

Przechowalnictwo i przetwórstwo

WYKRYWANIE INFEKCJI GRZYBOWEJ POPRAZECZ ANALIZĘ ZWIĄZKÓW CHEMICZNYCH UWALNIANYCH PRZEZ MATERIAŁ ROŚLINNY

DETECTION OF THE FUNGAL INFECTIONS BY THE ANALYSIS OF VOLATILES RELEASED BY CROPS

dr inż. Małgorzata Łabańska ORCID: 0000-0002-1659-8129
IHAR-PIB Oddział w Boninie, e-mail: m.labanska@ihar.edu.pl

Streszczenie

Celem stażu naukowego na Uniwersytecie Warwick (Wielka Brytania) była detekcja chorób roślin w czasie ich przechowywania na podstawie analizy lotnych związków organicznych i nieorganicznych za pomocą elektronicznego nosa, GC-IMS oraz konwencjonalnej metody GC-MS. W czasie stażu został zrealizowany 6-miesięczny projekt badawczy we współpracy z prof. Jamesem Covingtonem oraz prof. Johnem Clarksonem. Przeprowadzono szereg doświadczeń, w których udowodniono możliwość zastosowania elektronicznego nosa oraz metody GC-IMS do wykrywania infekcji cebuli zwyczajnej wywołanych dwoma patogenami grzybowymi (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* oraz *Sclerotium cepivorum*), a także do monitorowania przebiegu infekcji u różnych roślin należących do tej samej rodziny (czosnek, cebula zwyczajna, szalotka, cebula czerwona). Wykorzystując metodę GC-MS, udało się zidentyfikować z dużym prawdopodobieństwem lotne związki, które uwalniane są naturalnie przez rośliny, a także te związane z infekcjami grzybowymi.

Słowa kluczowe: biała zgnilizna, cebula, elektroniczny nos, fuzaryjna zgnilizna cebuli, infekcje grzybowe

Abstract

The aim of the fellowship completed at Warwick University (United Kingdom) was to detect the storage diseases of plants based on the analysis of volatile organic and inorganic compounds using an electronic nose, GC-IMS, and the conventional method GC-MS. During the fellowship, a 6-month research project was carried out in collaboration with Prof. James Covington and Prof. John Clarkson. The results of experiments have proved the ability of an electronic nose and GC-IMS to detect fungal infections of onion bulbs caused by two fungal pathogens (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* and *Sclerotium cepivorum*), as well as to track diseases progression in different plants from the same family (garlic, brown onion, shallots, red onion). Furthermore, the GC-MS analysis facilitated the identification of volatile compounds that the plants release due to their biological activity and those related to fungal infections.

Keywords: electronic nose, fungal infections, fusarium basal rot, onion, white rot disease

Organizacja Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa (FAO, ang. Food and Agriculture Organization) szacuje, że 20 do 40% światowej produkcji roślinnej jest corocznie tracone z powodu szkodników i patogenów, które dotyczą również główne uprawy żywności: ryż, pszenicę, kukurydzę, ziemniaki, soję i bawełnę (Oerke 2006, Savary i in. 2012). Z tego powodu od wielu lat poszukiwane są

narzędzia badawcze, które umożliwią szybką, rzetelną oraz nieinwazyjną detekcję patogenów roślinnych zarówno w czasie uprawy, jak i przechowywania.

Spośród wielu rozwijanych trendów rosnącą popularnością cieszą się techniki analityczne bazujące na analizie lotnych związków organicznych (LZO) i nieorganicznych. Wykorzystują one zdolność roślin do uwalniania związków chemicznych – w zależno-

ści od ich stanu zdrowotnego – w odpowiedzi na atak szkodników, patogenów, czynniki zewnętrzne takie jak temperatura i wilgotność oraz w celu ostrzeżenia sąsiadujących roślin o zagrożeniu (Buja i in. 2021). Metody te stanowią alternatywę wobec rutynowych technik analitycznych, takich jak testy ELISA czy PCR, umożliwiając analizę w warunkach polowych często w sposób zdalny, nieinwazyjny, bez konieczności przygotowania prób oraz stosowania odczynników chemicznych. Tradycyjnie lotne związki chemiczne są wykrywane za pomocą chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (GC-MS, ang. Gas Chromatography – Mass Spectrometry), która jest techniką złożoną, czasochłonną i wymagającą przeszkolonego personelu.

Komplementarnym narzędziem jest tzw. elektroniczny nos (Sankaran i in. 2010). Urządzenie to umożliwia analizę złożonych próbek gazowych dzięki szeregowi czujników gazowych, które naśladują działanie receptorów węchowych. Metody analizy danych wielowymiarowych przetwarzają zebrane sygnały czujników, pełniąc funkcje mózgu i dając rozpoznanie/klasyfikację mieszanin gazów.

Ośrodek naukowy

Celem stażu naukowego na Uniwersytecie Warwick (Wielka Brytania) była detekcja chorób roślin w czasie ich przechowywania na podstawie analizy lotnych związków organicznych i nieorganicznych za pomocą elektronicznego nosa oraz konwencjonalnej metody GC-MS. W czasie stażu naukowego zrealizowano 6-miesięczny projekt badawczy we współpracy z prof. Jamesem Covingtonem oraz prof. Johnem Clarksonem. Projekt w całości był finansowany przez Narodową Agencję Wymiany Akademickiej (NAWA) w ramach programu im. Bekkera.

Uniwersytet Warwick założono w latach 60. w ubiegłego wieku w miejscowości Coventry. W jego obrębie działa ponad 50 centrów badawczych skupionych na 3 wydziałach oraz kilka instytutów międzywydziałowych. Jest jednym z czołowych ośrodków naukowych w Wielkiej Brytanii, rozpoznawalnych na całym świecie. Potwierdzają to wysokie pozycje w narodowych i światowych rankingach (9. miejsce na liście The Guardian 2020 League Table, 62. pozycja w ran-

kingu QS World University Rankings 2020 oraz 77. w rankingu The World University Ranking 2020). Na Uniwersytecie realizowanych jest wiele interdyscyplinarnych projektów wpisujących się w aktualne światowe trendy, poszukujących rozwiązań najistotniejszych problemów dzisiejszego społeczeństwa, takich jak oporność bakterii na antybiotyki, niska wydajność upraw w krajach Trzeciego Świata czy przetwarzanie organicznej biomasy.

Uczelnia ma również znaczące osiągnięcia w obszarze technologii elektronicznych nosów (e-nosów). Pionierskie badania dotyczące urządzenia naśladującego biologiczny zmysł węchu prowadzone były tu w latach 80. XX w. przez K. Persaud i G. Dodd w grupie badawczej Warwick Olfaction Research Group. Następnym etapem tych badań było opracowanie na początku lat 90. XX w. przez naukowców z tej uczelni, we współpracy z firmą Bass plc oraz Neotronics plc, pierwszego na świecie komercyjnego elektronicznego nosa. Od tamtego czasu urządzenia te wciąż są rozwijane, powstało wiele systemów komercyjnych, a także laboratoryjnych prototypów. Obecnie istnieje ok. 20 różnych firm produkujących elektroniczne nosy, które sprzedają ok. 200 maszyn rocznie.

Zespół kierowany przez prof. J. Covingtona prowadzi badania nad opracowaniem nowych technologii wykorzystujących analizę zapachu do różnorodnych zastosowań, m.in. medycznych, konsumenckich oraz rolniczych. Grupa badawcza pracuje w Laboratorium Sensorów Biomedycznych wyposażonym w nowoczesne komercyjnie dostępne urządzenia typu elektroniczny nos firmy AlphaMOS (Fox 4000 and 3000), Airsense (PEN-3), Sensigent (Cyrano Electronic Nose). Ponadto ściśle współpracuje z innymi producentami tych urządzeń, zapewniając sobie w ten sposób różnorodność wykorzystywanego sprzętu analitycznego. Zespół opracowuje nową gamę laboratoryjnych prototypów urządzeń opartych na szeregu czujników gazowych zarówno komercyjnych, jak i zmodyfikowanych w ramach badań. W ten sposób systemy te mogą być dostosowane do konkretnego zadania badawczego. Do tej pory opracowano kilka prototypów elektronicznych nosów nazwanych od Uniwersytetu Warwick WOLF (Warwick OLFactory).

W ostatnich latach grupa badawcza prof. Covingtona prowadziła badania nad wczesną detekcją, za pomocą elektronicznego nosa, mokrej zgnilizny ziemniaków w czasie ich przechowywania. Eksperymenty przeprowadzono zarówno w warunkach laboratoryjnych, jak i w komercyjnej przechowalni (Rutolo i in. 2016, Rutolo i in. 2018ab). Na podstawie wyników badań stwierdzono, że wybrane czujniki umożliwiają zarówno wczesne wykrywanie choroby, jak i monitorowanie jej postępu aż do stadium objawowego.

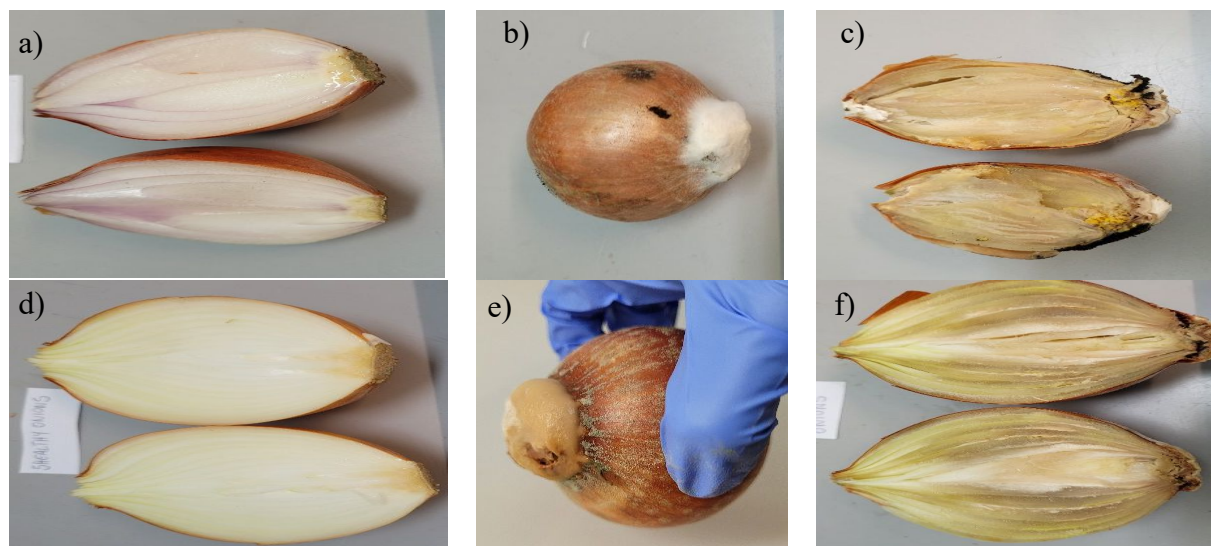
Badania przeprowadzone w ramach stażu naukowego

Pierwszym etapem projektu były wstępne badania mające na celu określenie przydatności zaproponowanych technik analitycznych do postawionego zadania oraz ocena doboru obiektów badawczych. W tym eksperymencie analizowano związki chemiczne uwalniane przez cebule oraz szalotki zainfekowane patogenem grzybicznym należącym do rodzaju *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*), będącym przyczyną fuzaryjnej zgnilizny cebuli (ang. *Fusarium basal rot*). Choroba ta jest jedną z najważniejszych

przyczyn strat w uprawach cebuli, sięgających nawet 30% (Wang i in. 2018).

Zainfekowany oraz zdrowy (kontrola) materiał roślinny przechowywano w 25°C przez 5 tygodni oraz w 4°C przez 9 tygodni w szczelnie zamkniętych plastikowych pojemnikach, specjalnie wyposażonych na obu końcach w złączki wlotowe i wylotowe umożliwiające pobieranie gazów z przestrzeni nad cebulami bez ich otwierania. W pojemniku umieszczono również wilgotny materiał oraz plastikowy stelaż w celu zachowania wysokiej wilgotności, pozwalającej na rozwój infekcji grzybowej.

Próbki gazowe poddawano analizie za pomocą komercyjnego elektronicznego nosa PEN-3 (Airsense Analytics GmbH, Niemcy) oraz spektrometru mobilności jonów sprzężonego z chromatografem gazowym (GC-IMS) dwa razy w tygodniu przez okres 5 tygodni oraz w 9. tygodniu. Sygnały czujników elektronicznego nosa PEN-3 poddano przetwarzaniu za pomocą metod rozpoznawania obrazów. Obserwowano również występujące z czasem objawy infekcji grzybowej. Poniżej przedstawiono zdjęcia szalotki i cebuli zdrowej oraz zainfekowanych po 5 tygodniach przechowywania w 25°C.



Fot. 1. Szalotka i cebula po 5 tygodniach przechowywania w 25°C (fot. M. Łabańska):

a) przekrój podłużny szalotki zdrowej, b) szalotka porażona patogenem z rodziny *Fusarium*, c) przekrój podłużny porażonej szalotki, d) przekrój podłużny cebuli zdrowej, e) cebula porażona patogenem z rodziny *Fusarium*, f) przekrój podłużny porażonej cebuli

Stwierdzono, że analiza uwalnianych przez rośliny lotnych związków za pomocą ww. urządzeń pozwala na rozróżnienie badanych próbek. Na podstawie zarejestrowanych sygnałów zaobserwowano rozwój infekcji w czasie oraz istotny wpływ temperatury przechowywania na rozwój infekcji. Ponadto, dzięki wykorzystaniu dwóch obiektów badawczych (cebuli zwyczajnej oraz szalotek), możliwa była obserwacja rozwoju infekcji u różnych gospodarzy oraz zbadanie możliwości elektronicznego nosa i spektrometru GC-IMS pod kątem ich rozpoznawania.

W kolejnych badaniach szczególną uwagę zwrócono na możliwość wczesnej detekcji choroby. Z tego względu eksperymenty wykonywano codziennie aż do momentu wystąpienia wizualnych objawów choroby i poszerzono zbiór analizowanych roślin, włączając do niego cebulę czerwoną oraz czosnek. Ponadto, cebule zwyczajne zainfekowano również innym patogenem grzybowym (*Sclerotium cepivorum*) – sprawcą zgnilizny białej. Przygotowano także rośliny kontrolne (niezainfekowane) oraz cebule zwyczajne zainfekowane dwoma patogenami. W ten sposób oceniono możliwości wykorzystanych urządzeń (komercyjnego elektronicznego nosa PEN-3 oraz spektrometru mobilności jonów GC-IMS) do detekcji choroby u różnych roślin z tej samej rodziny, a także sprawdzono, czy stosowane narzędzia są w stanie rozróżnić infekcje powodowane przez dwa gatunki patogenów grzybowych.

Interesującym etapem projektu była analiza próbek gazowych zebranych w komercyjnej przechowalni cebuli. Była to istotna i ciekawa część projektu, pozwoliła na wykonanie doświadczenia w warunkach przechowalni, które z dużym uproszczeniem są odzwierciedlane w laboratorium, a także dała możliwość dyskusji z doświadczonymi pracownikami i rolnikami na temat warunków i procesu przechowywania cebuli oraz związanych z nim problemów i potrzeb. Dzięki temu etapowi zdobyto wyjątkową wiedzę oraz doświadczenie dotyczące przechowywania upraw.

Podsumowanie

W czasie stażu naukowego przeprowadzono szereg doświadczeń, w których udowodnio-

no możliwość zastosowania elektronicznego nosa oraz GC-IMS do wykrywania infekcji cebuli zwyczajnej wywołanych dwoma patogenami grzybowymi, a także do monitorowania przebiegu infekcji u różnych roślin należących do tej samej rodziny (czosnek, cebula zwyczajna, szalotka, cebula czerwona). Wykorzystując metodę GC-MS, udało się zidentyfikować z dużym prawdopodobieństwem lotne związki, które uwalniane są naturalnie przez rośliny, a także te związane z infekcjami grzybowymi. Dodatkowo, wizyta w komercyjnej przechowalni cebuli pozwoliła zgłębić wiedzę na temat zarówno warunków, jak i procesu przechowywania cebuli oraz związanych z nim problemów i potrzeb. Dzięki tej wizycie uzyskano wyjątkową wiedzę oraz doświadczenie dotyczące przechowywania zbiorów.

Projekt był finansowany przez Narodową Agencję Wymiany Akademickiej w ramach programu im. Bekkera (PPN/BEK/2020/1/00383).

Literatura

- Buja I., Sabella E., Monteduro A. G., Chiriaco M. S., De Bellis L., Luvisi A., Maruccio G. 2021.** Advances in plant disease detection and monitoring: From traditional assays to in-field diagnostics – *Sensors* 21: 1-22;
- Oerke E. C. 2006.** Crop losses to pests – *J. Agric. Sci.* 144: 31-43;
- Rutolo M. F., Clarkson J. P., Covington J. A. 2018.** The Use of an Electronic Nose to Detect Early Signs of Soft-Rot Infection in Potatoes – *Biosyst. Eng.* 167: 137-143;
- Rutolo M. F., Clarkson J. P., Harper G., Covington J. A. 2018.** The Use of Gas Phase Detection and Monitoring of Potato Soft Rot Infection in Store – *Postharvest Biol. Technol.* 145: 15-19;
- Rutolo M. F., Iliescu D., Clarkson J. P., Covington J. A. 2016.** Early Identification of Potato Storage Disease Using an Array of Metal-Oxide Based Gas Sensors – *Postharvest Biol. Technol.* 116: 50-58;
- Sankaran S., Mishra A., Ehsani R., Davis C. 2010.** A review of advanced techniques for detecting plant diseases. – *Comput. Electron. Agric.* 72: 1-13;
- Savary S., Ficke A., Aubertot J. N., Hollier C. 2012.** Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security – *Food Secur.* 4: 519-537;
- Wang A., Haapalainen M., Lahtala S., Edelenbos M., Johansen A. 2018.** Discriminant analysis of volatile organic compounds of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* and *Fusarium proliferatum* isolates from onions as indicators of fungal growth – *Fungal Biol.* 122: 1013-1022

