

Eligia Starzycka, Michał Starzycki, Jan Pszczola\*

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Zakład Roślin Oleistych w Poznaniu

\* Hodowla Roślin „Strzelce”, Oddział w Borowie

## Otrzymywanie czystych izolatów grzyba *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary z zanieczyszczonych sklerocjów

### Obtaining of pure *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary isolates from contaminated sclerotia

Słowa kluczowe: *Sclerotinia sclerotiorum*, czystość izolatów, PCR-RAPD

Key words: *Sclerotinia sclerotiorum*, isolates purity, PCR-RAPD

Do badań polimorfizmu DNA u *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary niezbędne są czyste kultury grzyba. Aby je otrzymać wykorzystano rośliny podatne na porażenie przez patogena, a pochodzące z krzyżowań międzygatunkowych. Fragmenty roślin klonowano, a następnie inokulowano dolne końce łodyg mieszaniną nie zidentyfikowanych grzybów oraz bakterii, otrzymanych z pierwotnej izolacji sklerocjów. Oczyszczanie polegało na różnicach w szybkości porażania łodygi przez różne mikroorganizmy. Ze względu na podatność wybranej rośliny, porażenie przez *S. sclerotiorum* postępowało najszybciej, tak że izolaty z górnych części łodyg zawierały tylko tego patogena. Przy pomocy opracowanej metody otrzymano wolne od zanieczyszczeń izolaty grzyba, a obecność patogena potwierdzono za pomocą widocznych pod mikroskopem stereoskopowym sklerocjów i markerów molekularnych RAPD.

Pure cultures of different fungi species are necessary for many DNA investigations, also for polymorphism checking of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. To receive such pure cultures, plants susceptible to mentioned pathogen and originating from interspecific crosses were used. Stem fragments of plants were cloned and then inoculated with the pathogen using newly worked out method. Purification method was based on the process of re-isolation of *S. sclerotiorum* mycelium from upper part of stems previously infected with mixture of unidentified fungi and bacteria, which were obtained from preliminary isolation from sclerotia. With this method isolates free of contamination were obtained, and the presence of the fungus *S. sclerotiorum* was confirmed by microscope observation of sclerotia and molecular marker RAPD method.

## Wstęp

Do badań polimorfizmu DNA różnych grzybów, w tym *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, niezbędne są czyste kultury pozbawione zanieczyszczeń. W większości przypadków na powierzchni sklerocjów występują różnego rodzaju zarodniki grzybów i endospory bakterii. Organizmy te często rosną jako pierwsze

na pożywkach agarowych, uniemożliwiając tym samym otrzymanie monokultur patogena. W niniejszej pracy podjęto próby oczyszczenia grzyba *S. sclerotiorum* z zanieczyszczeń, stosując metodę opartą na inokulacji w warunkach *in vitro* fragmentów łodyg roślin podatnych na tego patogena. Na świecie, a także w Polsce, literatura na podany temat jest bardzo uboga. Podobne prace, zmierzające do otrzymania czystego inokulum są także nieliczne (Pierre i in. 1990).

## Materiały i metody

---

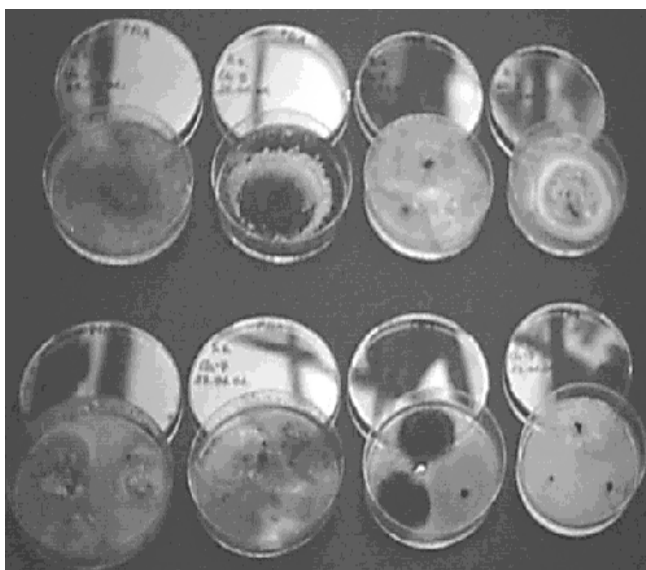
W badaniach nad *S. sclerotiorum* wykorzystano dziewięć izolatów pochodzących z Chin oraz jeden z Polski. Otrzymane z zagranicy sklerocja pochodziły z rzepaku (7 izolatów oznaczonych: od 2-Ch do 8-Ch), z soi (izolat oznaczony 9-Ch) oraz ze słonecznika (izolat oznaczony 1-Ch). Izolat *S. sclerotiorum* z Polski pochodził z rzepaku. Od szeregu lat patotyp ten o symbolu Ss-3 jest stosowany do inokulacji roślin przy atestacji odporności na tego grzyba nowych genotypów *B. napus*. Patotyp ten został określony jako średnio agresywny. Po analizach DNA ze znanymi starterami wykorzystywany jest obecnie jako identyfikacyjny wzorzec gatunku. Wszystkie zagraniczne sklerocja sterylizowano zewnątrz płomieniem palnika, alkoholem etylowym lub tlenem atomowym i nakładano na pożywki agarowe. Sklerocja kontrolne bez sterylizacji nałożono na takie same pożywki agarowe. Były to: V<sub>1</sub> („vegetable<sub>1</sub>” — sok pomidorowy — 80 ml/l, agar — 13 g/l pożywki), PDA („potato” — ziemniaki, dekstroza, agar, 20 g/l pożywki) oraz maltozowe (maltoza 20 g/l, agar 20 g/l). Po siedmiu dniach hodowli w temperaturze 20°C kolonie *S. sclerotiorum* okazały się tak silnie zanieczyszczone innymi grzybami i bakteriami, że izolacja jakiegokolwiek fragmentu ich grzybni była niemożliwa. Sytuacja ta dotyczyła zarówno zewnątrz wysterylizowanych jak i nie sterylizowanych sklerocjów. W związku z tym dla otrzymania czystych kultur grzyba *S. sclerotiorum* inokulowano tymi hodowlami w warunkach *in vitro* fragmenty roślin podatnych na porażenie. Materiał ten stanowiły łodygi z rozklonowanych roślin w fazie przed kwitnieniem, a pochodzące z pojedynczego egzemplarza mieszańca międzygatunkowego typu *B. napus* × *B. oleracea* (forma żółtonasienna). Używane klony mieszańca otrzymano poprzez hodowlę izolowanych zarodków mieszańcowych *in vitro* (Starzycki i in. 1998). W metodzie do uzyskania rozdziału mikroorganizmów wykorzystano różnice w szybkości rozrastania się grzybni wzdłuż łodygi, począwszy od miejsca inokulacji zanieczyszczonej kulturą. Wykorzystano zdolność bardzo szybkiego (5 cm/36 h) wzrostu grzybni patogena *S. sclerotiorum* na zielonych łodygach podatnych roślin. Inne zanieczyszczenia biotyczne, nie identyfikowane w pracy, ze względu na brak powinowactwa w stosunku do żywych tkanek roślin zasiedlały je znacznie wolniej.

Uzyskiwanie czystego izolatu *S. sclerotiorum* z zanieczyszczonej kultury przebiegało następująco. Na dno przezroczystego plastikowego naczynia wkładano wycięty skrawek pożywki maltozowo-agarowej, wielkości  $3 \times 3$  cm, przerośnięty mieszaniną różnych grzybni, w tym *S. sclerotiorum*. Następnie w pożywkę tę wkładano 9 centymetrowy kawałek pędu pobrany z kwitnącej rośliny, który uprzednio zewnętrznie wysterylizowano alkoholem etylowym. Pojemniki przykrywano parafilmem. Po 10 dniach, po przerośnięciu na powierzchni łodyg grzybni (lub powstaniu sklerocjów) patogena *S. sclerotiorum* powtórnie go izolowano i przenoszono na pożywkę PDA. Za pomocą mikroskopu stereoskopowego (powiększenie  $6,3 \times 4$ ) obserwowano rozwój czystych kultur *S. sclerotiorum*. Obecność grzyba potwierdzono przy wykorzystaniu analizy PCR-RAPD (Starzycka i in. 1998). Prace prowadzono w ciągu 3 lat. Pierwsze dwa lata były poświęcone na otrzymanie roślin mieszańców międzygatunkowych, a w trzecim wykonano inokulacje patogenem i dokonano oczyszczeń izolatów oraz przeprowadzono analizy DNA.

## Wyniki

---

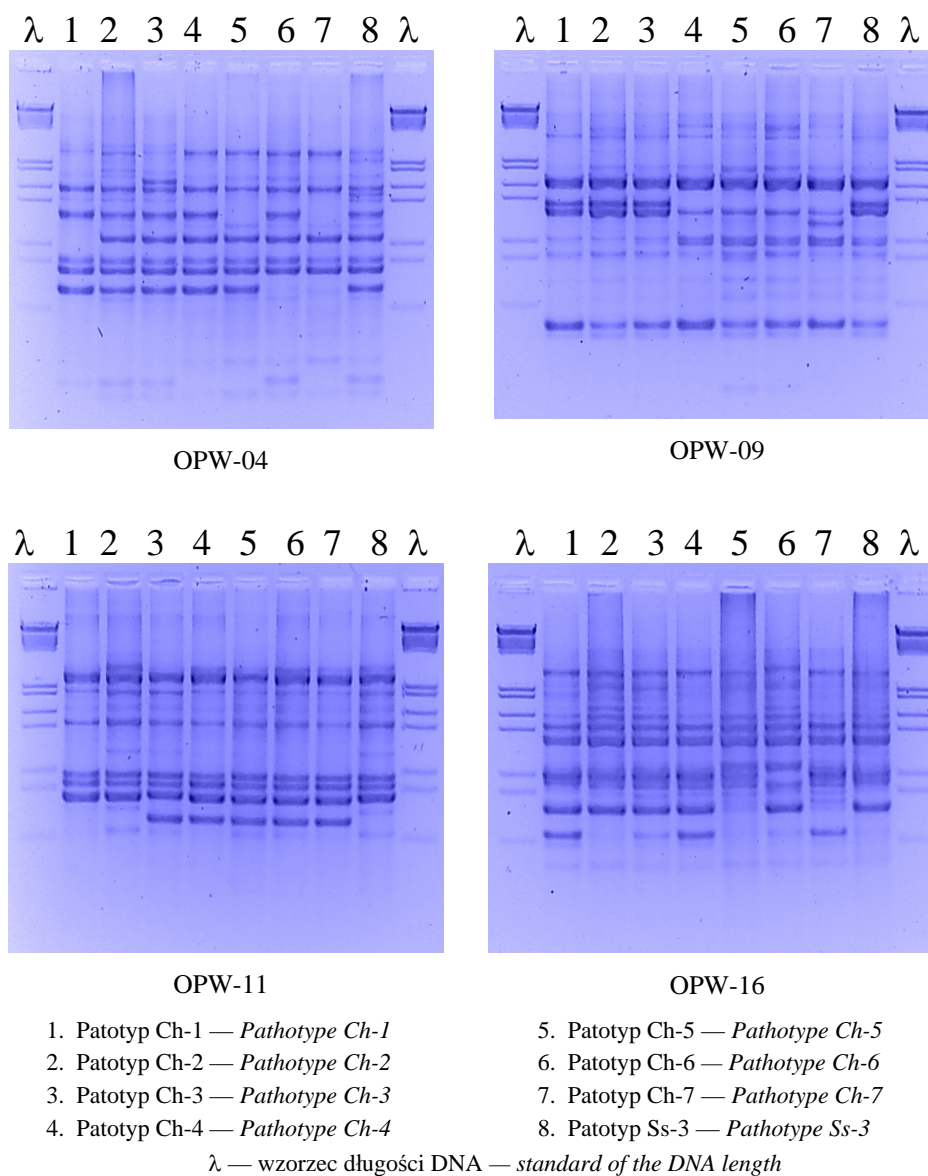
W plastikowym naczyniu, do którego włożono skrawek pożywki maltozowej z mieszaniną różnych grzybów i bakterii (fot. 1) po siedmiu dniach z miejsca odcięcia łodygi w kierunku ku górze obserwowano narastający nalot grzybniowy (fot. 2), a po następnych pięciu powstawanie sklerocjów *S. sclerotiorum*. Wycięte skalpelem z górnej części porażonych tkanek fragmenty grzybni naniesione na pożywkę PDA rozrastały się bardzo szybko, a po dziesięciu dniach od naniesienia wewnątrz płytek Petriego na obwodzie pożywki powstawały sklerocja. W ciągu następnych tygodni hodowli grzyba nie zaobserwowano jakichkolwiek zanieczyszczeń prowadząc systematyczne obserwacje mikroskopowe. Podanym sposobem otrzymano 7 czystych kultur *S. sclerotiorum*. Po izolacji DNA ze sklerocjów obecność patogena potwierdzono przy pomocy PCR-RAPD (rys. 1). Dwa chińskie patotypy: 8-Ch i 9-Ch prawdopodobnie ze względu na długi okres przechowywania (w Chinach) nie wykazywały zdolności do rozwoju.



Fot. 1. Kultury *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary zanieczyszczone obcymi grzybami i bakteriami — Cultures of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary contaminated with strange fungi and bacteria



Fot. 2. Inokulowane w warunkach in vitro fragmenty roślin podatnych na porażenie przez *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary — Fragments of plants susceptible to *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary inoculated in vitro



Rys. 1. Potwierdzenie obecności grzyba *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary przy pomocy starterów RAPD (OPW-04, OPW-09, OPW-11, OPW-16) — *Confirmation of Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary presence, by starters RAPD (OPW-04, OPW-09, OPW-011, OPW-16)

## Dyskusja

---

W dziedzinie poznawania patogena *S. sclerotiorum* i określenia jego patogeniczności obserwuje się duże zainteresowanie zarówno w kraju jak i za granicą (Sansford 1995; Philips i Raymer 1995; Turner i Hardwick 1995; Davies 1995; Morral i Thomson 1995; Hu 1995). Patogen ten corocznie skutecznie przyczynia się do zmniejszenia plonu wielu roślin — infekcji podlega około 400 gatunków (Arahana i in. 2001), w tym również rzepaku. Problem czystości izolatów, który podjęto w pracy, pojawia się w momencie namnażania inokulum z przeznaczeniem do inokulacji roślin oraz w czasie izolacji DNA z grzyba. Zarówno w pierwszym jak i drugim przypadku, czystość kultur decyduje w znaczący sposób o późniejszych wynikach. Oczyszczanie izolatów z biotycznych zanieczyszczeń podanym w opracowaniu sposobem jest łatwe i nie przedstawia większej trudności (fot. 1–2). Wyboru roślin przeznaczonych do „oczyszczania patogena” dokonano na podstawie wcześniej zaobserwowanego zjawiska silniejszego porażania przez *S. sclerotiorum* roślin mieszańców międzygatunkowych F<sub>1</sub> typu *B. napus* × *B. oleracea* niż rzepaku. Jednak w późniejszych badaniach, przy okazji prowadzenia laboratoryjnej atestacji odporności na *S. sclerotiorum* różnych odmian rzepaku ozimego, stwierdzono, że zamiast klonów roślin mieszańców międzygatunkowych można użyć zamiennie roślin podatnych odmian rzepaku (nie publikowano). Niniejsza praca powstała z myślą o wykorzystaniu otrzymanych wyników w przyszłości do badań polimorfizmu DNA populacji grzyba *S. sclerotiorum* i zaprojektowania takich starterów do PCR, które pozwoliłyby na identyfikację izolatów posiadających zdolność do tworzenia kwasu szczawiowego oraz izolatów nie posiadających takich właściwości. Przedstawione profile prążkowe amplifikowanego DNA (rys. 1) wskazują z jednej strony na obecność patogena (Starzycka i in. 1998), a z drugiej na pewien niewielki polimorfizm analizowanych patotypów. Wyniki te jednak nie stanowią o przynależności danego patotypu do wspomnianej grupy.

## Wnioski

---

1. Wykorzystując w badaniach rośliny podatne na porażenie przez *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary i powtórnie zaszczepiając grzybnię patogena na pożywkach, otrzymano czyste izolaty grzyba.
2. Obecność *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary stwierdzono przy pomocy mikroskopu i charakterystycznych profili prążkowych, związanych z markerami molekularnymi PCR-RAPD.

## Conclusions

---

1. Pure isolates of the fungus were obtained with the use of susceptible to *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary plants and re-innoculation of the pathogen on agar medium.
2. The presence of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary was confirmed by specific stripe patterns connected with microscope and molecular markers of PCR-RAPD.

## Literatura

---

- Arahana V.S., Graef G.L., Specht J.E., Steadman J.R., Eskridge K.M. 2001. Identification of QTLs for Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in Soybean. *Crop Science* 41: 180-188.
- Borges M.V., Sequeira J.C. 1994. Soil solarization and phytosanitary problems of *Brassica*. ISHS Symposium on Brassicas. Ninth Crucifer Genetics Workshop, Lisbon, Portugal, 15-19 November, 1994: 91.
- CETIOM. 1990. Les points methodes du CETIOM. Techniques for the artificial contamination of oilseed rape in trial plots. *Sclerotinia sclerotiorum* stem rot. 27-33.
- Davies J.M.L. 1995. Petal culturing to forecast *Sclerotinia* winter oilseed rape. Rapeseed today and tomorrow, 9th International Rapeseed Congress, Cambridge, UK, 4-7 July 1995, 3: 1010-1011.
- Hu B.C. 1995. Stem rot (*Sclerotinia sclerotiorum*) tolerance and disease avoidance in CMS lines of *Brassica napus*. Rapeseed today and tomorrow, 9th International Rapeseed Congress, Cambridge, UK, 4-7 July 1995, 4: 1211-1213.
- Morrall R.A.A., Thomson J.R. 1995. Four years' experience in western Canada with commercial petal testing to forecast *Sclerotinia*. Rapeseed today and tomorrow, 9th International Rapeseed Congress, Cambridge, UK, 4-7 July 1995, 3: 1013-1015.
- Phillips D.V., Raymer P.L. 1995. The relationship between time of development of apothecia and appearance of symptoms of *Sclerotinia sclerotiorum* stem rot in the southeastern USA. Rapeseed today and tomorrow, 9th International Rapeseed Congress, Cambridge, UK, 4-7 July 1995, 2: 637-639.
- Sansford C.E. 1995. Oilseed rape: development of stem rot (*Sclerotinia sclerotiorum*) and its effect on yield. Rapeseed today and tomorrow, 9th International Rapeseed Congress, Cambridge, UK, 4-7 July 1995, 2: 634-636.
- Starzycki M., Starzycka E., Krzymański J., Matuszczak M. 1999. Alloplazmatyczny rzepak ozimy otrzymany z krzyżowań międzygatunkowych w rodzinie *Brassicaceae* K., *Rośliny Oleiste*, XX (1): 43-49.
- Starzycka E., Starzycki M., Cichy H., Mikołajczyk K. 1998. Badanie odporności rzepaku ozimego na porażenie przez *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Rośliny Oleiste*, XIX (2): 493-500.
- Turner J.A., Hardwick N.V. 1995. The rise and fall of *Sclerotinia sclerotiorum*, the cause of stem rot of oilseed rape in the UK. Rapeseed today and tomorrow, 9th International Rapeseed Congress, Cambridge, UK, 4-7 July 1995, 2: 640-642.