

RADOŚLAW ROSZAK, MARLENA BARANOWSKA, MARTA BEŁKA, JOLANTA BEHNKE-BOROWCZYK

Zastosowanie technik biologii molekularnej do detekcji *Erysiphe alphitoides* (Griffon & Maubl.) U. Braun & S. Takam. w organach roślinnych

Applying the molecular biology techniques to the detection of *Erysiphe alphitoides* (Griffon & Maubl.) U. Braun & S. Takam. in plant parts

ABSTRACT

Roszak R., Baranowska M., Bełka M., Behnke-Borowczyk J. 2019. Zastosowanie technik biologii molekularnej do detekcji *Erysiphe alphitoides* (Griffon & Maubl.) U. Braun & S. Takam. w organach roślinnych. Sylwan 163 (9): 740-745. DOI: <https://doi.org/10.26202/sylwan.2019076>.

Erysiphe alphitoides causes the most common disease of assimilation apparatus of oaks of different age. It is believed that the pathogen overwinters in buds of the host plant or in the cracks of the bark. The aim of the study was to search for the presence of *E. alphitoides* in buds, leaves, and wood of sessile oak shoots using molecular techniques. Two hypotheses have been tested: (i) oaks are infected by *E. alphitoides*, and (ii) the pathogen overwinters in the host plant buds. The samples used in the study were collected from sessile oak trees (Miradz Forest District; 52°41'23.197"N, 18°25'33.942"E) in 2017, and consisted of dormant buds (collected in May), young leaves (collected in June), leaves with visible symptoms of the disease (collected in August), shoot with sip and surface layers of wood (collected in December). Additional part of buds was collected in May 2018. The PCR reaction was carried out with primers specific for *E. alphitoides* and *E. hypophylla*. For species identification Sanger method was used. The resulting sequences were compared using BLAST algorithm with reference sequences deposited in the NCBI database. Sequences from isolates obtained from leaves showed 97-99% similarity to the reference sequence of *E. alphitoides*. Pathogen did not occur in the superficial layers of shoots and buds. As some studies show, at very low temperatures (below -20°C), the mycelium of the pathogen dies, therefore further study should be undertaken on wintering of the pathogen causing the powdery mildew disease on oaks. It also should be examined whether the pathogen overwinters in the form of bagnial spores produced in chasmothecia overwintering on leaves, in the leaf buds, or in bark cracks, and whether the wintering site of the pathogen is related to the age of trees and or to the stands where the trees grow.

KEY WORDS

oak powdery mildew, sessile oak, overwintering, fungal diseases, ITS

ADDRESSES

Radosław Roszak ⁽¹⁾, Marlena Baranowska ⁽²⁾, Marta Bełka ⁽¹⁾
Jolanta Behnke-Borowczyk ⁽¹⁾ – e-mail: jbehnke@up.poznan.pl

⁽¹⁾ Katedra Fitopatologii Leśnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu; ul. Wojska Polskiego 71C, 60-625 Poznań

⁽²⁾ Katedra Hodowli Lasu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu; ul. Wojska Polskiego 71A, 60-625 Poznań

Wstęp

Erysiphe alphitoides (Griffon & Maubl.) U. Braun & S. Takam. jest sprawcą mączniaka prawdziwego dębu (zwanego także mąkulką dębową czy drobnokulkowcem), najczęstszej choroby grzybowej aparatu asymilacyjnego i niezdrewniałych pędów drzew rodzaju *Quercus*. W Europie choroba obserwowana jest na dębach we wszystkich klasach wieku [Mańka 2005; Mougou i in. 2008; Szewczyk i in. 2015]. Patogen poraża przede wszystkim *Q. robur* L., *Q. petraea* (Matt.) Liebel., *Q. conferta* (Kit.) Vuk., *Q. pubescens* Willd., *Q. cerris* L. oraz *Q. pyrenaica* Willd. [Desprez-Loustau i in. 2011]. Drobnokulkowiec może porażać również takie gatunki drzew jak *Fagus sylvatica* L., *Castanea sativa* Mill. czy *Eucalyptus gunnii* Hook. f. [Przybył 2006; Cho i in. 2017]. Sprawca mączniaka prawdziwego dębu *Erysiphe alphitoides* to gatunek zawleczony z Ameryki Północnej, który w zachodniej Europie pojawił się w pierwszej dekadzie XX wieku, następnie szybko rozprzestrzenił się po kontynencie [Braun 1995; Baranowska-Wasilewska i in. 2015]. Za warunki optymalne dla rozwoju patogenu uważa się ciepłą i wilgotną pogodę [Mychayliv i in. 2011]. Cienki nabłonek młodych liści rodzimych dębów sprzyja rozwojowi grzyba. Susza, żery owadzie czy bezpośrednia insolacja zwiększają predyspozycję chorobową rośliny-gospodarza [Mańka 2005]. Liście porażone przez mączniaka prawdziwego dębu wykazują zmniejszone wartości fotosyntezy netto oraz zmiany w gospodarce asymilatami, które mogą wpłynąć na wzrost drzew i ich przeżywalność. Ma to istotne znaczenie zwłaszcza dla siewek i sadzonek dębów [Marçais, Desprez-Loustau 2014]. Liście, na których mączysty nalot obejmował ponad 50% powierzchni, wykazywały zmniejszoną żywotność w porównaniu z liśćmi zdrowymi [Hajji i in. 2009]. Porażenie pędów przez drobnokulkowca sprzyja wtórnym infekcjom grzybów zgorzelowych (np. *Fusarium oxysporum* f. sp. *quercu* W.L. Gordon, *Phomopsis* spp.) oraz zwiększa podatność dębów na infekcje ze strony opieńki [Mańka 2005; Sierota, Szczepkowski 2014]. Uważa się, że patogen ten zimuje w postaci grzybni w pąkach rośliny-gospodarza, gdyż oznaki chorobowe można obserwować już na świeżo rozwiniętych liściach [Sierota, Szczepkowski 2014]. Natomiast Marçais i in. [2009] podają, że miejscem przeczekiwania okresu bezlistnego przez grzyb są pęknięcia kory dębów.

Celem pracy była detekcja sprawców mączniaka prawdziwego dębu w pąkach, liściach i drewnie pędów dębu bezszypułkowego z wykorzystaniem metod molekularnych. Postawiono następujące hipotezy: (i) grzybnia mączniaka prawdziwego dębu zimuje w pąkach rośliny-gospodarza oraz (ii) dęby są infekowane przez *Erysiphe alphitoides*.

Materiał i metody

Do badań wybrano 36 20-letnich dębów bezszypułkowych pochodzących z pododdziału 299g (52°41'23.197"N, 18°25'33.942"E) leśnictwa Roźniaty w Nadleśnictwie Miradz. Materiałem badawczym były (i) uśpione pąki (z 36 drzew, zebrane w maju 2017), (ii) młode liście (z 32 drzew, zebrane w pierwszym tygodniu czerwca 2017) oraz (iii) liście z widocznymi objawami mączniaka prawdziwego dębu (z 30 drzew, zebrane w trzecim tygodniu sierpnia 2017). Dodatkowo z wytypowanych drzew losowo wybrano 11, z których w grudniu 2017 roku pozyskano skórkę pędów wraz z łykiem i powierzchniowymi warstwami drewna (iv). W następnym roku w maju ponownie pozyskano pąki z 32 drzew (v). Odmienna liczba pozyskanych prób wynika z wydzielania się poszczególnych drzew w trakcie trwania doświadczenia.

Pobrany materiał sterylizowano powierzchniowo etanolem o stężeniu 70% (20 s), a następnie trzykrotnie płukano wodą destylowaną (5 min). Po osuszeniu materiał badawczy rozcierano w moździerzach ceramicznych schłodzonych do temperatury -70°C . Z tak przygotowanego materiału izolowano DNA. Ekstrakcję przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu Bead-Beat

Micro AX Gravity (A&A Biotechnology Gdynia, Poland). Reakcja PCR przeprowadzona została z użyciem starterów specyficznych dla *E. alphitoides* i *E. hypophylla* ITS-ery F (5'CTC AGT CGT GGC ATC TGCT 3') oraz ITS-ery R (5'ATG TGA CTG GAG CAA GTGG 3') [Mougou-Hamdane i in. 2010]. Mieszanina reakcyjna zawierała 12,5 µl PCR MIX (A&A Biotechnology), 10,6 µl wody dejonizowanej, po 0,2 µl każdego startera oraz 2 µl DNA pozyskanego z prób. Namnażanie DNA przeprowadzono w termocyklerze Biometra UNO II. Amplifikacja miała następujący przebieg: denaturacja wstępna 95°C przez 5 min, denaturacja w 34 cyklach (94°C, 1 min), annealing (46°C, 1 min), elongacja (72°C, 2 min) oraz elongacja końcowa (72°C, 10 min). Otrzymany produkt nanoszono na 1-procentowy żel agarozowy barwiony Midori Green Advance DNA (Genetics) i podawano elektroforezie DNA (20 min przy 120 V). Markerem wielkości produktu PCR był DNA marker DraMix (A&A Biotechnology). Pozytywny produkt reakcji PCR sekwencjonowano metodą Sangera w Genomed S.A. w Warszawie. Otrzymaną sekwencję porównano z wykorzystaniem algorytmu BLAST z sekwencjami referencyjnymi zdeponowanymi w bazie danych NCBI.

Wyniki i dyskusja

Pozytywny produkt PCR otrzymano w przypadku młodych liści (6 drzew) oraz liści zebranych w sierpniu (25 drzew). Otrzymane sekwencje były w 97-99% podobne do sekwencji referencyjnych *E. alphitoides* zdeponowanych w bazie danych NCBI pod numerami LC270838, KY660932 i KU197250 (tab.). Badane liście dębu nie były porażone przez *E. hypophylla*. W powierzchniowych warstwach pędów, tj. w skórcie, łyku i drewnie, nie stwierdzono obecności patogenu. Wyniki detekcji mączniaka prawdziwego dębu z prób pochodzących z pąków pobranych w maju 2017 i 2018 roku nie potwierdziły obecności grzybowego DNA, w tym *E. alphitoides*.

Mąkulka dębowa jest częstym i groźnym patogenem dębów, zwłaszcza młodszych klas wieku [Mańka 2005; Hajji i in. 2009]. Postępująca w Polsce przebudowa drzewostanów jednogatunkowych, głównie sosnowych, na mieszane rodzi potrzebę dokładniejszego zbadania patogenów porażających drzewa liściaste. Z roku na rok zwiększa się udział drzewostanów z dębem w powierzchni leśnej kraju, a co za tym idzie zwiększa się areal potencjalnego występowania mączniaka prawdziwego dębu [Krótkoterminowa... 2017]. Stąd istotne jest podejmowanie tematów badawczych związanych nie tylko z negatywnym oddziaływaniem patogenu na roślinę-gospodarza, ale przede wszystkim z dokładnym poznaniem biologii i ekologii sprawcy – w celu skuteczniejszej ochrony dębów przed mączniakiem prawdziwym. Od ponad 112 lat bytowania *E. alphitoides* w Europie nie wskazano w 100% pewnego miejsca zimowania tego patogenu porażającego dęby w Polsce.

Tabela.

Stopień podobieństwa badanych sekwencji z sekwencją referencyjną w bazie danych NCBI
The degree of similarity of the tested sequences compared with the sequences deposited in the NCBI database

Część rośliny Part of the plant	Czas zbioru Date of harvest	Stopień podobieństwa Degree of similarity	Numer sekwencji referencyjnej Accession number
Liście młodociane Juvenile leaves	początek maja 2017 beginning of May 2017	97-98%	LC270838
Liście dojrzałe Mature leaves	koniec sierpnia 2017 end of August 2017	99%	KY660932
Liście dojrzałe Mature leaves	koniec sierpnia 2017 end of August 2017	97%	KU197250

W przeprowadzonych badaniach identyfikowano z wykorzystaniem metody molekularnej mączniaka prawdziwego dębu bytującego w różnych tkankach rośliny-gospodarza. W zachodniej Europie liczne badania poświęcone są patogenom wywołującym mączniaka prawdziwego dębu. Sprawcą choroby we Francji są *E. alphitoides* i *E. quercicola*, które wykorzystują odmienne nisze czasowe na dębach [Hamelin i in. 2016]. *E. quercicola* jest obserwowany głównie wiosną, natomiast *E. alphitoides* dominuje pod koniec sezonu wegetacyjnego [Feau i in. 2012]. W Polsce, jak podaje Sucharzewska [2009], występują *E. alphitoides* oraz *E. hypophylla* (pospolitszy w zachodniej części kraju). Nad zróżnicowaniem międzygatunkowym rodzaju *Erysiphe* i wewnątrzgatunkowym *E. alphitoides* pochodzącym z obszaru zachodniej Polski pracowały Behnke-Borowczyk i Baranowska-Wasilewska [2017]. W badaniach autorek wykazano podobieństwo otrzymanych sekwencji na poziomie 98-100%, z sekwencją referencyjną *E. alphitoides* KP686269 z bazy danych NCBI, co potwierdziło małe zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe i dużą jednorodność genetyczną u większości izolatów *E. alphitoides*. Otrzymane w prezentowanych badaniach wyniki wskazują, że jedynym grzybem powodującym objawy mączniaka prawdziwego na badanych drzewach był *E. alphitoides*. Otrzymane sekwencje były podobne do sekwencji referencyjnych na poziomie 97-99%. Potwierdza to wyniki wspomnianych wcześniej badań [Behnke-Borowczyk, Baranowska-Wasilewska 2017].

W niniejszych badaniach nie wykazano obecności grzybni patogenu w pędach, co nie potwierdza doniesień Phillipsa i Burdekina [1982], Mańki [2005], Marçais i in. [2017] oraz Marçais i Desprez-Loustau [2014], przy czym ostatni autorzy wiążą występowanie powyższego patogenu z klimatem o cechach kontynentalnych, co może też tłumaczyć brak jego obecności w próbach pochodzących z pędów. Cytowani autorzy wskazali w swoich badaniach, że pędy, zwłaszcza odroślowe, częściej zasiedlane są przez *E. quercicola* niż *E. alphitoides*. Wyniki niniejszych badań nie potwierdzają także doniesień o zimowaniu patogenu w pączkach dębu [Wainhouse i in. 2016]. Na zimowanie mączniaka prawdziwego dębu w pąkach roślin wskazują przede wszystkim najstarsze doniesienia naukowe [Woodward i in. 1929; Foex 1941; Yarwood 1957; Kerling 1966], co tłumaczono synchronizacją porażenia z rozwojem młodych liści, tzn. natychmiastowym występowaniem infekcji już na nowo rozwijających się liściach. Zimowania grzybni *E. alphitoides* i *E. quercicola* w pąkach dębu szypułkowego i bezszypułkowego we Francji nie wykluczyli także Marçais i in. [2017], którzy wykazali, że łagodne zimy mogą sprzyjać zimowaniu grzybni mączniaka prawdziwego w pąkach dębów. Ponadto wskazuje się na zimowanie mączniaków w pąkach innych gatunków roślin niż dąb [Liyanage, Royle 1976; Spotts, Chen 1984]. Covey [1969] wykazał, że przy bardzo niskiej temperaturze panującej zimą (poniżej -20°C) grzybnia patogenu obumiera. Stąd istotne jest prowadzenie dalszych badań dotyczących powyższego zagadnienia, ściśle skorelowanych z panującymi warunkami atmosferycznymi. Według danych Instytutu Meteorologii i Gospodarki Wodnej [Biuletyn... 2017] w okresie od grudnia 2016 roku do lutego 2017 roku średnia temperatura obszarowa dla regionu, na którym zlokalizowany był badany drzewostan dębowy, wynosiła $-0,5^{\circ}\text{C}$. Takie warunki termiczne można uznać za sprzyjające zimowaniu *E. alphitoides*.

Badania dotyczące zimowania mączniaka prawdziwego dębu w pączkach *Q. petraea* prowadził Tavanaei [2007]. Badacz ten, podobnie jak autorzy niniejszych analiz, nie potwierdził zimowania grzybni w pączkach dębu, jednak wysnuł wniosek, że patogen ten może zimować w postaci askokarp. Natomiast Marçais i in. [2009] wykazali, że *Erysiphe alphitoides* może zimować także w spękaniach kory. Stąd należałoby podjąć dalsze badania dotyczące zimowania mączniaka prawdziwego dębu i wskazać, czy patogen zimuje w postaci zarodników workowych produk-

wanych w chasmotecjach zimujących na opadłych liściach, w pąkach liściowych lub w spękaniach kory oraz czy miejsce zimowania patogenu ma związek z wiekiem badanych drzew i drzewostanów.

Literatura

- Baranowska-Wasilewska M., Behnke-Borowczyk J., Szewczyk W., Wajchman S. 2015. Mączniak prawdziwy dębu. Przegląd Leśniczy 3: 27.
- Behnke-Borowczyk J., Baranowska-Wasilewska M. 2017. Populacja mączniaka prawdziwego dębu w zachodniej Polsce. Acta Scientiarum Polonorum Silvarum Colendarum Ratio et Industria Lignaria 16 (4): 227-232. DOI: <https://doi.org/10.17306/J.AFW.2017.4.23>.
- Biuletyn monitoringu klimatu Polski, zima 2016/2017 (grudzień 2016 - luty 2017). 2017. Instytut Meteorologii i Gospodarki Wodnej – PIB.
- Braun U. 1995. The powdery mildews (*Erysiphales*) of Europe. Gustav Fischer, Jena.
- Cho S. E., Lee S. H., Lee S. K., Seo S. T., Shin H. D. 2017. *Erysiphe alphitoides* causes powdery mildew on *Eucalyptus gunnii*. Forest Pathology 48: e12377. DOI: <https://doi.org/10.1111/efp.12377>.
- Covey R. P. 1969. Effect of extreme cold on the overwintering of *Podospaera leucotricha*. Plant Disease Report 53: 710.
- Desprez-Loustau M.-L., Feau N., Mougou-Hamdane A., Dutech C. 2011. Interspecific and intraspecific diversity in oak powdery mildews in Europe: coevolution history and adaptation to their hosts. Mycoscience 52: 163-175. DOI: <https://doi.org/10.1007/S10267-010-0100-5>.
- Feau N. A., Lauron-Moreau D., Piou B., Marçais C., Dutech C., Desprez-Loustau M.-L. 2012. Niche partitioning of the genetic lineages of the oak powdery mildew complex. Fungal Ecology 5: 154-162. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2011.12.003>.
- Foex M. E. 1941. Invasion of European oaks by the powdery mildew (in French). Rev. Eaux Forêts 79: 338-349.
- Hajji M., Dreyer M., Marçais B. 2009. Impact of *Erysiphe alphitoides* on transpiration and photosynthesis in *Quercus robur* leaves. European Journal of Plant Pathology 125: 63-72. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9458-7>.
- Hamelin F., Bisson A., Desprez-Loustau M.-L., Fabre F., Mailleret L. 2016. Temporal niche differentiation of parasites sharing the same plant host: oak powdery mildew as a case study. Ecosphere, Ecological Society of America 7 (11): e01517. DOI: <https://doi.org/10.1002/ecs2.1517>.
- Kerling L. 1966. The hibernation of the oak mildew. Acta Bot Neerl 15: 76-83.
- Krótkoterminowa prognoza występowania ważniejszych szkodników i chorób infekcyjnych drzew leśnych w Polsce w 2017 roku. 2017. Instytut Badawczy Leśnictwa.
- Liyanage A. de S., Royle D. J. 1976. Overwintering of *Sphaerotheca humuli*, the cause of hop powdery mildew. Annals of Applied Biology 83: 381-394.
- Mańka K. 2005. Fitopatologia leśna. PWRiL, Warszawa.
- Marçais B., Desprez-Loustau M.-L. 2014. European oak powdery mildew: impact on trees, effects of environmental factors, and potential effects of climate change. Annals of Forest Science 71 (6): 633-642. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13595-012-0252-x>.
- Marçais B., Kavkova M., Desprez-Loustau M.-L. 2009. Phenotypic variation in the phenology of ascospore production between European populations of oak powdery mildew. Annals of Forest Science 66: 814-822. DOI: <https://doi.org/10.1051/forest/2009077>.
- Marçais B., Piou D., Dezette D., Desprez-Loustau M.-L. 2017. Can Oak Powdery Mildew Severity be Explained by Indirect Effects of Climate on the Composition of the *Erysiphe* Pathogenic. Ecology and Epidemiology Phytopathology 107 (5): 570-579. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-16-0268-R>.
- Mougou A., Dutech C., Desprez-Loustau M.-L. 2008. New insights into the identity and origin of the causal agent of oak powdery mildew in Europe. Forest Pathology 38: 275-287. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2008.00544.x>.
- Mougou-Hamdane A., Giresse X., Dutech C., Desprez-Loustau M.-L. 2010. Spatial distribution of lineages of oak powdery mildew fungi in France, using quick molecular detection methods. Annals of Forest Science 67: 21. DOI: <https://doi.org/10.1051/forest/2009105>.
- Mychayliv O., Sierota Z., Lech P. 2011. Wpływ warunków pogodowych na występowanie w młodnikach chorób aparatu asymilacyjnego. Komisja Technicznej Infrastruktury Wsi 6: 81-90.
- Phillips D. H., Burdekin D. 1982. Diseases of Forest and Ornamental Trees. Diseases of oak (*Quercus* spp.). Palgrave Macmillan, London.
- Przybył K. 2006. Lasy dębowe w Polsce. Dęby. Nasze drzewa leśne. Monografie popularnonaukowe 11: 752-756.
- Sierota Z., Szczepkowski A. 2014. Rozpoznawanie chorób infekcyjnych drzew leśnych. CILP, Warszawa.
- Spotts R. A., Chen P. M. 1984. Cold hardiness and temperature responses of healthy and mildew-infected terminal buds of apple during dormancy. Phytopathology 74: 542-544.

- Sucharzewska E. 2009. The development of *Erysiphe alphitoides* and *E. hypophylla* in the urban environment. *Acta Mycologica* 44 (1): 09-123.
- Szewczyk W., Kuźmiński R., Mańka M., Kwaśna H., Łakomy P., Baranowska-Wasilewska M., Behnke-Borowczyk J. 2015. Występowanie *Erysiphe alphitoides* w drzewostanach dębowych dotkniętych kłeską powodzi. *Leś. Pr. Bad.* 76 (1): 73-77. DOI: <https://doi.org/10.1515/frp-2015-0008>.
- Tavanaei G. H. 2007. Study on biology of *Microspheera alphitoides* caused powdery mildew on oak (*Quercus petraea*) in Arasbaran forests AGRIS.
- Wainhouse D., Daegan I. G., Denman S., Green S., Webber J. 2016. Agriculture and Forestry Climate Change Impacts Summary Report, Living with Environmental Change. DOI: <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.17378.73929>.
- Woodward R. C., Waldie J. S. L., Steven H. M. 1929. Oak mildew and its control in forest nurseries. *Forestry* 3: 38-56.
- Yarwood C. E. 1957. Powdery mildews. *Botanical Review* 23: 235-300.