

Received: 08.10.2015 / Accepted: 04.12.2015

Identification of strobilurin resistant strains of *Mycosphaerella graminicola* by PCR-RFLP

Identyfikacja szczepów *Mycosphaerella graminicola* odpornych na strobiluryny metodą PCR-RFLP

Katarzyna Pieczul*

Summary

Septoria leaf blotch caused by *Mycosphaerella graminicola* is one of the most important diseases of cereals. The pathogen belongs to species rapidly developing resistance to used fungicides. The increase of resistance of *M. graminicola* isolates to strobilurin in western Europe was already recorded in 2002, while in Poland about 10 years later. The aim of the study was to develop a PCR-RFLP (polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism) assay for the identification of mutation (G143A) in cytochrome b gene of *M. graminicola*, which confers resistance to strobilurin. The analysis enabled to distinguish strains of *M. graminicola* resistant and sensitive to strobilurin, and it can be used for rapid monitoring of *M. graminicola* resistance to this group of fungicides.

Key words: *Mycosphaerella graminicola*; strobilurin resistance; PCR-RFLP

Streszczenie

Septorioza paskowana liści pszenicy powodowana przez *Mycosphaerella graminicola* jest jedną z najważniejszych chorób zbóż. Patogen ją wywołujący należy do gatunków grzybów szybko nabywających odporność na stosowane substancje czynne fungicydów. Wzrost odporności *M. graminicola* na strobiluryny odnotowany był w Europie Zachodniej już w roku 2002, a w Polsce około 10 lat później. Celem badań było opracowanie analizy PCR-RFLP (polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism) umożliwiającej identyfikację mutacji w genie cytochromu b (G143A) warunkującej odporność na strobiluryny. Opracowany protokół diagnostyczny umożliwia identyfikację szczepów *M. graminicola* odpornych oraz wrażliwych na strobiluryny i może być wykorzystywany do szybkiego monitoringu populacji *M. graminicola* pod kątem odporności na tę grupę fungicydów.

Słowa kluczowe: *Mycosphaerella graminicola*; odporność na strobiluryny; PCR-RFLP

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Mikologii
Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań
*corresponding author: k.pieczul@iorpib.poznan.pl

Wstęp / Introduction

Septorioza paskowana liści pszenicy wywoływana przez *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Schröt (anamorfa *Septoria tritici* Rob. ex Desm.) należy do najgroźniejszych chorób pszenicy i pszenżyta. W sprzyjających warunkach pogodowych patogen rozwija się dynamicznie, co wymaga stosowania intensywniej ochrony chemicznej upraw (Eyal 1999). Do ograniczania nasilenia objawów septoriozy paskowanej liści pszenicy w Polsce zarejestrowanych jest szereg fungicydów należących do różnych grup chemicznych, w tym strobiluryny (QoI – quinone outside inhibitors). *M. graminicola* należy do patogenów, które szybko nabywają odporność na stosowane substancje czynne fungicydów. Większość doniesień o szczepach *M. graminicola* odpornych na strobiluryny pochodzi z krajów Europy Zachodniej (Fraaije i wsp. 2005). W Polsce wśród izolatów pochodzących z terenu Wielkopolski izolowanych w latach 2012–2013 odpornych lub wysoce odpornych na strobiluryny było do 30% badanych izolatów (Pieczul i Świerczyńska 2015). Częstość występowania izolatów *M. graminicola* odpornych na strobiluryny wzrasta wraz z intensywnością wykorzystywania tej grupy fungicydów w ochronie upraw (Torriani i wsp. 2008). Konsekwencją dominacji w populacji *M. graminicola* szczepów odpornych może być zanik skuteczności strobiluryn w zwalczaniu tego patogena.

Grzybobójcze działanie strobiluryn polega na hamowaniu procesów zachodzących w mitochondriach przez połączenie się z kompleksem cytochromowym bc₁, należącym do III kompleksu oddechowego. Powoduje ono zablokowanie transferu elektronów pomiędzy cytochromem b i c₁ oraz zahamowanie syntezy ATP (adenozynotryjfosforan) prowadzące do deficytu energetycznego w komórkach grzybów (Fernandez-Ortuno i wsp. 2008; Fisher i Meunier 2008). Mutacje punktowe pojawiające się w genie cytochromu b (*cytb*) są podstawową przyczyną nabywania przez grzyby odporności na strobiluryny (Fraaije i wsp. 2005; Bolton i wsp. 2013; Estep i wsp. 2013). Powodują one zmianę w sekwencji aminokwasów białka cytochromu b uniemożliwiającą lub osłabiającą przyłączenie do niego fungicydu. Dotychczas u różnych gatunków grzybów zostało opisanych kilka mutacji odpowiedzialnych za nabywanie odporności. U *M. graminicola* mutacja polegająca na zamianie w 143 pozycji kodonu glicyny alaniną (G143A) ma znaczenie dominujące (Fraaije i wsp. 2005; Fernandez-Ortuno i wsp. 2008; Elbekali i wsp. 2011; Bolton i wsp. 2013; Estep i wsp. 2013). Wśród innych przyczyn wzrostu odporności izolatów wymienia się m.in. zwiększoną aktywność alternatywnej oksydazy zastępującej funkcję blokowanego cytochromu b oraz działanie transportowych białek błonowych usuwających z wnętrza komórek grzybów szkodliwe substancje (Wood i Hollomon 2003; Ma i Michailides 2005; Deising i wsp. 2008; Fernandez-Ortuno i wsp. 2008).

Celem badań było opracowanie protokołu diagnostycznego opartego na analizie PCR-RFLP (polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism) umożliwiającego szybką identyfikację mutacji (G143A) w genie cytochromu b warunkującej odporność na strobiluryny u *M. graminicola*.

Materiały i metody / Materials and methods

Izolaty

Próby porażonej przez *M. graminicola* pszenicy i pszenżyta zbierane były w latach 2012–2015 na polach zlokalizowanych na terenie Wielkopolski. Izolację grzybów wykonywano ze świeżego materiału roślinnego. Z porażonych liści wycinano fragmenty o powierzchni 0,25 cm², które odkażano powierzchniowo w roztworze podchlorynu sodu (wybielacz ACE) przez 30 sekund. Po odkażeniu skrawki płukano dwukrotnie w sterylnej wodzie destylowanej, suszono ręcznikiem papierowym i wykładano na pożywkę WA (wodny agar). Po 2–5 dniach inkubacji w temperaturze pokojowej (około 21°C) z zarodnikujących na powierzchni liści piknidiów grzyba, za pomocą igły preparacyjnej pobierano zarodniki konidialne i sporządzano z nich wodną zawiesinę, którą rozprawdzano na płytce Petriego zawierającej pożywkę PDA (Potato Dextrose Agar, Difco). Wyrastające, jednozarodnikowe kolonie grzybów o cechach morfologicznych *M. graminicola* przeszczepiano na nową pożywkę PDA. Identyfikacji gatunkowej uzyskanych izolatów dokonywano na podstawie cech morfologicznych grzybni oraz zarodników konidialnych.

Badania odporności na strobiluryny

Badania wrażliwości izolatów *M. graminicola* na strobiluryny wykonano przez wyszczepienie fragmentów pożywki PDA (o powierzchni 0,25 cm²) przerośniętych 2-tygodniową grzybnią, na pożywkę PDA zawierającą azoksystrobinę, krezoksym metylu lub piraklostrobinę (Sigma) w stężeniu 1 ppm. Substancje czynne przed dodaniem do pożywki zostały rozpuszczone w metanolu, w stężeniu 5 mg/ml. Kontrolę stanowiły kolonie grzyba rosnące na czystej pożywce PDA. Po 14 dniach inkubacji w temperaturze pokojowej (około 21°C) izolaty mierzono i obliczano procentowy stopień hamowania ich wzrostu przez substancje czynne obecne w podłożu w stosunku do kontroli. Za izolaty o podwyższonej odporności uznawano te, których średnica osiągnęła minimum 50% wzrostu w stosunku do średnicy kolonii kontrolnej. Doświadczenie wykonano w 2 powtórzeniach.

Badania genetyczne

Do badań wytypowano 15 izolatów *M. graminicola* charakteryzujących się podwyższoną odpornością na strobiluryny oraz 5 izolatów całkowicie wrażliwych. Wszystkie izolaty zostały poddane analizie sekwencji fragmentu cytochromu b zawierającego miejsce mutacji G143A (dane niepublikowane).

Izolacja DNA. Izolację DNA przeprowadzono ze świeżej grzybni rosnącej na płynnej pożywce NB (Nutrient Broth, Oxoid). Odsączoną grzybnię (10 mg) przenoszono do probówki i dokładnie rozcierano w buforze APA (Novazym) z dodatkiem piasku kwarcowego za pomocą sterylnej mikrotłuczka. Izolację przeprowadzono według protokołu producenta (Novazym).

Reakcja PCR. Do analizy PCR przygotowano roztwór DNA o stężeniu 30 ng/μl. Do reakcji PCR zastosowano

startery StcbF1 i StcbR1 (Fraaije i wsp. 2005) pozwalające na amplifikację fragmentu DNA kodującego cytochrom b (*cytb*) o wielkości 1468 pz. Reakcję PCR przeprowadzono w mieszaninie reakcyjnej o końcowej objętości 20 µl, która zawierała: po 0,2 µl 10 mM starterów, 1 µl Dream Taq PCR Bufor (Fermentas), 0,2 µl dNTP mix (Fermentas), 0,05 µl Dream Taq Polimerase (Fermentas), 60 ng DNA. Zastosowano następujący profil termiczny reakcji PCR: wstępna denaturacja przez 4 min. w 94°C; 36 cykli obejmujących: denaturację 40 s w 94°C, hybrydyzację starterów 40 s w 50°C, elongację 90 s w 72°C; końcowa elongacja – 5 min. w 72°C. Uzyskany produkt PCR poddano trawieniu restrykcyjnemu (PCR-RFLP).

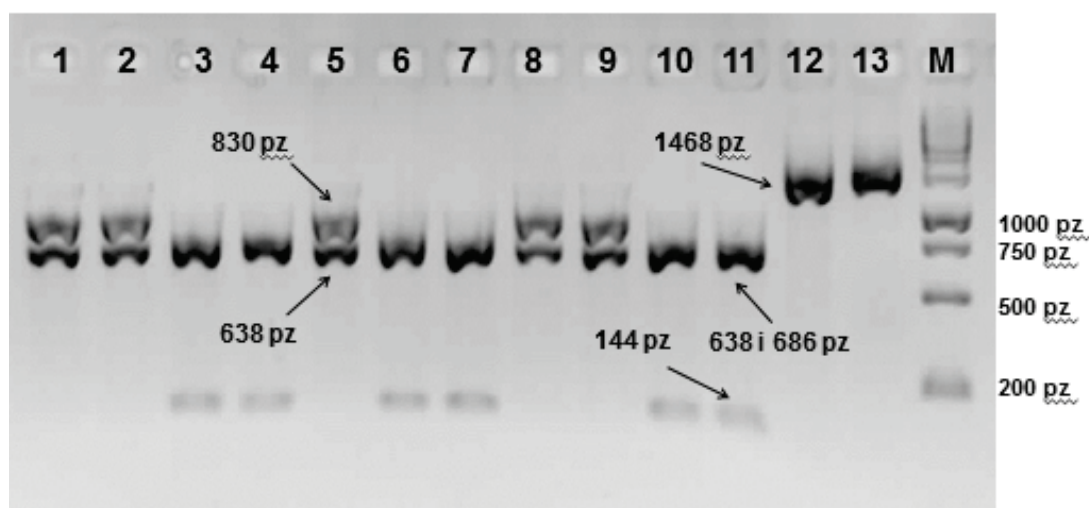
Trawienie restrykcyjne. Do trawienia produktu PCR wykorzystano enzym restrykcyjny Tse I (BioLabs). Enzym wybrany został na podstawie wcześniejszych badań różnic w sekwencji DNA genu cytochromu b izolatów odpornych oraz wrażliwych na strobiluryny przeprowadzonych w programie NEBcutter V 2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2>). Mieszanina reakcyjna składała się z 5 µl produktu PCR, 1 µl buforu NEB oraz 0,08 µl enzymu restrykcyjnego Tse I. Trawienie prowadzono w temperaturze 65°C przez 30 min. Produkty trawienia obserwowano w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika Midori Green (Thermo Scientific) w świetle UV po 1 godzinie i 2,5 godzinach rozdziału.

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Analiza sekwencji fragmentu cytochromu b polskich izolatów *M. graminicola* wykazała, że za wzrost odpor-

ności na strobiluryny odpowiada mutacja G143A (dane niepublikowane). Opracowany protokół diagnostyczny umożliwia szybką detekcję tej mutacji. Wykorzystany do trawienia restrykcyjnego produktu PCR enzym Tse I trawi DNA jedynie w miejscach o specyficznej sekwencji zasad 5'G/CWGC3' (W = A lub T). W badanym fragmencie DNA kodującym białko cytochromu b zidentyfikowane zostały dwa miejsca restrykcyjne. Jedno z nich jest miejscem neutralnym występującym zarówno u izolatów odpornych, jak i wrażliwych. Drugie miejsce restrykcyjne jest charakterystyczne jedynie dla izolatów *M. graminicola* odpornych na strobiluryny i jest markerem odporności na tę grupę fungicydów. Sekwencja zasad GGA (kodon glicyny) u szczepów *M. graminicola* odpornych na strobiluryny jest zastąpiona kodonem alaniny GCA (rozpoznawany przez enzym Tse I). W wyniku rozdziału elektroforetycznego produktów trawienia fragmentu DNA kodującego cytochrom b szczepów *M. graminicola* wrażliwych na strobiluryny obserwowano dwa produkty o wielkościach: 830 i 638 pz, a u odpornych 3 produkty o wielkościach: 144, 638 i 686 pz (rys. 1, 2). U niewielkiej części badanych izolatów wzrost odporności na strobiluryny nie był związany z mutacją G143A.

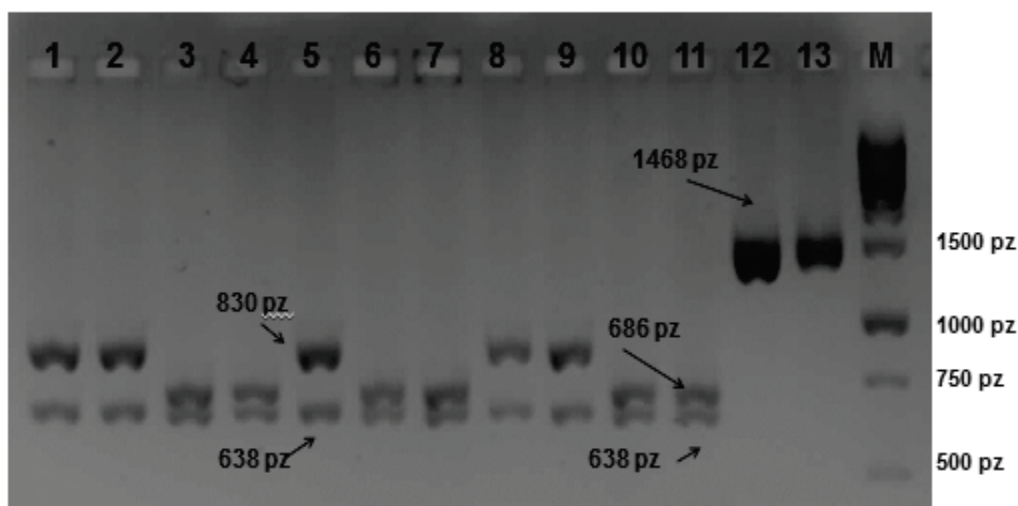
Badania prowadzone w kraju wskazują, że szczepy *M. graminicola* odporne na strobiluryny są obecne w Polsce przynajmniej od roku 2012. Niestety, zasięg prowadzonych badań został ograniczony jedynie do terenu Wielkopolski (Pieczul i Świerczyńska 2015). Zastosowanie analizy PCR-RFLP umożliwia szybką identyfikację szczepów *M. graminicola* odpornych na strobiluryny, bez konieczności wykonywania czasochłonnych testów pożywkowych. Może stwarzać to perspektywy dla precy-



3, 4, 6, 7, 10, 11 – produkt PCR trawiony enzymem Tse I – izolaty *Mycosphaerella graminicola* odporne na strobiluryny – PCR product digested by Tse I enzyme – isolates of *Mycosphaerella graminicola* resistant to strobilurin
1, 2, 5, 8, 9 – produkt PCR trawiony enzymem Tse I – izolaty *Mycosphaerella graminicola* wrażliwe na strobiluryny – PCR product digested by Tse I enzyme – isolates of *Mycosphaerella graminicola* sensitive to strobilurin
12, 13 – produkt PCR nietrawiony – not digested PCR product

Rys. 1. Analiza polimorfizmu miejsc restrykcyjnych izolatów *Mycosphaerella graminicola* odpornych oraz wrażliwych na strobiluryny (elektroforeza żelu 1 h)

Fig. 1. Analysis of polymorphic digestion sites of strains of *Mycosphaerella graminicola* resistant and sensitive to strobilurin (gel electrophoresis 1 h)



3, 4, 6, 7, 10, 11 – produkt PCR trawiony enzymem Tse I – izolaty *Mycosphaerella graminicola* odporne na strobiluryny – PCR product digested by Tse I enzyme – isolates of *Mycosphaerella graminicola* resistant to strobilurin
 1, 2, 5, 8, 9 – produkt PCR trawiony enzymem Tse I – izolaty *Mycosphaerella graminicola* wrażliwe na strobiluryny – PCR product digested by Tse I enzyme – isolates of *Mycosphaerella graminicola* sensitive to strobilurin
 12, 13 – produkt PCR nietrawiony – not digested PCR product

Rys. 2. Analiza polimorfizmu miejsc restrykcyjnych izolatów *Mycosphaerella graminicola* odpornych oraz wrażliwych na strobiluryny (elektroforeza żelu 2,5 h)

Fig. 2. Analysis of polymorphic digestion sites of strains of *Mycosphaerella graminicola* resistant and sensitive to strobilurin (gel electrophoresis 2.5 h)

zyjnej oceny skali zjawiska na terenie całego kraju. Badania wskazują, że w przypadku wzrostu częstości występowania szczepów *M. graminicola* odpornych na strobiluryny skuteczne zwalczanie septoriozy paskowanej liści pszenicy fungicydami z tej grupy chemicznej może stać się problemem także w Polsce. Wzrost odporności izolatów *M. graminicola* na strobiluryny w krajach Europy Zachodniej odnotowany był już na początku 21. wieku (Fraaije i wsp. 2005). Obecnie izolaty *M. graminicola* G143A stwierdzone są w nowych lokalizacjach, na przykład w Irlandii, Maroku oraz USA (Torriani i wsp. 2008; Elbekali i wsp. 2011; Estep i wsp. 2013).

Analiza PCR-RFLP jest prostą i stosunkowo niedrogą techniką, która może być wykorzystywana w laboratoriach wykonujących badania metodami biologii molekularnej. Warto podkreślić, że ze względu na ograniczoną liczbę enzymów restrykcyjnych analiza PCR-RFLP znajduje

zastosowanie w identyfikacji tylko części mutacji odpowiadających za nabywanie przez grzyby odporności na fungicydy. Analiza PCR-RFLP nie daje możliwości oceny innych zjawisk odpowiadających za zmiany odporności grzybów, takich jak wzrost ekspresji wybranych genów lub działanie białek transportowych, co jest przesłanką do dalszych badań.

Wnioski / Conclusions

1. Opracowany protokół diagnostyczny umożliwia identyfikację szczepów *M. graminicola* odpornych i wrażliwych na strobiluryny.
2. Analiza PCR-RFLP może być wykorzystywana do szybkiej diagnostyki szczepów z mutacją G143A warunkującą odporność na strobiluryny.

Literatura / References

- Bolton M.D., Riviera V., Secor G. 2013. Identification of the G143A mutation associated with QoI resistance in *Cercospora beticola* field isolates from Michigan, United States. *Pest Management Science* 69 (1): 35–39.
- Deising H.B., Reiman S., Pascholati S.F. 2008. Mechanism and significance of fungicide resistance. *Brazilian Journal of Microbiology* 39 (2): 286–295.
- Elbekali A.Y., Ramdani A., Siah A., Tisserant B., Deweer C., Hafidi M., Reignault P., Halama P. 2011. Detection of strobilurin-resistant isolates of *Mycosphaerella graminicola* in Morocco. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 76 (4): 715–719.
- Estep L.K., Zala M., Anderson N.P., Sackett K.E., Flowers M., McDonald B.A., Mundt C.C. 2013. First report of resistance to QoI fungicides in North American populations of *Zymoseptoria tritici*, causal agent of *Septoria tritici* blotch of wheat. *Plant Disease* 97 (11), p. 1511.
- Eyal Z. 1999. The *Septoria tritici* and *Stagonospora nodorum* blotch diseases of wheat. *European Journal of Plant Pathology* 105 (7): 629–641.

- Fernandez-Ortuno D., Tores J.A., de Vicente A., Perez-Garcia A. 2008. Mechanism of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. *International Microbiology* 11 (1): 1–9.
- Fisher N., Meunier B. 2008. Molecular basis of resistance to cytochrome *bcl* inhibitor. *FEMS Yeast Research* 8 (2): 183–192.
- Fraaije B.A., Burnett F.J., Clark W.S., Motteram J., Lucas J.A. 2005. Resistance development to QoI inhibitors in populations of *Mycosphaerella graminicola* in the UK. p. 63–71. In: “Modern Fungicides and Anti-Fungal Compounds IV” (H.-W. Dehne, U. Gisi, K.-H. Kuck, P.E. Russell, H. Lyr, eds.). British Crop Protection Council, Alton, UK.
- Ma Z., Michailides T.J. 2005. Advances in understanding molecular mechanism of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 24 (10): 853–863.
- Pieczul K., Świerczyńska I. 2015. Wrażliwość na fungicydy izolatów *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*). [Fungicide sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*) isolates]. *Progress in Plant Protection* 55 (3): 316–320.
- Torriani S.F., Brunner P.C., McDonald B.A., Sierotzki H. 2008. QoI resistance emerged independently at least 4 times in European populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Pesticide Management Science* 65 (2): 155–162.
- Wood P.M., Hollomon D.W. 2003. A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Qo site of complex III. *Pesticide Management Science* 59 (5): 499–511.