Wykorzystanie łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) do wykrywania *Pseudocercospora herpotrichoides* w pszenicy ozimej uprawianej w różnych systemach produkcji

EWA SOLARSKA, MAGDALENA GRUDZIŃSKA

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa, ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy
Solarz E., Grudzińska M. (Institute of Soil Science and Plant Cultivation, Czartoryskich 8, 24-100
Puławy, Poland). Use of polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Pseudocercospora*
herpotrichoides in winter wheat cultivated in different production systems.

(Otrzymano dn.15 czerwca 2002)

Summary

Pseudocercospora herpotrichoides was detected by PCR in winter wheat cultivated in different production systems in 2000 and 2001. In all tested systems only pathotype R of pathogen was detected. Detection of fungus depended on production system and weather conditions. Pathogen was not detected in both tested cultivars only in ecological system but only in season with less favourable conditions for disease development

Key words: *Tapesia yallundae*, *Pseudocercospora herpotrichoides*, early detection, PCR.

WSTĘP

Pseudocercospora herpotrichoides (Fron.) Deighton (teleomorfa: *Tapesia yallundae* Wallwork et Spooner) powoduje łamliwość źdźbła zbóż, głównie ozimych, a zwłaszcza pszenicy i pszenżyta. Choroba występuje we wszystkich rejonach uprawy zbóż. W warunkach wysokiej wilgotności na wyległych w wyniku porażenia przez *P. herpotrichoides* roślinach dochodzi do porażenia kłosów, a w konsekwencji do dalszej straty plonu i obniżenia jego jakości (Nicholson i in., 1994b). Wyróżnia

się dwa główne patotypy grzyba tj. typ-R i typ-W. Hodowane *in vitro* izolaty typu-R i W różnią się morfologicznie (C r e i g h t o n, 1989). Jednakże występują trudności w identyfikacji niektórych izolatów i wówczas konieczne jest przeprowadzenie testu patogeniczności na siewkach wybranych roślin żywicielskich. Testy na siewkach są czasochłonne, bowiem trwają od 10 do 16 tygodni i w celu dokładnej identyfikacji patotypów powinny być przeprowadzone na wystarczającym licznie materiale roślinnym oraz w kontrolowanych warunkach termicznych (H o l l i n s i n., 1985). Izolaty typu-W są istotnie bardziej patogeniczne dla pszenicy niż dla żyta, a typu-R są w równym stopniu patogeniczne dla obydwu roślin żywicielskich (S c o t t i n., 1980). Do połowy lat siedemdziesiątych typ-W dominował w Europie Zachodniej, a typ-R ograniczał się do rejonów, w których uprawiano żyto. Powszechne stosowanie fungicydów benzimidazolowych do zwalczania choroby spowodowało, że odporny na te fungicydy typ-R uzyskał znaczną przewagę na pszenicy (F i t t i n., 1988).

Do identyfikacji obydwu patotypów grzyba stosuje się również analizę DNA. Metoda SCAR (amplifikacja rejonów DNA o znanej sekwencji) pozwala na identyfikację DNA patogena w tkance roślinnej, gdyż startery specyficzne SCAR opracowane dla grzybów chorobotwórczych nie amplifikują roślinnego DNA (N i c h o l s o n i n., 1994a). Metodę tę wykorzystano do wykrywania obydwu typów patogenicznych *P. herpotrichoides* we wczesnych terminach na dwóch odmianach pszenicy ozimej uprawianej w różnych systemach produkcji.

MATERIAŁ I METODY

1. Materiał roślinny

Badania prowadzono w latach 2000-2001 na polach uprawnych pszenicy ozimej odmian Kobra i Roma, należących do Zakładu Doświadczalnego „Osiny” IUNG. Uwzględniono trzy systemy zmianowania odpowiadające trzem systemom gospodarowania oraz monokulturę pszenicy. W systemie ekologicznym zastosowano następstwo upraw: ziemniak, jęczmień jary z wsiewką, przez kolejne dwa lata koniczyna czerwona z trawą, pszenica ozima i poplon. W systemie integrowanym zastosowano zmianowanie: ziemniak, jęczmień jary z wsiewką, koniczyna czerwona, pszenica ozima, a w systemie konwencjonalnym zastosowano zmianowanie: rzepak, pszenicę ozimą, jęczmień jary. Z każdego pola reprezentującego oddzielny system uprawy pszenicy pobrano losowo po 30 roślin. Rośliny pszenicy znajdowały się w fazie krzewienia. Z każdej rośliny usuwano korzenie oraz górną część łodygi, a z uzyskanych fragmentów pędów o długości ok. 5 cm obejmujących podstawę pędu, izolowano DNA według procedury zalecanej przez producenta zestawu do wykrywania *Pseudocercospora herpotrichoides* typ W i R (firma ADGEN).

2. Ekstrakcja DNA

Tkanę roślinną po uprzednim zliofilizowaniu rozdrobniono bardzo dokładnie w młynku elektrycznym. Próbkę 2g tkanki roślinnej inkubowano przez 1,5 godziny w 65°C w 20 ml buforu ekstrakcyjnego CTAB (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl pH 8.0; 1.4 M NaCl; 20 mM EDTA) z dodatkiem 200ml 1M DTT w 50 ml

próbówkach. Po inkubacji próbki wirowano przez 15 minut przy 6000 obr./min. Uzyskany supernatant przeniesiono do nowej próbówki 50 ml, dodano 0.7 objętości zimnego izopropanolu i pozostawiono w temperaturze pokojowej przez 30 minut w celu wytrącenia DNA. Próbkę ponownie wirowano przez 15 minut przy 6000 obr./min. Uzyskany osad DNA przemywano 80% etanolem, suszono i rozpuszczano w buforze TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 100 mM EDTA).

3. Reakcja amplifikacji

Do 10 ml uzyskanego ekstraktu DNA dodawano 25 ml mieszaniny reakcyjnej pochodzącej z zestawu do wykrywania *P. herpotrichoides* typ W i R firmy ADGEN i dopełniano wodą redestylowaną do objętości 50 ml. W końcowym etapie dodawano 1 jednostkę Taq polimerazy (MBI Fermentas). Osobno przygotowano próbkę zawierającą kontrolny DNA.

Amplifikacja DNA przebiegała według schematu:

Denaturacja inicjująca 95°C przez 3 min.

5 cykli:

denaturacja 95°C przez 30 s

przyłączanie starterów 66°C przez 20 s

synteza 72°C przez 45 s

5 cykli:

denaturacja 95°C przez 30 s

przyłączanie starterów 64°C przez 20 s

synteza 72°C przez 45 s

25 cykli:

denaturacja 95°C przez 30 s

przyłączanie starterów 62°C przez 20 s

synteza 72°C przez 45 s

reakcja końcowa 72°C przez 5min.

Reakcję przeprowadzono w aparacie Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400.

4. Elektroforeza produktów amplifikacji.

10 ml produktów reakcji PCR analizowano w 1.5% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny. Jako marker wielkości użyto Gene Ruler 100 b.p. DNA Lader Plus (MBI Fermentas). Elektroforezę prowadzono w buforze 0.5xTBE, przy napięciu 250 V, przez 1,5 godziny.

WYNIKI

W sezonie wegetacji 2000 *P. herpotrichoides* wykrywano w systemach integrowanym i konwencjonalnym wyłącznie w roślinach odmiany Kobra, natomiast w monokulturze tylko w roślinach odmiany Roma. Nie wykrywano grzyba w systemie ekologicznym (tab. 1). W 2001 roku identyfikowano patogena w roślinach obydwu odmian w systemach ekologicznym i konwencjonalnym, natomiast w systemie integrowanym tylko w roślinach odmiany Roma, a w monokulturze tylko w roślinach odmiany Kobra. W obydwu latach badań identyfikowano wyłącznie patotyp R (rys. 1, tab. 1).

Tabela 1

Wyniki wykrywania *P. herpotrichoides* typu R przy użyciu testu PCR w pszenicy ozimej dwóch odmian uprawianych w różnych systemach produkcji

Table 1

Results of detection of R-type *P. herpotrichoides* by using PCR test in two cultivars of winter wheat cultivated in different production systems

Rok badań Year of studies	System uprawy Cultivation system							
	konwencjonalny conventional		integrowany integrated		ekologiczny ecological		monokultura monoculture	
	Roma	Kobra	Roma	Kobra	Roma	Kobra	Roma	Kobra
2000	-	+	-	+	-	-	+	-
2001	+	+	+	-	+	+	-	+

1 – monokultura, odm. Kobra
2 – system ekologiczny, odm. Kobra
3 – system integrowany, odm. Kobra
4 – system konwencjonalny, odm. Kobra
M – marker wielkości Gene Ruler 100 p.z. DNA Lader Plus
K – wzorcowy DNA o wielkości 380 p.z. odpowiadający patotypowi R *P. herpotrichoides*
i o wielkości 1100 p.z. odpowiadający patotypowi W patogena

1 – monoculture, cv. Kobra
2 – ecological system, cv. Kobra
3 – integrated system, cv. Kobra
4 – conventional system, cv. Kobra
5 – monoculture, cv. Roma
6 – ecological system, cv. Roma
7 – integrated system, cv. Roma
8 – conventional system, cv. Roma
M – molecular weight marker Gene Ruler 100 b.p. DNA Ladder Plus
K – standard DNA, fragment size 380 b.p. from R-type *P. herpotrichoides* and fragment size 1100 b.p. from W-type of pathogen

Rys. 1. Produkty PCR otrzymane po amplifikacji DNA izolowanego z roślin pszenicy uprawianej w różnych systemach w 2001 roku:

Fig. 1. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of DNA extracted from wheat plants cultivated in different production systems in 2001 year:

Różnice w wykrywalności patogena w roślinach poszczególnych odmian i systemów produkcji oraz między latami związane były z warunkami uprawy oraz pogody (tab. 1; rys. 2, 3). Bardziej sprzyjały rozwojowi grzyba warunki pogody panujące w okresie jesieni 2000 i wiosny 2001 ze względu na cieplejsze i wilgotniejsze miesiące grudzień i styczeń oraz bardziej wilgotny kwiecień (rys. 2, 3). W okresie mniej sprzyjającym porażaniu roślin tj. w sezonie jesień 1999 i wiosna 2000 jedynym systemem uprawy, w którym w żadnej z odmian nie wykryto *P. herpotrichoides* był system ekologiczny (tab. 1, rys. 2). W sezonie bardziej sprzyjającym występowaniu choroby w systemie ekologicznym stwierdzano występowanie patogena w obydwu odmianach (tab. 1; rys. 3).

Rys. 2 Średnie miesięczne temperatury powietrza i sumy opadów za okres X.1999 - IV.2000
Fig. 2 Average monthly air temperatures and sums of rainfall in period X.1999 - IV.2000

Rys. 3 Średnie miesięczne temperatury powietrza i sumy opadów za okres X.2000 - IV.2001
Fig. 3 Average monthly air temperatures and sums of rainfall in period X.2000 - IV.2001

DYSKUSJA

Zastosowana metoda diagnostyczna PCR jest bardzo czułym testem umożliwiającym wykrycie patogena występującego w ilościach nawet nanogramowych, natomiast nie daje możliwości oznaczenia biomasy grzyba w materiale roślinnym. Wysoka czułość metody pozwala stwierdzić obecność grzyba jeszcze przed pojawieniem się objawów choroby tj. w okresie krzewienia się pszenicy a co za tym idzie umożliwia zastosowanie racjonalnego programu ochrony.

Znaczny wpływ warunków pogody na występowanie choroby obserwowano wielu autorów (B o j a r c z u k, 1970; J a c z e w s k a, 1970; P e r r i n, 1977). Wpływ taki potwierdzono w niniejszych badaniach.

Wzrost udziału zbóż w zmianowaniu może negatywnie wpływać na plon ziarna w wyniku porażenia spowodowanego przez *Pseudocercospora herpotrichoides* (C l a r c s o n, 1981; J a c z e w s k a, 1991; N i c h o l s o n i n., 1994b).

Zmianowanie w którym pszenica ozima występowała najrzadziej zostało zaprojektowane w systemie ekologicznym i tylko w tym systemie w obydwu badanych odmianach nie stwierdzano obecności patogena w jednym z sezonów wegetacji.

Wyniki badań diagnostycznych wskazują na wyłączone występowanie patotypu R w pszenicy, co zbieżne jest z doniesieniami piśmiennictwa o dominacji odpornego na benzimidazole typu R w uprawach pszenicy w Europie (F i t t i n., 1988). 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 (N i c h o l s o n i n., 1994a).

LITERATURA.

- B o j a r c z u k J., 1970. Badania nad odpornością pszenicy ozimej na łamliwość źdźbła (*Cercospora herpotrichoides* Fron.). Hodowla roślin, aklimatyzacja i nasiennictwo cz.1, 14 (4): 27-341.
- C l a r c s o n J.D.S., 1981. Relationship between eyespot severity and yield loss in winter wheat. Plant Pathology 30: 729-735.
- C r e i g h t o n N.F., 1989. Identification of W-type and R-type isolates of *Pseudocercospora herpotrichoides*. Plant Pathology 38: 484-493.
- F i t t B.D.L., G o u l d s A., P o l l e y R.W., 1988. Eyespot (*Pseudocercospora herpotrichoides*) epidemiology in relation to prediction of disease severity and yield loss in winter wheat – a review. Plant Pathology 37: 311-329.
- H o l l i n s T.W., S c o t t P.R., P a i n e J.R., 1985. Morfology, benomyl resistance and pathogenicity to wheat and rye of isolates of *Pseudocercospora herpotrichoides*. Plant Pathology 34: 369-379.
- J a c z e w s k a A., 1991. Yield loss of winter wheat as influenced by the intensity of *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron.) attack. Phytopathol. Polonica 1 (XIII): 41-44.
- N i c h o l s o n P., R e z a n o o r H.N., 1994a. The use of random amplified polymorphic DNA to identify pathotype and detect variation in *Pseudocercospora*

herpotrichoides. Mycological Research 98 (1): 13-21.

Nicholson P., Rezanoor H.N., 1994b. DNA probe for R-type of eyespot disease of cereals *Pseudocercospora herpotrichoides*. In: Modern assays for plant pathogenic fungi: identification, detection and quantification. Eds: A. Schots, F.M. Dewey, R.P. Oliver, CAB International: 17-22.

Perrin P.W., 1977. Spore trapping under hot and humid conditions. Mycologia 63 (6): 1214-1218.

Scott P.R., Hollins T.W., 1980. Pathogenic variation in *Pseudocercospora herpotrichoides*. Annals of Applied Biology 78: 269-279.

Streszczenie

Obecność *Pseudocercospora herpotrichoides* wykryto w pszenicy ozimej uprawianej różnymi metodami w latach 2000 i 2001, przy zastosowaniu metody PCR.

Niezależnie od systemu produkcji pszenicy, wykryto jedynie patotyp R patogena. Obecność grzyba zależała także od warunków pogody. Nie wykryto go u obu badanych odmian pszenicy tylko przy ekologicznym systemie jej produkcji, ale jedynie w roku, w którym warunki nie sprzyjały rozwojowi grzyba.