

Eligia Starzycka, Piotr Kachlicki\*, Michał Starzycki

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Pracownia Metod Hodowli Odpornościowej w Poznaniu

\*Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu

## Zróźnicowanie polskich i chińskich izolatów *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary pod względem zdolności do wytwarzania kwasu szczawiowego

Diversity of Polish and Chinese isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.)  
de Bary and their ability to oxalic acid production

Słowa kluczowe: rzepak ozimy, kwas szczawiowy, izolaty *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary

Key words: winter rape, oxalic acid, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary isolates

Zgnilizna twardzikowa powodowana przez grzyb *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary jest jedną z groźniejszych chorób wielu gatunków roślin uprawnych, w tym rzepaku. Patogen ten corocznie powoduje znaczne obniżenie plonu nasion, dlatego bardzo ważne jest poznanie jego agresywności, wyrażonej między innymi zdolnością do wytwarzania kwasu szczawiowego. W przeprowadzonych badaniach przy pomocy wysoko sprawnej chromatografii cieczowej HPLC stwierdzono duży polimorfizm grzyba *S. sclerotiorum* pod względem tej cechy (stężenia kwasu szczawiowego w przesączu po 3 tygodniach hodowli grzyba wynosiły od 0,44 mM do 3,18 mM).

Stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary fungus is one of the most serious diseases of many crops, including oilseed rape. Since the pathogen causes major decrease of seed yield it is important to study the aggressiveness of its isolates which corresponds to their ability to produce oxalic acid. In this study we have used high performance liquid chromatography (HPLC) to study the production of this compound by *S. sclerotiorum* strains of different origin. There were 0.44 mM to 3.18 mM concentrations of oxalic acid detected in the culture filtrates of the tested isolates after 3 weeks of the fungus growth.

### Wstęp

Grzyb *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary poraża corocznie wiele gatunków roślin uprawnych, w tym rzepak, oraz różne gatunki chwastów (Kim, Diers 2000; Dickson, Petzoldt 1994). Literatura dotycząca zagadnień związanych ze zgnilizną twardzikową rzepaku jest bardzo obszerna zarówno w kraju, jak i za granicą (Starzycka, Starzycki 1994; Philips, Raymer 1995; Turner, Hardwick 1995; Davies 1995; Hu 1995; Luth, Eiben 1995). W latach sprzyjających dla

rozwoju grzyba nasilenie choroby na plantacjach wzrasta, co bezpośrednio wpływa na obniżenie plonu nasion (Sansford 1995). Dlatego bardzo ważne jest poznanie jego agresywności, wyrażonej między innymi zdolnością do wytwarzania kwasu szczawiowego. Patotypy grzyba uznane za bardziej agresywne charakteryzują się znacznie większymi możliwościami produkcji tej mikotoksyny. W celu poznania patotypów pod względem tej cechy, przeanalizowano polskie i chińskie izolaty *S. sclerotiorum*. Badania wykonano wspólnie w dwóch pracowniach: Pracowni Metod Hodowli Odpornościowej IHAR w Poznaniu oraz Pracowni Odpornościowej IGR PAN.

## Materiały i metody

---

Do badań polimorfizmu grzyba *S. sclerotiorum* wykorzystano szesnaście izolatów pochodzących z Chin oraz sześć z Polski. Otrzymane sklerocja były wyizolowane z rzepaku — 13 izolatów oznaczonych: 2-Ch, 3-Ch, 4-Ch, 5-Ch, 6-Ch, 7-Ch, 8-Ch, 9-Ch, 10-Ch, 11-Ch, 12-Ch, 13-Ch, 14-Ch; ze słonecznika — 2 izolaty oznaczone: 1-Ch, 16-Ch oraz z szałwi — 1 izolat oznaczony 15-Ch. Polskie patotypy zostały wyizolowane tylko z rzepaku — 6 izolatów oznaczonych: 1-M, 2-M, 3-P, 5-M, 10-M, 15-B. Wycięte skalpelem skrawki pożywki wielkości 1 cm<sup>2</sup> z grzybnią *S. sclerotiorum* poszczególnych patotypów, oczyszczonych przez reinokulację (Starzycka, Starzycki 2001), wkładano do kolb Erlenmayera (100 ml) zawierających płynną pożywkę Czapek-Dox (50 ml) z dodatkiem ekstraktu drożdżowego (2 g/l). Kultury grzyba hodowano w warunkach laboratoryjnych w temperaturze ok. 24°C oraz 12-godzinnym fotoperiodzie przez trzy tygodnie. Po wyznaczonym czasie grzybnię oddzielono od płynów hodowlanych przy pomocy bibuły filtracyjnej. W celu sprawdzenia czystości prowadzonych kultur *S. sclerotiorum* pobierano z nich małe (ok. 1 mm) skrawki grzyba i nakładano je na pożywkę PDA. Oddzieloną od filtratu grzybnię suszono 6 godzin w komorze z laminarnym przepływem powietrza. Proces ten prowadzono w temperaturze 24–25°C. Po wysuszeniu, każdą próbę zważono i przeliczono stężenie produkowanego przez grzyb kwasu szczawiowego na 0,050 g powietrznie suchej grzybni.

Kwas szczawiowy z płynów pochodzących wyodrębniano z płynnych pożywek na drodze ekstrakcji w fazie stałej (SPE) na kolumnkach anionitowych. Próbkę przesącza (10 ml) nanoszono na kolumnkę SPE (anionit SAX 50 mg, Alltech, UK), kolumnkę przemywano H<sub>2</sub>O (7 ml) i anion szczawianowy wymywano 1 ml 0,5 M (NH<sub>4</sub>)HCO<sub>3</sub>.

Analizę HPLC prowadzono na instrumencie Beckman Gold wyposażonym w autosampler oraz detektor diodowy (DAD). Próbkę otrzymaną powyżej podanym sposobem (20 µl) nanoszono na kolumnę Supelcogel H 250 × 4,6 mm (Supelco, USA) i wymywano 0,1% wodnym roztworem H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Chromatogramy

rejestrowano przy długości fali 210 nm. Zawartość kwasu szczawowego wyliczano na podstawie krzywej kalibracyjnej uzyskanej według powyższej procedury dla roztworów tego związku o znanych stężeniach. Stężenie zawartego w próbach kwasu szczawowego podano w milimolach [mM].

## Wyniki

---

Wartości stężenia kwasu szczawowego wytwarzanego przez różne izolaty *S. sclerotiorum* po trzech tygodniach hodowli przedstawiono w tabeli 1. Stwierdzono duże zróźnicowanie analizowanych patotypów pod względem badanej cechy. Patotypy 1-Ch (ze słonecznika) i 3-Ch (z rzepaku), charakteryzowały się najwyższymi zdolnościami produkcji tego związku. Najmniejsze zdolności posiadały patotypy 5-M, 8-Ch i 14-Ch (wszystkie z rzepaku).

Największą masę suchej grzybni, świadczącą równocześnie o silnym wzroście grzyba *S. sclerotiorum*, odnotowano u patotypów 4-Ch i 1-M (z rzepaku) oraz 15-Ch (z szałwi). Najniższą masę wysuszonej grzybni zaobserwowano u patotypów 2-M, 10-M i 11-Ch (wszystkie z rzepaku). Średnia wartość masy wysuszonej grzybni analizowanych patotypów *S. sclerotiorum* wynosiła 0,052 g.

Wyliczono także ilość kwasu szczawowego wytworzonego przez grzyb na 0,050 g wysuszonej grzybni (tab. 1). U niektórych prób masa wysuszonej grzybni znacznie odbiegała od średniej, co znalazło odzwierciedlenie w zróźnicowaniu względnych ilości wytwarzanego kwasu szczawowego. Niektóre izolaty charakteryzowały się zmniejszonym (4-Ch, 1-M i 15-Ch) lub zwiększonym (2-M, 10-M i 11-Ch) poziomem względnym wytwarzania kwasu szczawowego.

W przeprowadzonych badaniach (tab. 1) nie stwierdzono korelacji pomiędzy masą grzybni uzyskanej po trzech tygodniach hodowli (to znaczy bujnością jej wzrostu) a zdolnością poszczególnych patotypów do produkcji kwasu szczawowego, groźnej dla wielu gatunków roślin mikotoksyny.

## Dyskusja

---

Badania zdolności wytwarzania kwasu szczawowego u różnych patotypów *S. sclerotiorum* mają na celu wskazanie, które z nich charakteryzują się najwyższą agresywnością. Na podstawie obserwacji porażenia odciętych łodyg rzepaku ozimego pojedynczej linii użytej do oczyszczenia grzyba (Starzycka, Starzycki 2001) zaobserwowano, że patotypy pochodzące z innych niż *B. napus* gatunków roślin gospodarzy są zdolne także do infekowania tego gatunku. Spostrzeżenie to potwierdza już dawno odkryte zdolności tego patogena, który zaliczany jest w poczet bardzo groźnych polifagów (Judith i in. 2000). W ciągu 4 dni po zaszczepieniu łodyg rzepaku w warunkach laboratoryjnych, plamy infekcyjne na

wszystkich łądych osiągały długość 3 cm i ich wielkość nie była zróżnicowana. Tak więc powyższa metoda okazała się mało przydatna do badania polimorfizmu izolatów. Przerastające na zewnątrz łądyg strzępki *S. sclerotiorum* użyto do zaszczipienia agarowej pożywki PDA, a następnie do inokulacji płynnej pożywki Czapek-Dox z ekstraktem drożdżowym, do której w czasie prowadzenia hodowli przenikał kwas szczawiowy. W pracy nie przeprowadzono badań porównawczych ilości wytwarzanego kwasu szczawiowego na pożywkach i na roślinach rzepaku. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono dużą zmienność pomiędzy bujnością wzrostową grzybni a jej zdolnościami do produkcji miktotoksyny (tab. 1 — poz. 1, 2, 3, 5, 11).

Tabela 1

Stężenie kwasu szczawiowego wytwarzanego przez różne izolaty *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary po 3 tygodniach hodowli — *Concentration of oxalic acid produced by different isolates of S. sclerotiorum (Lib.) de Bary after 3 weeks of culture*

L.p. No	Izolat Isolate	Masa wysuszonej grzybni Mass of dry mycelium [g]	Stężenie kwasu szczawiowego w pożywce Oxalic acid concentration in medium [mM]	Ilość kwasu szczawiowego wytworzonego na 0,050 g grzybni Amount of oxalic acid produced per 0.050 g of mycelium [mg/50 mg]
1	1-Ch	0,044	3,18	6,50
2	3-Ch	0,049	2,00	3,67
3	4-Ch	0,082	1,68	1,84
4	6-Ch	0,058	1,41	2,19
5	1-M	0,074	0,97	1,18
6	2-Ch	0,042	0,95	2,04
7	11-Ch	0,035	0,90	2,31
8	7-Ch	0,045	0,78	1,56
9	9-Ch	0,059	0,77	1,17
10	2-M	0,034	0,75	1,98
11	3-P	0,057	0,73	1,15
12	10-M	0,030	0,73	2,19
13	15-B	0,040	0,72	1,62
14	15-Ch	0,083	0,70	0,76
15	12-Ch	0,056	0,60	0,96
16	5-Ch	0,039	0,57	1,32
17	10-Ch	0,051	0,57	1,00
18	13-Ch	0,058	0,56	0,87
19	16-Ch	0,058	0,55	0,85
20	5-M	0,043	0,48	1,00
21	8-Ch	0,049	0,47	0,86
22	14-Ch	0,058	0,44	0,68
Średnia masa wysuszonej grzybni Mean mass of dry mycelium		0,052		

## Wnioski

---

- Wszystkie patotypy *S. sclerotiorum* badane metodą HPLC posiadały zdolność wytwarzania kwasu szczawiowego.
- Izolaty *S. sclerotiorum* pochodzące z różnych kontynentów oraz różnych gatunków wytwarzały różne ilości kwasu szczawiowego.

## Conclusions

---

- All the pathotypes of *S. sclerotiorum* studied using HPLC method were able to produce oxalic acid
- The *S. sclerotiorum* isolates coming from different continents and different host plants revealed a wide diversity in their ability to produce oxalic acid.

## Literatura

---

- 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.
- Dickson M.H., Petzoldt R. 1994. White mold or *Sclerotinia* resistance in *B. oleracea*. Ninth Crucifer Genetics Workshop, ISHS Symposium on Brassicas, 15-19 November 1994, Lisbon, Portugal: 41.
- 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.
- Kim H.S., Diers B.W. 2000. Inheritance of Partial Resistance to *Sclerotinia* stem rot in soybean. Crop Science, Vol. 40: 55-61.
- Kolkman J.M., Kelly J.D. 2000. An indirect test using oxalate to determine physiological resistance to white mild in common bean. Vol. 40: 281-285.
- Luth P., Eiben U. 1995. First results in the development of biocontrol agent against *Sclerotinia sclerotiorum*, the disease-causing agent of stem rot in oilseed rape. Rapeseed today and tomorrow, 9th International Rapeseed Congress, Cambridge, UK, 4-7 July 1995, 4: 1275-1277.
- Philips 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.
- Starzycka E., Starzycki M. 1994. Badanie podatności pędów i liści rzepaku ozimego na porażenie przez *Sclerotinia sclerotiorum*. Rośliny Oleiste XV: 83-85.

- Starzycka E., Starzycki M., Pszczoła J. 2001. Otrzymywanie czystych izolatów grzyba *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary z zanieczyszczonych sklerocjów. *Rośliny Oleiste XXII*: 455-461.
- 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.