

Ocena metod diagnozowania chorób korzeni i pochwy liściowej pszenicy ozimej

EWA SOLARSKA, MAGDALENA GRUDZIŃSKA

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

e-mail: esolar@iung.pulawy.pl

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

The evaluation of winter wheat roots and leaf sheath diseases diagnostic methods.

(Otrzymano: 17.05.2005)

Summary

The maltose and mineral media for isolation of *Gaeumannomyces graminis* from roots were assessed. The differences in numbers of obtained isolates were found depending on the medium used and sampling date. Easier identification of pathogen was possible employing maltose medium. The fungi from genus *Fusarium* occurring on winter wheat leaf sheaths were identified by mycological analysis and PCR, while the fungus *Pseudocercospora herpotrichoides* was detected by PCR and ELISA methods. PCR and ELISA methods enabled to detect pathogens also in periods before the disease symptoms on plants occurred.

Key words: winter wheat, *G. graminis*, *Fusarium* spp., *P. herpotrichoides*, identification, mycological analysis, PCR, ELISA

WSTĘP

Identyfikacji patogenów nekrotroficznych zbóż dokonuje się na podstawie objawów chorobowych na roślinie oraz morfologii czystych kultur, uzyskanych z porażonych tkanek, na odpowiednich pożywkach. Jednakże metody te nastroczą duże trudności, bowiem w przypadku infekcji mieszanych często niemożliwa jest izolacja gatunku o wolniejszym wzroście. Szczególnie szybko rosnące na pożywkach gatunki z rodzaju *Fusarium* często zupełnie zarastają wolnorozwijające się gatunki z rodzajów

Gaumannomyces i *Pseudocercospora*. Dochodzi wówczas do nieprawidłowych identyfikacji przyczyny choroby. Stosuje się wówczas podłoża selektywne, szczególnie przydatne do izolacji *Gaumannomyces graminis* (Tivoli, 1976). Opracowano również metody identyfikacji tych patogenów z wykorzystaniem testu ELISA i technik molekularnych (Bardsley i in., 1998; Kendall i in., 1998).

W prezentowanej pracy dokonano oceny metod diagnozowania chorób korzeni i pochwy liściowej pszenicy ozimej tj. klasycznej analizy mykologicznej oraz technik ELISA i PCR.

MATERIAŁ I METODY

Badania nad występowaniem grzybów chorobotwórczych na pszenicy ozimej uprawianej w systemach ekologicznym, integrowanym, konwencjonalnym i monokulturze, przeprowadzono w latach 2001-2003 (Solarska i in., 2003). Zdrowotność roślin określano każdego roku jesienią i po przezimowaniu. Pobieranie materiału roślinnego przeprowadzano w sposób podany przez Mróz i in. (1990). Rośliny z nekrozami korzeni i pochew liściowych przeznaczano do analizy mykologicznej. Materiał roślinny płukano w bieżącej wodzie w celu usunięcia zanieczyszczeń, a następnie korzenie odkażano przez 15 sekund w 0,002% alkoholowym roztworze $HgCl_2$ (Tivoli, 1976), a pochwę liściową przez 1 minutę w 50% etanolu i na taki sam czas zanurzano w 0,1% roztworze sublimatu. Po odkażeniu analizowany materiał płukano trzykrotnie po 3 minuty w sterylnej wodzie destylowanej. Półcentymetrowe fragmenty korzeni wykładano na każdą szalkę z pożywkami mineralną i maltozową (Łacikowa i Filipowicz, 1972; Tivoli, 1976; Machowicz-Stefaniak, 2002), natomiast fragmenty pochwy liściowej wykładano tylko na pożywkę mineralną. Na 1 szalkę wykładano po 6 fragmentów tkanek roślinnych. Wyosobnione grzyby przeszczepiano na pożywkę glukozowo-ziemniaczaną i oznaczano posługując się kluczami i monografiami podanymi przez Solarską (1996).

Ponadto do wykrywania grzybów z rodzaju *Fusarium* zastosowano konwencjonalny test PCR ze specyficznymi starterami typu SCAR, a w przypadku *Pseudocercospora herpotrichoides* test ELISA i PCR. W tym celu z każdego pola reprezentującego oddzielny system uprawy pszenicy pobrano losowo po 30 roślin w celu przygotowania prób zbiorczych tj. jednej w przypadku testu PCR i trzech w przypadku testu ELISA. Rośliny pszenicy znajdowały się w fazie krzewienia. Z każdej rośliny usuwano korzenie oraz górną część łodygi, a uzyskane fragmenty tkanki roślinnej o długości około 5 cm obejmujące podstawę pędu przecinano wzdłuż i jedną część każdego fragmentu pędu przeznaczano do izolacji DNA według procedury podanej przez Solarską i Grudzińską (2002), a drugą do testu ELISA przeprowadzonego zgodnie z zaleceniami podanymi przez producenta zestawu do wykrywania *Pseudocercospora herpotrichoides* (firma ADGEN).

WYNIKI I DYSKUSJA

Po 4 do 7 dniach od wyłożenia materiału roślinnego na pożywkę maltozową i przetrzymywania szalek w temperaturze 22°C wyróżniało się łatwo wyrosłe wokół fragmentów korzeni kolonie *Gaeumannomyces graminis*. Kolonie tego grzyba charakteryzowały się wodnisto-białym lub szarym zabarwieniem grzybni i jej pierzastym brzegiem. Natomiast na pożywce mineralnej kolonie grzyba tworzyły zwartą grzybnię powietrzną o barwie białej. Podobne kolonie w początkowym okresie wzrostu tworzyły też inne gatunki grzybów na tej pożywce stąd wstępne zakwalifikowanie izolatów do gatunku *Gaeumannomyces graminis* było możliwe dopiero podczas oceny makroskopowej grzybów wzrastających na skosach. Najliczniej wyosabniano patogena wiosną na pożywkę maltozowej. Jesienią natomiast uzyskiwano ogółem mniej izolatów, przy czym więcej na pożywkę mineralnej, niż na maltozowej (tab. 1). Uzyskane wyniki potwierdzają opinie innych autorów, że efektywna izolacja *Gaeumannomyces graminis* jest możliwa w przypadku zastosowania odpowiedniego odkażania korzeni oraz podłoża (Tivoli, 1976).

Tabela 1

Występowanie *Gaeumannomyces graminis* na korzeniach pszenicy ozimej w latach 2001–2003

Table 1

The occurrence of *Gaeumannomyces graminis* on winter wheat roots in 2001–2003

Rok Year	Systemy produkcji Systems of production															
	Ekologiczny Ecological				Integrowany Integrated				Konwencjonalny Conventional				Monokultura Monoculture			
	Wiosna Spring		Jesień Autumn		Wiosna Spring		Jesień Autumn		Wiosna Spring		Jesień Autumn		Wiosna Spring		Jesień Autumn	
	a*	b*	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
2001	0	23	6	0	2	6	2	0	2	7	1	2	0	50	21	1
2002	4	11	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	21	62	0	0
2003	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Razem Total	4	34	6	0	2	10	2	0	2	7	1	2	21	112	21	1

a* pożywka mineralna; mineral medium

b* pożywka maltozowa; maltose medium

W wyniku przeprowadzonej analizy mykologicznej pochw liściowych wykazujących objawy chorobowe uzyskano łącznie 29 izolatów grzybów z rodzaju *Fusarium* w latach 2002–2003. Były to gatunki: *Fusarium poae* wyizolowany z roślin wzrastających w monokulturze w 2002 roku, *Fusarium avenaceum* wyosobniony z roślin wzrastających w systemie ekologicznym i monokulturze w 2003 roku i *Fusarium graminearum* wyizolowany z roślin wzrastających w monokulturze w 2003 roku (tab. 2). Natomiast w każdym roku wykrywano w roślinach grzyby z rodzaju *Fusarium* za pomocą

testu PCR. Przy użyciu tego testu nie wykrywano w okresie badań jedynie *Fusarium culmorum*. We wszystkich sezonach i systemach wykrywano w roślinach obecność gatunku *Fusarium poae*. Grzyb *Fusarium avenaceum* wykrywano w roślinach wszystkich systemów w latach 2002 i 2003, a nie stwierdzano obecności tego grzyba w roślinach w 2001 roku. *Fusarium graminearum* wykryto tylko w roślinach wzrastających w systemie ekologicznym w 2001 roku. *Microdochium nivale* wykrywano co roku w roślinach wzrastających w systemie integrowanym, a w 2002 roku również w systemie konwencjonalnym i monokulturze i w 2003 w systemie ekologicznym i monokulturze (tab. 2). Porównanie identyfikacji grzybów z rodzaju *Fusarium* i *Microdochium nivale* za pomocą konwencjonalnej analizy mykologicznej i testu PCR wskazuje na przewagę metody PCR. Dokonując takiego porównania przy wykorzystaniu różnych podłoży do izolacji grzybów z rodzaju *Fusarium* ustalono, że w przypadku niektórych podłoży wykrywalność grzybów z tego rodzaju jest porównywalna z testem PCR (Schütz et al., 1997).

Tabela 2

Grzyby z rodzaju *Fusarium* występujące na pochwie liściowej pszenicy ozimej wiosną w latach 2001–2003 identyfikowane za pomocą dwóch metod diagnostycznych

Table 2

The fungi from genus *Fusarium* occurring on winter wheat leaf sheath in spring 2001–2003 identified by two diagnostic methods

Rok Year	Gatunek grzyba Fungus species	Systemy produkcji - Systems of production							
		ekologiczny organic		integrowany integrated		konwencjonalny conventional		monokultura monoculture	
		an. mykol.* mycol. an.	PCR	an. mykol. mycol. an.	PCR	an. mykol. mycol. an.	PCR	an. mykol. mycol. an.	PCR
2001	<i>Fusarium avenaceum</i>		-		-		-		-
	<i>Fusarium culmorum</i>		-		-		-		-
	<i>Fusarium graminearum</i>		+		-		-		-
	<i>Fusarium poae</i>		+		+		+		+
	<i>Microdochium nivale</i>		-		+		-		-
2002	<i>Fusarium avenaceum</i>		+		+		+		+
	<i>Fusarium culmorum</i>		-		-		-		-
	<i>Fusarium graminearum</i>		-		-		-		-
	<i>Fusarium poae</i>		+		+		+		+
	<i>Microdochium nivale</i>		-		+		+	4	+
2003	<i>Fusarium avenaceum</i>	4	+		+		+	16	+
	<i>Fusarium culmorum</i>		-		-		-		-
	<i>Fusarium graminearum</i>		-		-		-	5	-
	<i>Fusarium poae</i>		+		+		+		+
	<i>Microdochium nivale</i>		+		+		-		+

(+) pozytywny wynik reakcji PCR - positive PCR signal

(-) negatywny wynik reakcji PCR - negative PCR signal

* analiza mykologiczna - mycological analysis

Porównanie występowania *Pseudocercospora herpotrichoides* na pochwie liściowej za pomocą dwóch metod diagnostycznych tj. PCR i ELISA wskazuje na lepszą przydatność testu ELISA w ocenie porażenia roślin przez tego patogena. Za pomocą testu PCR wykryto obecność grzyba w roślinach tylko w 2001 roku (tab. 3). Stwierdzone różnice w lokalizacji produktów PCR po amplifikacji DNA otrzymanego z pszenicy ozimej w stosunku do kontrolnego produktu PCR świadczą o zmienności genetycznej izolatów grzyba w obrębie tego samego patotypu (Nicholson i Rezanoor, 1994). Negatywne wyniki reakcji PCR uzyskane w latach 2002–2003, pomimo że w teście ELISA otrzymywano wysokie wartości ekstynkcji, można wyjaśnić dużą zmiennością genetyczną grzyba powodującą w efekcie brak komplementarności pomiędzy sekwencją matrycy, a użytymi starterami. Ponadto za pomocą testu ELISA jest możliwe ilościowe oznaczenie patogena w roślinach. Najłabsze porażenie roślin przez *P. herpotrichoides* odnotowano w 2001, a najsilniejsze w 2003 roku (tab. 3). Duża czułość metody pozwala stwierdzić obecność grzyba jeszcze przed pojawieniem się zewnętrznych objawów choroby tj. w okresie krzewienia się pszenicy a co za tym idzie umożliwia zastosowanie racjonalnego programu ochrony.

Tabela 3

Występowanie *Pseudocercospora herpotrichoides*
na pochwie liściowej pszenicy ozimej w latach 2001–2003

Table 3

The occurrence of *Pseudocercospora herpotrichoides*
on winter wheat leaf sheath in 2001–2003

Rok Year	Systemy produkcji Systems of production							
	Ekologiczny Ecological		Integrowany Integrated		Konwencjonalny Conventional		Monokultura Monoculture	
	PCR	ELISA*	PCR	ELISA	PCR	ELISA	PCR	ELISA
2001	+	0,1604	+	0,0171	+	0,0107	+	0,1209
2002	-	0,5302	-	0,7840	-	0,3515	-	0,7640
2003	-	1,8683	-	1,9426	-	1,5291	-	1,5291

(+) – pozytywny wynik reakcji PCR; positive PCR signal

(-) – negatywny wynik reakcji PCR; negative PCR signal

* średnia wartość ekstynkcji; mean value of absorbance

LITERATURA

- Bardsley E.S., Burgess J., Daniels A., 1998. The use of a polymerase chain reaction diagnostic test to detect and estimate the severity of stem base diseases in winter wheat. The BCPC Conference – Pest and Diseases 3: 1041–1046.

- Kendall S.J., Holloman D.W., Selley A., 1998. Immunodiagnosis as an aid to the timing of fungicide sprays for the control of *Mycophaeella graminicola* on winter wheat in the UK. The BCPC Conference – Pest and Diseases 2: 701–706.
- Łacikowa B., Filipowicz A., 1972. Badania nad występowaniem *Fusarium nivale* (Fr.) Ces. (st. doskonałe *Griphosphaeria nivalis* (Schaffnit) Müller et v. Arx.) w uprawach żyta woj. lubelskiego. Ann. Univ. Marie Curie-Skłodowskiej, Sect. E, Agric. 27: 211–232.
- Machowicz-Stefaniak Z., Zimowska B., Zalewska E., 2002. Grzyby zasiedlające różne organy tymianku właściwego *Thymus vulgaris* L. uprawianego na Lubelszczyźnie. Acta Agrobot. 55 (1): 185–197
- Mróz A., Jelinoski S., Kuś J., 1990. Wpływ zmianowania na porażenie pszenicy przez *Gaeumannomyces graminis* oraz *Pseudocercospora herpotrichoides*. Pamist. Puł., 97: 55–63.
- Nicholson P., Rezanoor H.N., 1994. The use of random amplified polymorphic DNA to identify pathotype and detect variation in *Pseudocercospora herpotrichoides*. Mycol. Res. 98 (1): 13–21.
- Schütze A., Oerke E.C., Dehne H.W., 1997. Isolation and identification of *Fusarium* spp. and *Microdochium nivale* from winter wheat. s. 337–340 w “Diagnosis and identification of plant pathogens” (Dehne H.W. i in., red.). Kluwer Academic Publishers.
- Solarska E., Mróz A., Kuś J., 2003. Występowanie chorób powodowanych przez grzyby na pszenicy ozimej uprawianej w różnych systemach produkcji. Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Rośl. 43(1): 381–388.
- Solarska E., Grudzińska M., 2002. Wykorzystanie łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) do wykrywania *Pseudocercospora herpotrichoides* w pszenicy ozimej uprawianej w różnych systemach produkcji. Acta Agrobot. 55 (1): 311–317.
- Solarska E., 1996. Kształtowanie się zbiorowisk grzybów i bakterii w glebie pod uprawą chmielu w zależności od zabiegów agrotechnicznych ograniczających wercyciliozę (*Verticillium albo-atrum*). Rozprawa habilitacyjna, IUNG Puławy, ss.102.
- Tivoli B., 1976. Biologie et ecologie de differentes souches d’*Ophiobolus graminis* Sacc. Consequences pour la mise en oeuvre d’une methode de lutte biologique: la premunition. These de docteur. Université de Rennes, ss. 136.

Streszczenie

Badano przydatność podłoża maltozowego i mineralnego do izolacji *Gaeumannomyces graminis* z korzeni pszenicy ozimej. Stwierdzono różnice w liczebności uzyskanych izolatów w zależności od zastosowanego podłoża i terminu pobierania materiału roślinnego. Łatwiejsza identyfikacja patogena była możliwa po zastosowaniu pożywki maltozowej. Grzyby z rodzaju *Fusarium* występujące na pochwach liściowych pszenicy ozimej identyfikowano za pomocą analizy mykologicznej i PCR, natomiast grzyb *Pseudocercospora herpotrichoides* był wykrywany przy użyciu metod PCR i ELISA. Technika PCR i test ELISA umożliwiły wykrycie patogenów w porażonych roślinach przed wystąpieniem widocznych objawów chorobowych.