

IDENTYFIKACJA FITOPLAZM PORAZAJĄCYCH RZEPAK OZIMY W POLSCE

AGNIESZKA ZWOLIŃSKA, KRZYSZTOF KRAWCZYK,
ANNA MAĆKOWIAK-SOCHACKA, JOANNA KAMASA

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Wirusologii i Bakteriologii
Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań
a.zwolinska@iorpib.poznan.pl

I. WSTĘP

Fitoplazmy to małe organizmy komórkowe należące do królestwa Bacteria. Infekują setki gatunków roślin na świecie. W Polsce znane są z porażania plantacji drzew sadowniczych, takich jak jabłoni i grusza (Kamińska 2004) oraz plantacji roślin ozdobnych między innymi lilii i róż (Kamińska i Dziekanowska 2002; Kamińska i wsp. 2003). Przypadki wystąpienia fitoplazm w Polsce odnotowywano również na takich roślinach wieloletnich, jak: klon jesionolistny, jesion wyniosły, sosna zwyczajna (Kamińska i Śliwa 2006; Śliwa i wsp. 2008; Kamińska i Berniak 2009), żywotnik olbrzymi oraz na roślinach uprawnych – rzepak ozimy, groch zwyczajny czy pomidor zwyczajny. Jako pasożyty obligatoryjne, fitoplazmy są zaadaptowane do życia w dwóch niszach ekologicznych – w tkance łykowej roślin oraz w ciele owadów z grupy piewików (Fulgoromorpha, Cicadomorpha) i miodówek (Psyllidae), które przenoszą patogena na nowych żywicieli. Rozpoznanie epidemiologii fitoplazm w Polsce jest trudne, gdyż niewiele wiadomo na temat ich naturalnych gospodarzy – roślin dziko rosnących, które mogą służyć jako inokulum tych patogenów w ekosystemie. Rutynowa diagnostyka fitoplazm polega na wykonaniu reakcji PCR (polymerase chain reaction) ze specyficznymi starterami i odczycie sekwencji nukleotydów uzyskanego produktu. Często, z powodu niskiego miana komórek fitoplazmatycznych w roślinach, konieczne jest zastosowanie czulszych metod badawczych, tj. zagnieżdżonego PCR (ang. nested-PCR) lub qPCR.

Obserwacje prowadzone w latach 2009 i 2010, na polach rzepaku w stacjach badawczych w Winnej Górze, Strzelcach, Małyszynie i Borowie pokazały, że z roku na rok, w okresie około kwitnienia, na roślinach rzepaku ozimego pojawiają się deformacje dwóch typów. Są to charakterystyczne fyllodia kwiatów (zazielenianie się płatków kwiatowych – wirosencja, rozdęcia i powiększenia słupków) i staśmienia – zrosty podłużne łodyg, kwiatostanów i łuszczyń przy jednoczesnym zawiązywaniu kwiatów. Na podstawie kilkuletnich badań i obserwacji przenoszenia się z pokolenia na pokolenie zmian typu staśmienia, wysunięto hipotezę o ich genetycznym pochodzeniu, związanym z mutagennym wpływem fitoplazm na rośliny, w których bytują (Starzycki i Starzycka 2000).

Celem badań była identyfikacja fitoplazm na rzepaku ozimym z terenów stacji badawczych Wielkopolski, z uwzględnieniem dwóch typów obserwowanych deformacji oraz wstępna analiza porównawcza izolatów pochodzących z różnych lokalizacji.

II. MATERIAŁ I METODY

Próby porażonego rzepaku ozimego (*Brassica napus*) zbierano w 4 lokalizacjach – Winna Góra, Borowo, Strzelce, Małyszyn; w latach 2009 i 2010. Fitoplazmy identyfikowano przy pomocy metod molekularnych, izolując totalne DNA z zastosowaniem buforu CTAB (Maixner i wsp. 1995) lub kitu Qiagen (DNeasy Plant Maxi Kit), z roślin posiadających zmiany dwóch typów oraz roślin zdrowych, a następnie przeprowadzając zagnieżdżony PCR (ang. nested PCR) z parami starterów: P1/P7 i R16F2n/R16R2 (Schaad i wsp. 2001). Uzyskane produkty reakcji PCR sekwencjonowano i analizowano wirtualnie przy pomocy narzędzia internetowego NebCutter, pod kątem obecności wybranych miejsc restrykcyjnych. Sekwencję jednego z uzyskanych amplikonów P1/P7 (1,8 kpz), izolatu RzW14 z Winnej Góry, zamieszczono w banku genów (nr akcesyjny HM561990). Wyizolowane DNA fitoplazm pochodzących z poszczególnych lokalizacji, badano dalej pod kątem zróżnicowania genu *tuf*, trawiając produkt reakcji PCR ze starterami *tufAYf/tufAYr*, enzymami restrykcyjnymi: TaqI i HpaII, zgodnie z zaleceniami producenta.

III. WYNIKI I DISKUSJA

Fitoplazmy wykryto zarówno w roślinach wykazujących deformacje typu staśmień, jak i całkowite deformacje kwiatów prowadzące do niezawiązywania łuszczyn i powstawania fyllodiów; przy czym z prób pochodzących z roślin staśmionych znacznie rzadziej uzyskiwano wynik pozytywny na obecność DNA fitoplazmatycznego (tab. 1) i tylko przy zastosowaniu reakcji nested-PCR (rys. 1). Z prób roślin nie wykazujących objawów porażenia uzyskiwano wynik negatywny. Wszystkie sekwencje badanych

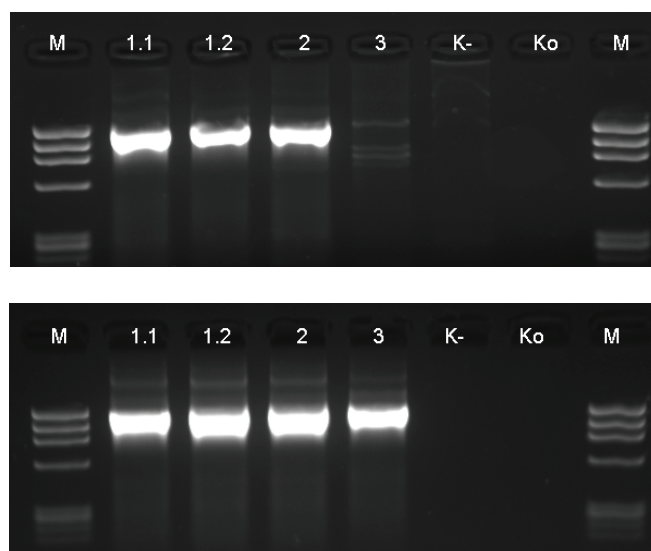
Tabela 1. Ilość pozytywnych prób przypadających na całkowitą ilość prób przebadanych z uwzględnieniem dwóch typów objawów

Table 1. Number of positive samples per total number of samples tested, including two types of symptoms

Lokalizacja (ilość badanych izolatów) Location (number of isolates tested)	Ilość izolatów uzyskanych z roślin ze staśmionymi łodygami (pozytywne/wszystkie) Number of isolates obtained from plants with fasciated stems (positive/all)	Ilość izolatów uzyskanych z roślin z fyllodiami Number of isolates obtained from plants with phyllodies
Winna Góra (9)	3/6	2/3
Strzelce (2)	0/1	1/1
Małyszyn (10)	2/7	3/3
Borowo (11)	–	9/11

izolatów fitoplazm były w 99% podobne do sekwencji fitoplazm z grupy żółtaczki astra (16Sr I), zdeponowanych w banku genów. Wirtualna analiza miejsc restrykcyjnych fragmentu DNA zakwalifikowała wszystkie badane izolaty fitoplazm do grupy 16Sr I-B. Analiza porównawcza RFLP genu *tuf* wybranych izolatów fitoplazm nie ujawniła żadnego zróżnicowania pomiędzy tymi izolatami. Są to jednak badania wstępne, wymagające rozszerzenia o większą ilość badanych prób.

W toku prowadzonych badań wykazano, że DNA fitoplazmatyczne jest wykrywane w 35% przypadków staśmionych roślin rzepaku, przy czym detekcja musi być oparta o dwie rundy reakcji PCR. Oznacza to, że komórki fitoplazm mogą być obecne w staśmieniacz w bardzo niewielkich ilościach, stąd potrzeba zastosowania bardzo czułych metod diagnostycznych. Podobne przeszkody w identyfikacji fitoplazm w Polsce napotykała prof. Kamińska w swoich badaniach (Śliwa i wsp. 2008).



Rys. 1. Wynik reakcji PCR. Górny żel – bezpośredni PCR ze starterami R16F2n/R16R2 (1,2 kb); dolny żel – nested PCR ze starterami R16F2n/R16R2, poprzedzony reakcją PCR ze starterami P1/P7. Próby 1.1, 1.2 i 2 – izolaty DNA pochodzące z roślin z objawami fyllodiów; próba 3 – izolat DNA pochodzący z rośliny staśmionej; M – marker mas molekularnych Φ X174

Fig. 1. Result of the PCR. Upper gel – a direct PCR with primers R16F2n/R16R2 (1.2 kb); lower gel – nested PCR with primers R16F2n/R16R2, preceded by PCR with primers P1/P7. Samples 1.1, 1.2 and 2 – isolate of DNA derived from plants with phyllody symptoms; sample 3 – isolate of DNA from fasciated plant; M – molecular mass marker Φ X174

IV. WNIOSKI

1. Fitoplazmy porażające rzepak ozimy w zachodniej Polsce należą do grupy żółtaczki astra, podgrupy B (16Sr I-B).

2. DNA fitoplazmatyczne wykrywa się w próbach pochodzących od roślin wykazujących deformacje typu fyllodia oraz rzadziej typu staśmienia. Nie wyklucza to możliwości powstawania trwałych dziedzicznych zmian w genomie rośliny porażonej fitoplazmą.
3. Analizowane izolaty fitoplazm, pochodzące z 4 lokalizacji, są ze sobą blisko spokrewnione, gdyż nie wykazały zróżnicowania w obrębie genu *tuf*.

V. LITERATURA

- Kamińska M. 2004. Choroby Roślin Ogrodniczych Powodowane przez Fitoplazmy. Wyd. Hortpress Sp. z o.o., Warszawa, 116 ss.
- Kamińska M., Berniak H. 2009. 'Candidatus Phytoplasma asteris' in *Fraxinus excelsior* and its association with ash yellows newly reported in Poland. *Plant Pathol.* 58, p. 788.
- Kamińska M., Dziekanowska D. 2002. Molecular evidence for the presence of aster yellows-related phytoplasma in lilies with leaf scorch and flower virescence. *J. Phytopathol.* 150: 90–93.
- Kamińska M., Śliwa H. 2006. First report of a decline of ashleaf maple (*Acer negundo*) in Poland, associated with 'Candidatus Phytoplasma asteris'. *Plant Pathol.* 55, p. 293.
- Kamińska M., Śliwa H., Malinowski T., Skrzypczak Cz. 2003. The association of aster yellows phytoplasma with rose dieback disease in Poland. *J. Phytopathol.* 151: 469–476.
- Maixner M., Ahrens U., Seemuller E. 1995. Detection of the German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procedure. *Eur. J. Plant Pathol.* 101: 241–250.
- Schaad N.W., Jones J.B., Chun W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. The APS, St. Paul, MN, 373 pp.
- Starzycki M., Starzycka E. 2000. Deformacje rodziców i potomstwa roślin rzepaku (*B. napus*) zakażonych przez *Phytoplasma* sp. *Rośliny Oleiste* 21: 399–408.
- Śliwa H., Kamińska M., Korszun S., Adler P. 2008. Detection of 'Candidatus Phytoplasma pini' in *Pinus sylvestris* trees in Poland. *J. Phytopathol.* 156: 88–92.

AGNIESZKA ZWOLIŃSKA, KRZYSZTOF KRAWCZYK,
ANNA MAĆKOWIAK-SOCHACKA, JOANNA KAMASA

IDENTIFICATION OF PHYTOPLASMA AFFECTING WINTER OILSEED RAPE IN POLAND

SUMMARY

In Poland, typical morphological deformations of winter oilseed rape (*Brassica napus*), indicating phytoplasma infection, have been sporadically observed since 2000. In 2009 and 2010, in Wielkopolska Region of Poland, research field surveys were conducted to identify phytoplasmas affecting winter oilseed rape. The diseased plants exhibited symptoms including phyllody of flowers, proliferation of axillary buds, reduction of leaf size and siliques malformations. The phytoplasma presence was confirmed by polymerase chain reaction (PCR) with phytoplasma-specific primers, sequencing and nucleotide sequence analysis. Phytoplasma infecting oilseed winter rape in Poland was identified as a 'Candidatus Phytoplasma asteris' (Aster yellow group, 16Sr I-B phytoplasma subgroup). Phytoplasmatic DNA was detected in plants with both types of symptoms.

Key words: phytoplasma, asteris, phyllody, oilseed rape