

Immunodiagnoza lamliwości źdźbła pszenicy ozimej uprawianej w różnych systemach produkcji

EWA SOLARSKA, URSZULA SKOMRA

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy
ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy

Institute of Soil Science and Plant Cultivation – State Research Institute,
ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy, Poland

Immunodiagnosis of eyespot disease in winter
wheat cultivated in different production systems

(Otrzymano: 24.05.2005)

Summary

The aim of the study carried out in the years 2001-2003 was to determine the occurrence of *Pseudocercospora herpotrichoides* in winter wheat cultivated in different production systems using traditional visible disease assessment and ELISA technique.

Pathogen was detected by ELISA test in all years of the study and attained highest level in 2003. The greatest quantities of *Pseudocercospora herpotrichoides* were observed in integrated system and monoculture and significantly lower in conventional production system.

Key words: winter wheat, production systems, *Pseudocercospora herpotrichoides*, detection, ELISA

WSTĘP

Lamliwość źdźbła powodowana przez *Pseudocercospora herpotrichoides* występuje powszechnie w uprawach zbóż w strefie klimatu umiarkowanego. Patogen poraża głównie zboża ozime, a zwłaszcza pszenicę i pszenżyto. Straty plonu zależą głównie od intensywności występowania choroby. W przypadku dużego nasilenia, gdy niemal cała podstawa pędu jest zaatakowana przez patogena, straty plonu sięgają 30% (J a c z e w s k a , 1991).

Ochrona zbóż przed łamliwością źdźbła polega na stosowaniu chemicznych zabiegów ochronnych, których skuteczność zależy od poprawnej oceny stopnia zagrożenia chorobą. Zazwyczaj stopień zagrożenia ocenia się na podstawie występowania objawów chorobowych na pochwie liściowej w stadium GS 30–32 (Goulds i in., 1988). Często objawy chorobowe są trudne do odróżnienia od powodowanych przez inne patogeny, takie jak grzyby z rodzaju *Fusarium* czy *Rhizoctonia*, co utrudnia właściwą ocenę zagrożenia ze strony *Pseudocercospora herpotrichoides*.

W ostatnich latach coraz powszechniej stosuje się do diagnozowania łamliwości źdźbła immunoenzymatyczny test ELISA, który pozwala na specyficzną i szybką identyfikację *Pseudocercospora herpotrichoides* oraz na wykrycie tego grzyba przy niskiej jego koncentracji w tkankach roślinnych, a więc również we wczesnych terminach tj. przed wystąpieniem objawów chorobowych na roślinach. Celem badań przeprowadzonych w latach 2001–2003 było określenie występowania *Pseudocercospora herpotrichoides* na pszenicy ozimej uprawianej w różnych systemach produkcji przy użyciu makroskopowej oceny i serologicznego testu ELISA oraz ocena możliwości wykorzystania tego testu do wczesnego wykrywania analizowanego patogena.

MATERIAŁ I METODY

Badania prowadzono w latach 2001–2003 na polach uprawnych pszenicy ozimej odmian Kobra i Roma zlokalizowanych w Stacji Doświadczalnej IUNG w Osinach. Uwzględniono trzy systemy produkcji oraz monokulturę pszenicy. W systemie ekologicznym zastosowano następstwo upraw: ziemniak, jęczmień jary z wsiewką, przez kolejne dwa lata koniczyna czerwona z trawą, pszenica ozima i poplon. W systemie integrowanym: ziemniak, jęczmień jary, bobik, pszenica ozima, a w systemie konwencjonalnym: rzepak, pszenicę ozimą, jęczmień jary. W systemach konwencjonalnym i integrowanym oraz monokulturze stosowano chemiczne zabiegi ochronne oraz nawożenie mineralne.

Z każdego pola reprezentującego oddzielny system uprawy pszenicy pobrano losowo po 30 roślin. Rośliny pszenicy znajdowały się w fazie pełni krzewienia (GS 25 – wg Zadoksa, 1974). Z każdej rośliny usuwano korzenie oraz górną część łodygi, a uzyskane fragmenty tkanki roślinnej o długości ok. 5 cm obejmujące pochwę liściową przecinano wzdłuż i jedną część każdego fragmentu pędu przeznaczano do testu ELISA, przy czym z każdych 10 takich fragmentów przygotowano próbę zbiorczą. Próbkę materiału roślinnego homogenizowano w stosunku 1:20 z buforem PBS pH 7,4 z dodatkiem 2% PVP, 0,05% Tween 20 i 0,2% albuminy z jaja kurzego. Homogenizację przeprowadzano w woreczkach plastikowych przy użyciu praski firmy Bioreba AG zamocowanej na wiertarce elektrycznej. Test wykonywano wg standardowej procedury (Clark i Adams, 1977). Gammaglobuliny uczulone na wymienione grzyby zakupiono w firmie ADGEN. Jako substrat stosowano p-nitrofenylofosfat. Czas inkubacji

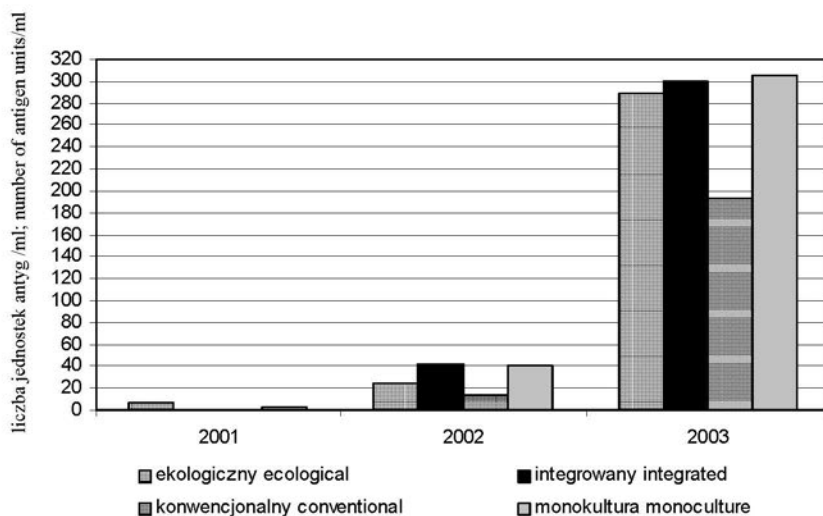
z substratem wynosił pół godziny. Wartości ekstynkcji mierzono spektrofotometrem Hyperion IV przy długości fali 405 nm. Wartości ekstynkcji uzyskane w teście ELISA przeliczono na podstawie sporządzonych krzywych wzorcowych na stężenie jednostek propagacyjnych grzyba – antygeny w 1 ml próbki roślinnej. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie.

Makroskopową ocenę zdrowotności pszenicy przeprowadzono w fazie dojrzałości młeczej ziarna. Występowanie łamliwości źdźbła identyfikowano na podstawie występowania objawów chorobowych i wyrażano za pomocą procentowego udziału roślin z takimi objawami. Materiał do badań stanowiło 50 losowo pobranych roślin z czterech miejsc powierzchni pola każdego obiektu doświadczenia, czyli razem 200 roślin.

Warunki pogody panujące w latach 2000–2003 były zróżnicowane. Jesień i początek zimy sezonu 2000/2001 były najcieplejszym okresem i w grudniu oraz w styczniu najwilgotniejszym w porównaniu z pozostałymi sezonami. Wiosną i latem 2001 suma opadów przekraczała średnią wieloletnią z wyjątkiem maja i czerwca. Tylko początek zimy w sezonie 2001/2002 charakteryzował się spadkiem temperatury poniżej -5°C , a później temperatura systematycznie podnosiła się, tak więc począwszy od stycznia w każdym miesiącu 2002 roku zanotowano najwyższą temperaturę spośród trzech analizowanych lat. Opady w 2002 roku nie odbiegały od normy z wyjątkiem kwietnia i maja, kiedy ich suma w tych miesiącach wynosiła znacznie poniżej normy. Sezon 2002/2003 wyróżniał się suchą i mroźną zimą oraz suchą wiosną i latem z wyjątkiem maja.

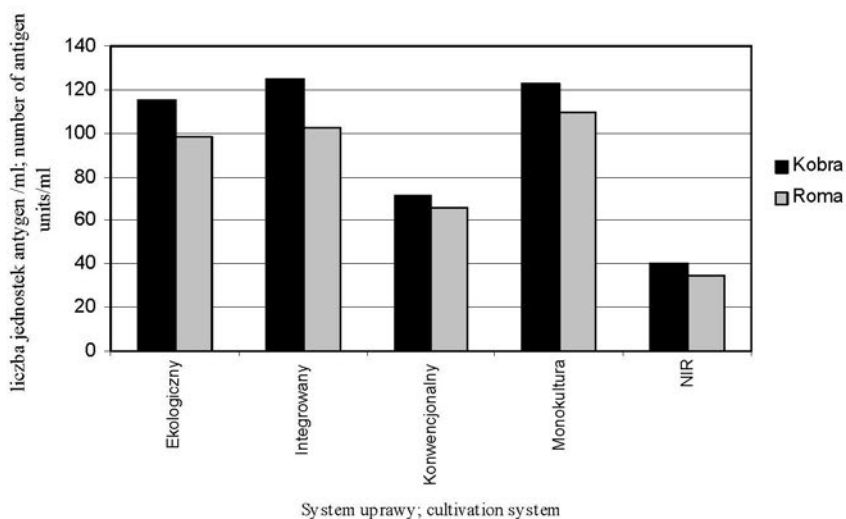
WYNIKI

Przy użyciu testu ELISA do identyfikacji *Pseudocercospora herpotrichoides* stwierdzono, że grzyb występował w każdym roku badań, przy czym w najmniejszym nasileniu w 2001 roku i największym w 2003 roku (ryc. 1). Najliczniejsze występowanie grzyba zaobserwowano w systemie integrowanym i monokulturze i w każdym z badanych obiektów na roślinach odmiany Kobra (ryc. 2). W okresie badań istotnie niższe występowanie *Pseudocercospora herpotrichoides* zanotowano w systemie konwencjonalnym w porównaniu z pozostałymi systemami (ryc. 1 i 2).



Ryc. 1. Występowanie grzyba *Pseudocercospora herpotrichoides* w roślinach pszenicy ozimej uprawianych w różnych systemach produkcji

Fig. 1. Incidence of *Pseudocercospora herpotrichoides* in winter wheat cultivated in different production systems



Rys. 2. Występowanie *Pseudocercospora herpotrichoides* na pszenicy ozimej odmian Kobra i Roma

Fig. 2. Incidence of *Pseudocercospora herpotrichoides* in Kobra and Roma cultivars of winter wheat

Ocena makroskopowa porażenia podstawy źdźbła pszenicy w roku 2001 wykazała, że w systemie ekologicznym oraz monokulturze było istotnie więcej pędów z objawami łamliwości źdźbła niż w pozostałych ocenianych systemach, a udział pędów porażonych wynosił w tych obiektach odpowiednio 47% i 41%. Natomiast w latach 2002–2003 najczęściej takich pędów tj. odpowiednio ok. 58% i 20% stwierdzono w systemie integrowanym. Odmiana Kobra okazała się bardziej podatna na łamliwość podstawy źdźbła niż odmiana Roma, co potwierdza zarówno test ELISA, jak i ocena makroskopowa (ryc. 2, tab. 1).

Tabela 1

Procentowy udział roślin pszenicy ozimej z objawami chorobowymi powodowanymi przez *Pseudocercospora herpotrichoides*

Table 1

Incidence of winter wheat plants with symptoms caused by *Pseudocercospora herpotrichoides* (in %)

Rok badań Year of studies	System uprawy Cultivation system							
	Konwencjonalny conventional		Integrowany integrated		Ekologiczny ecological		Monokultura monoculture	
	Kobra	Roma	Kobra	Roma	Kobra	Roma	Kobra	Roma
2001	55,3	39,5	24,3	39,2	23,1	20,8	55,3	26,0
2002	27,5	13,7	53,8	61,7	40,7	13,5	4,9	33,6
2003	3,2	2,8	23,2	16,2	6,7	4,3	6,4	9,7

DYSKUSJA

Zastosowanie enzymoimmunologicznej metody ELISA pozwoliło na wykrywanie *Pseudocercospora herpotrichoides* w roślinach pszenicy ozimej jeszcze przed pojawieniem się objawów choroby, tj. w okresie krzewienia się tej rośliny. Wczesna diagnoza zagrożenia chorobowego nie zawsze zgadzała się z występowaniem objawów chorobowych w postaci plam oczkowych w późniejszym okresie wzrostu roślin. Szczególnie wyraźne różnice te zarysowały się w 2001 roku, gdy wyniki testu ELISA wskazywały na słabe występowanie patogena, natomiast wyniki oceny makroskopowej przeprowadzonej pod koniec okresu wegetacji pszenicy, świadczyły o dużym nasileniu występowania choroby. Odwrotna sytuacja miała miejsce w 2003 roku, gdy wiosną test ELISA wykazał dużą koncentrację patogena w tkankach roślinnych, a przed zbiorem obserwowano słabe występowanie patogena. O podobnych rozbieżnościach pomiędzy oceną makroskopową i wczesną diagnozą przy użyciu metod molekularnych donosi Turner i in. (2001). Trudności te mogą wynikać ze znacznego wpływu warunków pogody w ciągu sezonu wegetacyjnego na rozwój choroby (Perrin, 1977; Jaczewska, 1991). Warunki pogody w okresie badań uzasadniają różnice w występowaniu

choroby pod koniec okresu wegetacji pszenicy w latach 2001 i 2003, kiedy dostateczna suma opadów w 2001 roku w czerwcu i nadmierna w lipcu sprzyjały rozwojowi choroby, natomiast w tych samych miesiącach 2003 roku niedobór opadów ograniczał jej występowanie. Przyczyną niezgodności oceny zagrożenia ze strony *Pseudocercospora herpotrichoides* przy użyciu metod enzymoimmunologicznej i konwencjonalnej mogą być również trudności z prawidłowym rozpoznaniem objawów chorobowych podczas oceny makroskopowej, w przypadku kompleksowego porażenia podstawy pędu przez kilka różnych patogenów.

Na występowanie choroby miała również wpływ odmiana. Obydwie metody diagnostyczne wykazały wyższe porażenie odmiany Kobra przez omawianego patogena, a szczególnie stan taki dotyczył roślin w systemach konwencjonalnym i ekologicznym, gdzie w każdym roku notowano wyższe występowanie objawów łamliwości źdźbła na roślinach odmiany Kobra w porównaniu z odmianą Roma. Obydwie odmiany charakteryzują się różną reakcją na porażenie przez grzyby chorobotwórcze (S o l a r s k a i in., 2003).

LITERATURA

- Clark M.F., Adams A.N., 1977. Characteristic of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Vir.* 34: 475–483.
- Goulds A., Fitt B.D.L., Polley R.W., 1988. Eyespot (*Pseudocercospora herpotrichoides*) epidemiology in relation to prediction of disease severity and yield loss in winter wheat – a review. *Plant Pathol.* 37: 311–328.
- Jaczevska A., 1991. Yield loss of winter wheat as influenced by the intensity of *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron.) attack. *Phytopathol. Pol.* 1 (XIII): 41–44.
- Perrin P.W., 1977. Spore trapping under hot and humid conditions. *Mycologia* 63 (6): 1214–1218.
- Solarska E., Mróz A., Kuś J., 2003. Występowanie chorób powodowanych przez grzyby na pszenicy ozimej uprawianej w różnych systemach produkcji. *Prog. Plant Prot. Postępy Ochr. Rośl.* vol. 43/1: 381–388.
- Turner A.S., Nicholson P., Edwards S.G., Bateman G.L., Morgan L.W., Todd A.D., Parry D.W., Marshall J., Nuttall M., 2001. Evaluation of diagnostic and quantitative PCR for the identification and severity assessment of eyespot and sharp eyespot in winter wheat. *Plant Pathol.* 50: 463–469.
- Zadoks J.C., Chang T.T., Konzak C.E., 1974. A decline code for the growth stages of cereals. *Weed Res.* 14: 415–421.

Streszczenie

Celem badań prowadzonych w latach 2001–2003 było określenie występowania *Pseudocercospora herpotrichoides* na pszenicy ozimej uprawianej w różnych

systemach produkcji przy użyciu makroskopowej oceny mikologicznej i enzymoimmunologicznego testu ELISA.

Przy użyciu testu ELISA stwierdzono, że grzyb występował we wszystkich latach badań. Największe nasilenie patogena obserwowano w 2003 roku. Najliczniejsze występowanie grzyba zaobserwowano w systemie integrowanym i monokulturze, istotnie niższe występowanie *Pseudocercospora herpotrichoides* zanotowano w systemie konwencjonalnym. Odmiana Kobra okazała się bardziej podatna na łamliwość podstawy źdźbła niż odmiana Roma, co potwierdza zarówno test ELISA, jak i ocena makroskopowa.