Metoda izolowania epidermy liści pomidora i ogórka dla mikroskopowej oceny rozwoju grzybów patogenicznych

BARBARA DYKI, HANNA HABDAS

Instytut Warzywnictwa, ul. Konstytucji 3-go Maja 1/3, 96-100 Skierniewice

(Otrzymano dn. 14.05.1996)

D y k i B., H a b d a s H. (Research Institute of Vegetable Crops, Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice, Poland) *Acta Agrobotanica* 49 (1-2): 123-129, 1996. *The method of isolation of epidermis of tomato and cucumber leaves for microscopic investigation of pathogenic fungus development.*

A b s t r a c t

There has been described a new, easy method of isolation and staining of epidermis from leaves and cotyledon of healthy cucumber and infected one with the fungus *Pseudoperonospora cubensis* Berk and Curt and from tomato leaves infected with the fungus *Oidium lycopersicum* Cook and Massee. The epidermis was taken off with the use of transparent Scotch from the leaves and stained with toluidine blue. This method is helpful in distinguishing the differences in a structure of epidermis of healthy and infected leaves and in estimating the following: stage of development of the fungus on epidermis, number and size of haustorium in epidermis cells, number of spores of a fungus on the certain surface of the host leaf. This method is valuable because it enables to protect the material for a long time, which is very important during testing a big number of plants. Key words: leaf epidermis, method of isolation, cucumber, tomato, pathogenic fungus.

WSTĘP

Ocenę porażenia liści przez patogena najczęściej przedstawia się na podstawie obserwacji makroskopowych przy pomocy umownej skali uwzględniającej przybliżony procent powierzchni z występującymi chlorozami i nekrozami. Przy poszukiwaniu cech morfologicznych liścia związanych z wrażliwością odmian na grzyby patogeniczne ważne jest poznanie budowy epidermy gospodarza i porównanie stopnia zarodnikowania grzyba na badanych powierzchniach. Z morfologicznymi i anatomicznymi cechami epidermy związana jest tzw. odporność właściwa bierna roślin

na działanie grzybów (Y a n g i in., 1972; S c h u m a n i in., 1992). Od lat poszukiwane są korelacje między grubością kutikuli, ilością aparatów szparkowych lub ilością włosków w epidermie liścia a odpornością roślin (M i s k o i P o s t n i k o v a, 1989; K i t r o o n g r u a n g i in., 1991; P a v l e n k o, 1991, 1993). Zastosowanie elektronowego mikroskopu skaningowego do tych badań nie daje dokładnego obrazu interakcji epiderma liścia – patogen, jak również nie jest dostępne w warunkach każdego laboratorium. Przy prowadzeniu badań nad biologią grzyba *Oidium lycopersicum* Cook and Massee, wywołującego mączniaka prawdziwego pomidora (D y k i i in., 1994) i odpornością różnych linii hodowlanych ogórka na *Pseudoperonospora cubensis* Berk and Curt, który jest sprawcą mączniaka rzekomego (H a b d a s i in., 1994, 1996) opracowano prostą i szybką metodę izolowania i barwienia epidermy liści do analizy w mikroskopie świetlnym.

MATERIAŁ

Badania cytologiczne nad odpornością ogórka na grzyb *Pseudoperonospora cubensis*, prowadzono na odm. Wisconsin i linii 3351 wykazujących dużą wrażliwość oraz na liniach 3320 i 3292 wykazujących dużą tolerancję na tego patogena. Badano również cykl życiowy grzyba *Oidium lycopersicum* Cook and Massee, który jest przyczyną mączniaka prawdziwego objawiającego się białym, mączystym nalotem na górnej powierzchni liści pomidora. Dla tego celu przebadano liście wielu odmian pomidora uprawnego (*Lycopersicon esculentum*), które są wrażliwe na tego patogena oraz liście trzech dzikich gatunków (*L. pennelli*, *L. chilense*, *L. hirsutum*) i ich mieszańców z pomidorem uprawnym, charakteryzujących się nieporażalnością lub wysoką tolerancją. Liście i liścienie zdrowych i chorych roślin ogórka czy pomidora, po makroskopowej ocenie poddawano nowo opracowanej metodzie „izolowania epidermy”.

OPIS METODY

Na fragmenty liścienia lub liścia, z obydwu jego stron, naklejano kawałki przezroczystej taśmy (a i b) typu Scotch (rys. 1). Następnie, lekko naciskając, dokładnie przyklejano obydwie powierzchnie tak, aby pęcherzyki powietrza nie znajdowały się między taśmą a komórkami epidermy. Potem rozklejano fragmenty (a i b) i w ten sposób otrzymano zabezpieczoną epidermę górnej i dolnej strony liścia na dwóch oddzielnych kawałkach taśmy (rys. 1), które oznaczano (w sposób umowny) dla ich rozróżnienia. Resztki mezofilu z obydwu fragmentów taśmy usuwano skalpelem uważając, aby nie uszkodzić przyklejonej warstwy epidermy. Po przepłukaniu w wodzie destylowanej, taśmę a i b (z przyklejoną epidermą górnej i dolnej strony liścia) barwiono w błękitie toluidyny (2% błękit toluidyny w 1% roztworze wodnym czteroboranu sodu). Barwiony materiał umieszczano na szkiełku podstawowym w glicerynie (wewnętrzna strona epidermy do szkiełka podstawowego). Sporządzony w ten

sposób preparat epidermy liścia czy liścienia (wraz z patogenem), został zabezpieczony przed wysychaniem i mógł być przechowywany, po uprzednim przykryciu szkiełkiem przykrywkowym, do czasu prowadzenia obserwacji w mikroskopie świetlnym

Rys. 1. Schemat wykonywania preparatu „izolowanie epidermy” (a, b – taśma)
The outline of making the specimen “isolahon of epidermis” (a, b – scotch tape)

WYNIKI

Nowo opracowana metoda pozwoliła na dokonanie ilościowej oceny zarodnikowania grzyba *Pseudoperonospora cubensis* na liniach wrażliwych (fot. 1, 2) i tolerancyjnych ogórka (fot. 3, 4) oraz porównania morfologii epidermy (kształt i wielkość komórek, grubość ścian komórkowych, liczba aparatów szparkowych) przedstawionej na fot. 5-8. Przy zastosowaniu tej metody zbadano również epidermę górnej strony liści różnych gatunków i linii hodowlanych pomidora zdrowego (fot. 9, 10) i epidermę z objawami wywołanymi przez grzyb *Oidium lycopersicum* (fot. 11-14). W odniesieniu do liści pomidora metoda ta pozwoliła na dokładne określenie następujących cech epidermy:

- liczba, kształt i wielkość włosków (fot. 9),
- liczba i budowa aparatów szparkowych (fot. 9, 10),
- wielkość i kształt oraz grubość ścian komórkowych komórek podstawowych epidermy (fot. 10, 13, 14),
- liczba nekrotycznych komórek i komórek zdrowych przypadająca na określoną powierzchnię widoczną w mikroskopie (fot. 11, 12),
- liczba, kształt i wielkość haustoriów grzyba obecnych w komórkach epidermy liścia gospodarza (fot. 13, 14).

Metoda ta w porównaniu z innymi, tradycyjnymi metodami stosowanymi do oceny porażenia liści lub liścieni roślin daje gwarancję pełnego obrazu zarodnikowania grzyba uwzględniając jednocześnie cechy charakterystyczne epidermy liścia żywiciela. Technika ta pozwala również na długotrwałe zabezpieczenie materiału (ok. 1 roku), co jest istotne przy testowaniu dużej liczby roślin w pracach hodowlanych i fitopatologicznych.

Fot. 1-4. Zarodniki grzyba *Pseudoperonospora cubensis* Berk i Curt, na powierzchni liścieni ogórka linii wrażliwej (fot. 1 i 2) oraz tolerancyjnej (fot. 3 i 4). Epiderma górna (fot. 1 i 3) oraz epiderma dolna (fot. 2 i 4) (x 120)

The spores of the fungus *Pseudoperonospora cubensis* Berk and Curt, on the surface of cucumber cotyledons of susceptible line (Fig. 1 and 2) and tolerant line (Fig. 3 and 4). Upper epidermis (Fig. 1 and 3) and lower epidermis (Fig. 2 and 4) (x 120)

Fot. 5-8. Struktura komórek epidermy liścieni ogórka linii wrażliwej (fot. 5 i 6) oraz tolerancyjnej (fot. 7 i 8). Epiderma górna (fot. 5 i 7), epiderma dolna (fot. 6 i 8) (x 450)
 The structure of epidermal cells of cucumber cotyledons from susceptible and tolerant line (Fig. 7 and 8).
 Upper epidermis (Fig. 5 and 7), lower epidermis (Fig. 6 and 8) (x 450)

Fot. 9-14. Komórki epidermy górnej strony liścia pomidora zdrowego (fot. 9 i 10) i z objawami mączniaka prawdziwego (fot. 11-14). a – aparat szparkowy, w – włoszek, h – haustorium, n – komórki nekrotyczne.

Fot. 9, 11, 12 (x 120); Fot. 10 (x 280); Fot. 13, 14 (x 450)

The surface of epidermis of upper side of healthy tomato leaf (Fig. 9 and 10) and with symptoms of powdery mildew (Fig. 11-14). a – stoma, w – hair, h – haustorium, n – necrotic cells

Fig. 9, 11, 12 (x 120); Fig. 10 (x 280); Fig. 13, 14 (x 450)

Streszczenie

Opracowano prostą i szybką do wykonania metodę izolowania i barwienia epidermy z liści i liścieni ogórka zdrowego i porażonego przez grzyb *Pseudoperonospora cubensis* Berk i Curt, oraz ze zdrowych i porażonych przez grzyb *Oidium lycopersici* Cook i Massee, liści pomidora. Epidermę z liścia zrywano przezroczystą taśmą klejącą typu Scotch i barwiono 2% błękitem toluidyny rozpuszczonym w 1% roztworze wodnym czteroboranu sodu. Metoda ta może służyć do określenia różnic w budowie epidermy liści zdrowych i porażonych grzybem, do oceny stopnia rozwoju grzybów na powierzchni epidermy, a także do określenia liczby i wielkości haustoriów obecnych w poszczególnych komórkach oraz liczby zarodników grzyba widocznych na badanej powierzchni liścia. Metoda ta pozwala na długotrwałe zabezpieczenie badanego materiału, co jest istotne przy testowaniu dużej liczby roślin w pracach hodowlanych i fitopatologicznych.

LITERATURA

- Dyki B., Sobolewski J., Staniaszek M., 1994. Biologia mączniaka prawdziwego pomidora. Materiały z sympozjum 30-lecia Instytutu Warzywnictwa, Integrowane metody produkcji warzyw, 1994 Skierniewice: 157-162.
- Habdas H., Staniaszek M., Doruchowski R.W., Łąkowska-Ryk E., 1994. Poszukiwanie cech markerowych w budowie anatomicznej linii hodowlanych ogórka warunkujących odporność na mączniaka rzekomego. Materiały z sympozjum 30-lecia Instytutu Warzywnictwa, Integrowane metody produkcji warzyw, 1994 Skierniewice: 45-48.
- Habdas H., Staniaszek M., Doruchowski R.W., Łąkowska-Ryk E., 1996. Anatomical and cytological mechanism of cucumber resistance and susceptibility to downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis* Berg and Curt). Proceeding of the VIth Eucarpia Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding, May 28-30, 1996, Málaga, Spain: 263-268.
- Kitroongruang N., Takei R., Kato M., Yamamoto K., 1991. Leaf amino acid contents, isozyme patterns, and anatomy of aphid resistant muskmelons. Memoirs of the College of Agriculture, Ehime University 1: 229-242.
- Misko L.A., Postnikova N.L., 1989. Histopathology of rose infected by *Peronospora sparsa* Berk. Mikologiya i Fitopatologiya 23: 84-90.
- Pavlenko E.P., 1991. Anatomical structure of the leaves in interspecific onion hybrids in relation to *Peronospora* resistance. Byulleten Glavnogo Botanicheskogo Sada 161: 58-67.
- Pavlenko E.P., 1993. Histometric analysis of elements of the periderm in leaves of interspecific onion hybrids in relation to resistance to *Peronospora destructor*. Byulleten Glavnogo Botanicheskogo Sada 167: 88-95.
- Schuman D.A., Staub J.E., Struckmeyer B.E., 1992. Morphological and anatomical comparisons between two *Cucumis sativus*, botanical varieties: hardwickii and sativus. Proceedings of the Fifth Eucarpia Cucurbitaceae Symposium, July 27-31, 1992 Skierniewice, Poland: 15-18.
- Yang S.L., Elilingboe A.H. 1972. Cuticle layer as a determining factor for the formation of mature appressoria of *Erysiphe graminis* on wheat and barley. Phytopath. 62: 708-714.