kultur *F. culmorum* zgodnie z wynikami badań Schilling i in. (1996), twórców powyższych primerów.



Fot. 15. Identyfikacja *F. culmorum* z ziarna pszenicy ozimej metodą BIO-PCR

Photo 15. Identification of *F. culmorum* from winter wheat grain with BIO-PCR method



Fot. 16. Identyfikacja *F. culmorum* z ziarna pszenżyta ozimego metodą BIO-PCR

M – marker M100-1000

K – kontrola (brak DNA)

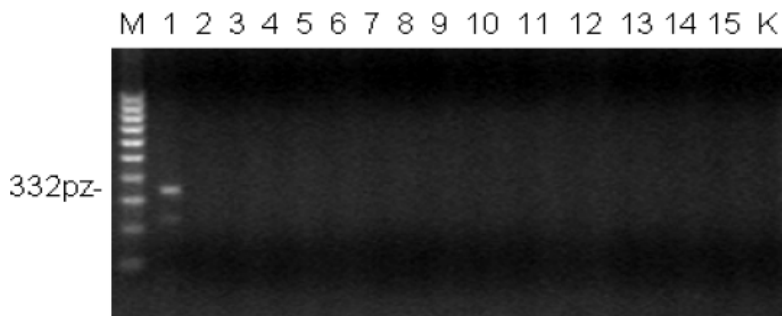
Photo 16. Identification of *F. culmorum* from winter triticale grain with BIO-PCR method

M – marker M100-1000

K – controls (no DNA)

W celu wykrycia *F. graminearum* zastosowano parę starterów SCARs: UBC85F<sub>410</sub>, UBC85R<sub>410</sub> (Schilling i in. 1996). Kulturę grzybową nr 1 uzyskaną z pszenicy

ozimej zakwalifikowano jako *F. graminearum* (fot. 17). W próbie nr 1 oprócz właściwego produktu wielkości 332 pz, zaszła także niespecyficzna amplifikacja, czego dowodem jest dodatkowy słaby prążek ok. 250 pz. Kultury nr 18, 23, 24, 25 i 26 otrzymane z pszenżyta ozimego zidentyfikowano także jako *F. graminearum* (fot. 18). Produkt reakcji PCR wielkości 332 pz. był charakterystyczny dla wszystkich przeanalizowanych kultur *F. graminearum*, jak wykazali Schilling i in. (1996).



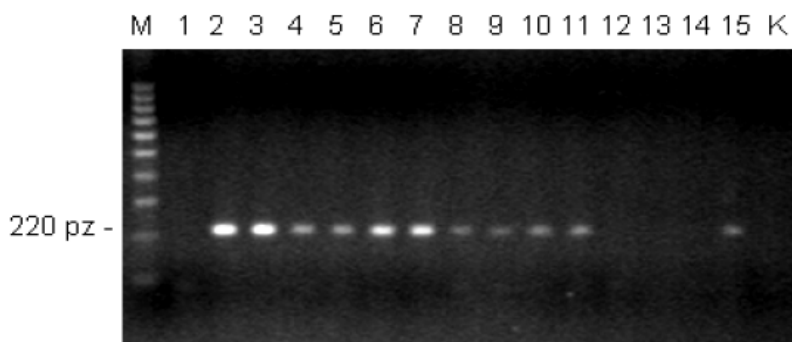
Fot. 17. Identyfikacja *F. graminearum* z ziarna pszenicy ozimej metodą BIO-PCR  
Photo 17. Identification of *F. graminearum* from winter wheat grain with BIO-PCR method.



Fot. 18. Identyfikacja *F. graminearum* z ziarna pszenżyta ozimego metodą BIO-PCR  
M – marker M100-1000  
K – kontrola (brak DNA)  
Photo 18. Identification of *F. graminearum* from winter triticale grain with BIO-PCR method  
M – marker M100-1000  
K – controls (no DNA)

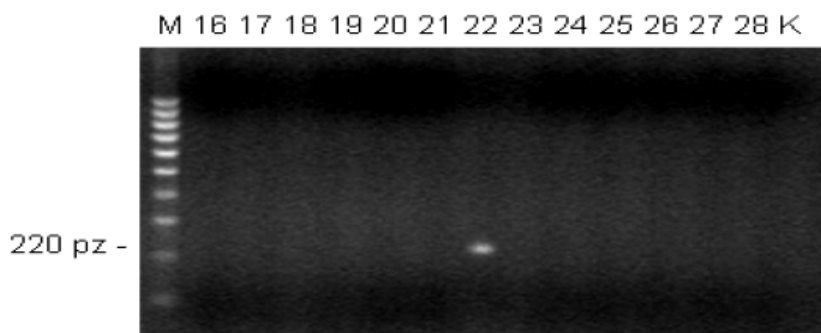


Aby dokonać identyfikacji *F. poae* w reakcji PCR użyto pary starterów SCARs Fp82F, Fp82R (Parry i Nicholson 1996). Pozwoliło to na określenie kultur nr 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 i 15 uzyskanych z pszenicy ozimej jako *F. poae* (fot. 19). Również kulturę nr 22 pochodzącą z ziarna pszenżyta ozimego określono jako *F. poae* (fot. 20). Za pomocą wspomnianego markera kultury grzybowe o numerach 29, 30 i 33 pochodzące z nasion grochu siewnego zakwalifikowano do gatunku *F. poae* (fot. 21). Wszystkie z przebadanych kultur dały w reakcji PCR produkt wielkości 220 pz, co jest zgodne z wynikami badań Parry i Nicholson (1996).



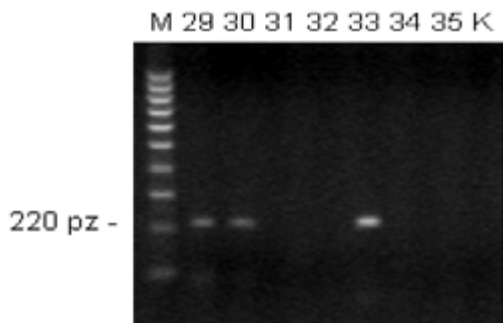
Fot. 19. Identyfikacja *F. poae* z ziarna pszenicy ozimej metodą BIO-PCR

Photo 19. Identification of *F. poae* from winter wheat grain with BIO-PCR method



Fot. 20. Identyfikacja *F. poae* z ziarna pszenżyta ozimego metodą BIO-PCR

Photo 20. Identification of *F. poae* from winter triticale grain with BIO-PCR method



Fot. 21. Identyfikacja *F. poae* z nasion grochu metodą BIO-PCR

M – marker M100-1000

K – kontrola (brak DNA)

Photo 21. Identification of *F. poae* from pea seeds with BIO-PCR method

M – marker M100-1000

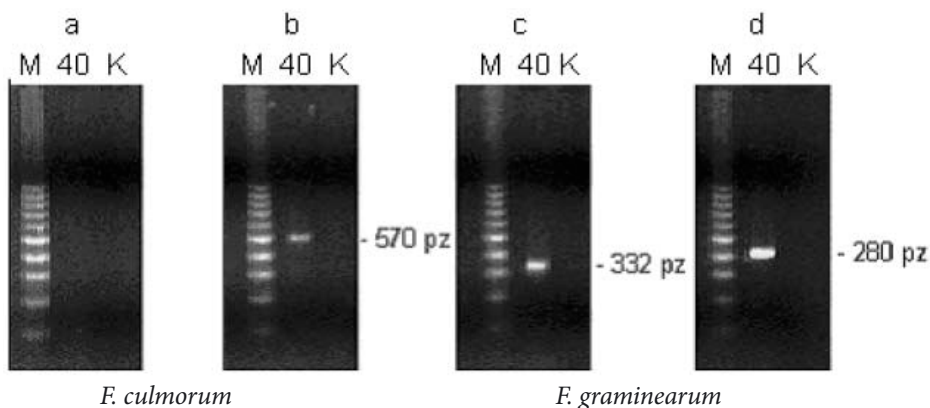
K – controls (no DNA)

W pracy ograniczono się tylko do identyfikacji tych gatunków grzybów, dla których zostały opracowane zestawy primerów SCARs.

Z przeprowadzonych analiz identyfikacji metodą tradycyjną i molekularną wykazano stosunkowo wysokie porażenie ziarna pszenicy ozimej przez *F. poae*, szczególnie z rejonu Polski północnej (tab. 3). Jednocześnie nie stwierdzono obecności gatunków z rodzaju *Fusarium* w ziarnie żyta.

W badaniach zweryfikowano użyteczność markerów SCARs do identyfikacji grzybów z rodzaju *Fusarium* wyizolowanych z nasion pochodzących z różnych rejonów Polski. W badaniach Schilling i in. (1996) wykazano, że spośród sześćdziesięciu dziewięciu kultur *F. culmorum* wystąpił brak amplifikacji DNA u czterech z nich. Amplifikacja DNA *F. graminearum* za pomocą pary primerów UBC85<sub>410</sub>F, UBC85<sub>410</sub>R była możliwa w przypadku kultur grupy drugiej. Ogółem spośród trzydziestu dziewięciu, pięć zakwalifikowanych do grupy pierwszej nie dało oczekiwanego produktu 332 pz w reakcji PCR.

W badaniach własnych wykazano, że kultura nr 40 *F. culmorum* (infekcja mieszana z *F. graminearum*) nie została oznaczona za pomocą zestawu primerów opracowanych przez Schilling i in. (1996) (fot. 22a). Natomiast gatunek *F. graminearum* został oznaczony w reakcji PCR z udziałem UBC85F<sub>410</sub>, UBC85R<sub>410</sub> (fot. 22 c). Z tego względu podjęto próbę identyfikacji tej kultury za pomocą pary primerów Fc01F, Fc01R opracowanych przez Nicholson i in. (1998) specyficznej dla *F. culmorum*. Wynik analizy był pozytywny, a produkt reakcji PCR wielkości 570 pz, był zgodny z danymi źródłowymi (fot. 22 b). Pozytywny wynik reakcji uzyskano także w przypadku *F. graminearum* z udziałem pary primerów Fg16NF, Fg16NR (Nicholson i in. 1998). Otrzymano produkt wielkości 280 pz (fot. 22 d).



Fot. 22. Identyfikacja kultury nr 40 za pomocą par starterów: OPT18F<sub>470</sub>, OPT18R<sub>470</sub> (Schilling i in. 1996), Fc01F, Fc01R (Nicholson i in. 1998) – specyficznych dla *F. culmorum* oraz UBC85F<sub>410</sub>, UBC85R<sub>410</sub> (Schilling i in. 1996), Fg16NF, Fg16NR (Nicholson i in. 1998) – specyficznych dla *F. graminearum*.

a – identyfikacja kultury nr 40 za pomocą par starterów OPT18F<sub>470</sub>, OPT18R<sub>470</sub>

b – identyfikacja kultury nr 40 za pomocą par starterów Fc01F, Fc01R

c – identyfikacja kultury nr 40 za pomocą par starterów UBC85F<sub>410</sub>, UBC85R<sub>410</sub>

d – identyfikacja kultury nr 40 za pomocą par starterów Fg16NF, Fg16NR

M – marker M100-1000

40 – testowana kultura nr 40

K – kontrola (brak DNA)

Photo 22. Identification of culture no 40 with pairs of primers: OPT18F<sub>470</sub>, OPT18R<sub>470</sub> (Schilling et al. 1996), Fc01F, Fc01R (Nicholson et al. 1998) specific for *F. culmorum* and UBC85F<sub>410</sub>, UBC85R<sub>410</sub> (Schilling et al. 1996), Fg16NF, Fg16NR (Nicholson et al. 1998) specific for *F. graminearum*.

a – identification of culture no 40 with primers pairs OPT18F<sub>470</sub>, OPT18R<sub>470</sub>

b – identification of culture no 40 with primers pairs Fc01F, Fc01R

c – identification of culture no 40 with primers pairs UBC85F<sub>410</sub>, UBC85R<sub>410</sub>

d – identification of culture no 40 with primers pairs Fg16NF, Fg16NR

M – marker M100-1000

40 – tested culture no 40

K – controls (no DNA)

W badaniach własnych wszystkie kultury *Fusarium* spp. (oprócz *F. oxysporum*, *F. sporotrichioides*, *F. tricinctum*) oznaczono markerem SCARs. W wyniku reakcji PCR z udziałem specyficznych gatunkowo primerów, otrzymano produkty w postaci prążków na żelu agarozowym o wielkości zgodnej z danymi źródłowymi (tab. 2). Nie wykazano żadnych reakcji krzyżowych, co oznacza, że wszystkie zastosowane pary primerów w reakcji PCR hybrydowały specyficznie. Zdaniem Schilling i in. (1996) primery UBC85<sub>410</sub>F, UBC85<sub>410</sub>R hybrydują także z DNA *F. culmorum*, czego efektem jest produkt reakcji PCR wielkości 520 pz. W niniejszej pracy nie

wykazano amplifikacji DNA *F. culmorum* z udziałem powyższych primerów. Para primerów UBC85<sub>410</sub>R, UBC85<sub>410</sub>R okazała się specyficzna tylko względem *F. graminearum*. Być może związane jest to ze zwiększoną zmiennością DNA *F. culmorum* w obszarze przyłączania primerów w porównaniu z izolatami testowanymi przez Schilling i in. (1996).

Uzyskane wyniki badań własnych wskazują, że technika BIO-PCR jest czułą, szybką i wiarygodną metodą identyfikacji grzybów zasiedlających nasiona. Czułość tej metody pozwala na wykrycie patogena przy niskim poziomie infekcji i ilości matrycy rzędu kilku pikogramów (Schilling i in. 1996).

Cały proces analizy zdrowotności nasion trwa kilka dni i jest uzależniony w głównej mierze od tempa wzrostu grzybni. Ważne jest też przeprowadzenie analiz jesienią tuż po zbiorze nasion. W czasie tym grzybnia charakteryzuje się najszybszym tempem wzrostu, a identyfikacja grzybów możliwa jest już po 24 godzinach od momentu wyłożenia nasion na pożywkę PDA. Sam proces analizy (izolacja DNA – PCR – elektroforeza – wizualizacja i ocena stopnia porażenia) nie jest pracochłonny i trwa około 6 godzin.

Dotychczas metoda BIO-PCR znalazła już zastosowanie w diagnostyce chorób bakteryjnych przenoszonych przez nasiona (Schad i in. 1997). Wyniki badań własnych wskazują na jednoznaczną przydatność BIO-PCR w diagnostyce grzybów chorobotwórczych. Ma to szczególnie znaczenie w diagnostyce chorób przenoszonych przez nasiona, stanowiących zagrożenie we wczesnej fazie wzrostu roślin. Opracowanie specyficznych gatunkowo primerów SCARs przemawia za ideą szerszego wykorzystania techniki PCR do identyfikacji patogenów grzybowych, gdyż dokładna diagnostyka jest pierwszym krokiem prowadzącym do kontrolowania chorób roślin.

## LITERATURA

- Booth C., 1971. *The Genus Fusarium*. Comm. Myc. Inst., Kew, Surr., England.
- Edel V., Steinberg C., N. Gautheron N. and Alabouvette C., 2000. Ribosomal DNA-targeted oligonucleotide probe and PCR assay specific for *Fusarium oxysporum*. Mycol. Res. 104 (5) : 518–526.
- Ferreira A.V.B. & Louise G.N., 1996. PCR from fungal spores after microwave treatment. <http://www.fgsc.net/fgn43/ferreir.html>.
- Gibb A.P., Wong S., 1998. Inhibition of PCR by Agar from Bacteriological Transport Media. J. Clinic. Microbiol., 36, 1, 275–276
- Hue F.-X., Huerre M., Rouffault M. A., Bievre C., 1999. Specific Detection of *Fusarium* Species in Blood and Tissues by PCR Technique. J. Clinic. Microbiol. 37, 8, 2434–2438.
- Kwaśna H., Chełkowski J., Zajkowski P., 1991. Grzyby. Tom XXII. Polska Akademia Nauk. Warszawa – Kraków.
- Leslie J. F., Zeller K. A., Summerell B. A., 2001. Icebergs and species in populations of *Fusarium*. Mini-Review. Physiol. Molec. Plant Pathol. 59, 107–117.

- Möller E.M., Chełkowski J., Geiger H.H., 1999. Species – specific PCR assays for the fungal pathogens *Fusarium moniliforme* and *Fusarium subglutinans* and their application to diagnose maize ear rot disease. *Phytopathology* 147, 497–508.
- Nelson P. E., Toussoun T. A., and Marasas W. F. O., 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park.
- Nelson P.E., Dignani M.C., Anaissie E.J., 1994. *Clinic. Microbiol. Rev.* 7, 4, 479–504.
- Nicholson P., Lees A. K., Maurin N., Parry D. W., Rezanoor H. N., 1996. Development of PCR assay to identify and quantify *Microdochium nivale* var. *nivale* and *Microdochium nivale* var. *majus* in wheat. *Physiol. Molec. Plant Pathol.*, 48, 257–271.
- Nicholson P., Simpson D.R., Weston G., Rezanoor H.N., Lees A.K., Parry D.W. and Joyce D., 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 53, 17–37.
- O'Donnell K., 1992. Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Giberella pulicaris*). *Curr. Genet.*, 22: 213–220.
- O'Donnell K., Cigelnik E., 1997. Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 Types within a Monophyletic Lineage of the Fungus *Fusarium* Are Nonorthologous. *Molec. Phylogenet. Evol.*, 7, 1, 103–116.
- Parry D.W., Nicholson P., 1996. Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. *Plant Pathol.* 45, 383–391.
- Paveley N.D., Rennie W.J., Reeves J.C., Wray M.W., Slawson D.D., Clark W.S., Cockerell V., Mitchell A.G., 1997. Cereal Seed Health Strategies in the UK. *Seed Health Testing*, 95–106.
- Schaad N.W., Bonde M.R., Hatziloukas E., 1997. BIO-PCR: A Highly Sensitive Technique for Detecting Seedborne Fungi and Bacteria. *Seed Health Testing*, 159–164.
- Schilling A.G., Möller E.M., Geiger H. H., 1996. Polymerase Chain Reaction – Based Assays for Species – Specific Detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum*. *Phytopathology* 86, 5, 515–523.
- Turner A.S., Lees A.K., Rezanoor H.N., Nicholson P., 1998. Refinement of PCR-detection of *Fusarium avenaceum* and evidence from DNA marker studies for phenetic relatedness to *Fusarium tricinctum*. *Plant Pathol.* 47, 278–288.
- Yoder W.T., Christianson L.M., 1997. Species-Specific Primers Resolve Members of *Fusarium* Section *Fusarium*. Taxonomic Status of the Edible “Quorn” Fungus Reevaluated. *Fungal Genet. Biol.* 23, 68–80.

## Streszczenie

W pracy określono przynależność gatunkową grzybów z rodzaju *Fusarium* wcześniej wyizolowanych z nasion wybranych gatunków roślin uprawnych metodą tradycyjną i BIO-PCR. Zastosowanie metody BIO-PCR było podyktowane faktem, że nie wszystkie kultury zostały wstępnie poprawnie sklasyfikowane. Z przeprowadzonych

analiz identyfikacji metodą tradycyjną i molekularną wykazano stosunkowo wysokie porażenie ziarna pszenicy przez *F. poae*. W badaniach wykazano, że kultura nr 40 (wyizolowana z nasion bobiku i oznaczona metodą tradycyjną jako mieszanka *F. culmorum* i *F. graminearum*) nie dawała wyniku pozytywnego w reakcji PCR z użyciem primerów OPT18F<sub>470</sub>, OPT18R<sub>470</sub> specyficznych dla *F. culmorum*. Natomiast zastosowanie dodatkowej pary primerów Fc01F, Fc01R pozwoliło na wiarygodne oznaczenie *F. culmorum*.