PRZECHOWYWANIE W CIEKŁYM AZOCIE BALONIKÓW PSZENICY WYPEŁNIONYCH TELIOSPORAMI *TILLETIA CARIES* (DC.) TUL. W KOLEKCJI MIKROORGANIZMÓW PATOGENICZNYCH DLA ROŚLIN

KRZYSZTOF KUBIAK, ANNA PUKACKA, MARIA RATAJ-GURANOWSKA

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań
K.Kubiak@iorpib.poznan.pl; anna.pukacka@gmail.com

I. WSTĘP

Bank Patogenów Roślin i Badania ich Bioróżnorodności (BPRiBiB) przy Instytucie Ochrony Roślin – Państwowym Instytucie Badawczym w Poznaniu powstał w 1994 roku. W jego kolekcji przechowywanych jest około 1 500 chorobotwórczych dla roślin grzybów należących do 212 gatunków. Wszystkie są patogenami fakultatywnymi. Znanych jest wiele sposobów przechowywania i konserwacji grzybów na sztucznych pożywkach. W BPR każdy patogen zabezpieczony jest co najmniej dwiema metodami (na pożywce pod warstwą oleju mineralnego, zliofilizowany, zamrożony do –78°C lub w ciekłym azocie do –196°C) (Rataj-Guranowska 2008). Różnorodność zastosowanych metod konserwacji umożliwia przechowywanie patogenów odmiennych gatunków z zachowaniem ich właściwości fizjologicznych, zwłaszcza patogeniczności przez wiele lat.

W Polsce istnieje potrzeba stworzenia kolekcji patogenów obligatoryjnych, których nie można hodować na pożywkach syntetycznych, a żywotność utrzymują tylko na roślinie żywicielskiej. Wiele z nich jest sprawcami groźnych chorób roślin m.in. rdzy, mączniaków, śnieci czy też głowni. W kilku polskich ośrodkach naukowych prowadzone są badania nad tymi grzybami. Są one jednak ograniczone ze względu na trudną dostępność tych patogenów oraz na problem zabezpieczenia ich na długi okres czasu. Większość grzybów obligatoryjnych utrzymuje się poprzez ciągłe pasażowanie na nowe rośliny, co powoduje zmiany fizjologiczne patogena oraz jest pracochłonne. Wysuszenie porażonych grzybem roślin lub ich fragmentów często powoduje zamieranie grzybni oraz organów przetrwalnikowych już po kilkudziesięciu dniach (np. teliospor rdzy) (Cunningham 1973). Optymalną metodą zabezpieczenia grzybów obligatoryjnych jest mrożenie w ciekłym azocie (–196°C). W ten sposób zakonserwowany patogen nie zmienia właściwości fizjologicznych, gdyż zahamowane zostają wszystkie procesy komórkowe (Smith 1982; Dahmen i wsp. 1983).

W BPRiBiB podjęto próbę zamrożenia w ciekłym azocie *Tilletia caries* (DC.) Tul. z pszenicy ozimej (sprawcy śnieci cuchnącej). Grzyb ten jest zaliczany do pasożytów bezwzględnych, gdyż pomimo zdolności tworzenia teliospor na pożywkach syntetycznych, zarodnikowanie poza żywym gospodarzem stanowi wyjątek (Hoffmann 1982).

II. MATERIAŁ I METODY

T. caries jest grzybem należącym do rodziny śnieciowatych (Tilletiaceae) porażającym pszenicę. Nie jest obecnie powszechnym patogenem w Polsce, jednak jego wystąpienie w dogodnych warunkach może spowodować poważne straty w plonie (Wiese 1987; Kubiak 2009). Wskutek infekcji dochodzi do całkowitego zniszczenia wnętrza ziarniaków. Powstają tzw. baloniki (sorusy) wypełnione zarodnikami grzyba (teliosporami). Baloniki mają gładką, matową powierzchnię. Po pęknięciu wysypują się z nich zarodniki o charakterystycznym zapachu śledzi (stąd nazwa choroby – śnieć cuchnąca).

W doświadczeniu wykorzystano pochodzące z 3 kłosów pszenicy ozimej, zebrane w 2008 roku baloniki wypełnione teliosporami *T. caries*. Po ocenie mikroskopowej zarodników część baloników poddano procesowi mrożenia, a pozostałe przechowywano w temperaturze pokojowej. Przed rozpoczęciem mrożenia baloniki umieszczono w trzech 1,8 ml probówkach kriogenicznych NUNC (3 powtórzenia) zawierających jako krioprotektant 10% roztwór glicerolu. Probówki zostały umieszczone w zamrażarce NICOOL LM10, gdzie z prędkością –1°C/min zostały zamrożone do –120°C przez 2 godziny. Tak przygotowane próby przełożono do fazy płynnej ciekłego azotu w dewarze XT34 – Taylor Wharton (–196°C).

Po 5 miesiącach przechowywania część prób została rozmrożona w łaźni wodnej o temperaturze 37°C. Baloniki osuszono, a teliospory wykorzystano jesienią 2009 roku do zanieczyszczenia zdrowych ziarniaków pszenicy ozimej odmiany Legenda przyjmując stosunek wagowy baloników do ziarna wynoszący 1 : 50. Uwolnione z baloników teliospory mieszano z ziarniakami pszenicy ozimej. Ziarno wysiano na mikropoletkach w kształcie koła o średnicy 26 cm. Dla każdego obiektu wysiewano po 20 ziarniaków w dwóch powtórzeniach. Wysiano również dwa obiekty kontrolne. Pierwszą kontrolę stanowiło ziarno zakażone mieszaniną teliospor nie przechowywanych w ciekłym azocie (nie mrożonych, a jedynie przechowywanych w temperaturze pokojowej) pochodzących z trzech kłosów, a drugą ziarno nie zakażone. W fazie dojrzałości martwej ziarna (Adamczewski i Matysiak 2005) na każdym mikropoletku przeprowadzono ocenę występowania objawów śnieci cuchnącej pszenicy. Następnie obliczono procent porażonych kłosów w ocenianej próbie.

III. WYNIKI I DYSKUSJA

Mrożenie w ciekłym azocie jest uznawane za najlepszą metodę przechowywania grzybów patogenicznych (Smith 1982). W wykonanym doświadczeniu teliospory ze wszystkich zamrożonych baloników zachowały zdolności patogeniczne (średnio na 8,9% kłosów na mikropoletku zaobserwowano objawy śnieci cuchnącej) (tab. 1). Jednak znacznie większy procent porażonych kłosów (46,5%) obserwowano na poletkach pszenicy, gdzie wysiano ziarniaki zakażone zarodnikami, które nie były mrożone. Na poletku kontrolnym z wysianym zdrowym ziarnem śnieć cuchnąca nie wystąpiła.

Uzyskane wyniki (tab. 1) wskazują na możliwość przechowywania teliospor *T. caries* w ciekłym azocie. Z danych literaturowych wynika, iż niektóre patogeny obligatoryjne np. *Puccinia* spp. najlepiej przeżywają proces mrożenia bez zastosowania krioprotektanta, przy bezpośrednim umieszczeniu materiału w ciekłym azocie (Cunningham 1973; Dahmen i wsp. 1983; Salustiano i wsp. 2008). Ponieważ bardzo istotnym czynnikiem przeżywalności w ten sposób przechowywanych patogenów jest proces mrożenia

Tabela 1. Porażenie kłosów roślin pszenicy ozimej, które wyrosły z ziarniaków zanieczyszczonych teliosporami *T. caries*
Table 1. Infection of ears of winter wheat plants grown from kernels contaminated with teliospores of *T. caries*

Lp. No.	Ziarniaki pszenicy Wheat kernels	Procent kłosów z objawami śnieci cuchnącej pszenicy Per cent of bunted ears
1.	zanieczyszczone teliosporami przechowywanymi w ciekłym azocie z kłosa nr 1 contaminated with teliospores maintained in liquid nitrogen from ear no. 1	5,6
2.	zanieczyszczone teliosporami przechowywanymi w ciekłym azocie z kłosa nr 2 contaminated with teliospores maintained in liquid nitrogen from ear no. 2	3,6
3.	zanieczyszczone teliosporami przechowywanymi w ciekłym azocie z kłosa nr 3 contaminated with teliospores maintained in liquid nitrogen from ear no. 3	17,5
4.	zanieczyszczone teliosporami (nie mrożonymi) z kłosów nr 1, 2, 3 contaminated with teliospores (not frozen) from ears no. 1, 2, 3	46,5
5.	nie zanieczyszczone teliosporami not contaminated with teliospores	0
NIR (0,05) – LSD (0.05)		25,150

i rozmrażania należałoby podjąć próbę modyfikacji zastosowanej metody, szczególnie jeśli chodzi o obecność krioprotektanta oraz szybkość mrożenia. W przeprowadzonym doświadczeniu patogeniczność teliospor *T. caries* przechowywanych w temperaturze pokojowej była większa, jednak zarodniki przechowywane w ten sposób tracą zdolności infekcyjne. Lowther (1950) stwierdził, że teliospory *T. caries* przechowywane w temperaturze pokojowej dobrze kiełkowały po pięciu latach, natomiast po jedenastu latach znacznie wolniej i w mniejszej liczbie. Mrożenie w ciekłym azocie umożliwia przechowywanie niektórych patogenów obligatoryjnych przez bardzo długi okres czasu (Dahmen i wsp. 1983; Salustiano i wsp. 2008).

W kolejnych latach planowane są doświadczenia z mrożeniem *Puccinia recondita* Dietel & Holw., *Urocystis occulta* (Wallr.) Rabenh. oraz *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. & Curtis) Rostov. do –196°C. Większości z nich nie można zabezpieczyć w warunkach pokojowych, ani wysuszyć, gdyż poza gospodarzem przeżywają bardzo krótko (od kilku dni do kilku miesięcy) (Cunningham 1973). Doniesienia literaturowe wskazują na dużą przeżywalność m.in. grzybów rdzawnikowych przechowywanych w ciekłym azocie (Cunningham 1973). Inne metody przechowywania biotrofów, takie jak wysuszanie (4–5°C), liofilizacja (5°C) oraz mrożenie do –18°C zabezpieczają patogeny na 1–8 lat i są bardziej zawodne (Anikster 1986).

IV. WNIOSKI

W przeprowadzonym doświadczeniu przechowywane przez 5 miesięcy teliospory *T. caries* zamrożone w ciekłym azocie wykazały właściwości patogeniczne, dlatego można zastosować metodę głębokiego mrożenia do konserwacji tego grzyba. Należy jednak podjąć próbę modyfikacji metody, a w kolejnych latach spróbować zabezpieczyć w BPRiBiB tą metodą inne gatunki grzybów obligatoryjnych, których nie można hodować na pożywkach syntetycznych.

V. LITERATURA

Adamczewski K., Matysiak K. 2005. Zboża. s. 15–19. W: „Klucz do określania faz rozwojowych roślin jedno- i dwuliściennych w skali BBCH" [K. Adamczewski, K. Matysiak – tłumaczenie i adaptacja]. Wyd. II, Inst. Ochr. Roślin, Poznań, 134 ss.

Anikster Y. 1986. Teliospore germination in some rust fungi. Phytopathology 76: 1026–1030.

Cunningham J.L. 1973. Preservation of rust fungi in liquid nitrogen. Cryobiology 10: 361–363.

Dahmen H., Straub Th., Schwinn F.J. 1983. Technique for long-term preservation of phytopathogenic fungi in liquid nitrogen. Phytopathology 73: 241–246.

Hoffmann J.A. 1982. Bunt of wheat. Plant Disease 66 (11): 979–986.

Kubiak K. 2009. Skuteczność i opłacalność stosowania zapraw nasiennych w zwalczaniu śnieci cuchnącej [*Tilletia caries* (DC.) Tul.] i śnieci gładkiej (*Tilletia laevis* Kühn). Prog. Plant Protection/Post. Ochr. Roślin 49 (3): 1298–1302.

Lowther C.V. 1950. Chlamydospore germination in physiologic races of *Tilletia caries* and *Tilletia foetida*. Phytopathology 40: 590–603.

Rataj-Guranowska M. 2008. Metody Przechowywania i Konserwacji Patogenów Roślin. Bogucki Wydawnictwo Naukowe, Poznań, 50 ss.

Salustiano M.E., Pozza E.A., Ferraz Filho A.C., Castro H.A. 2008. Viability of Puccinia psidii urediniospores stored in different environments. Trop. Plant Pathol. 33 (4): 313–316.

Smith D. 1982. Liquid nitrogen storage of fungi. Trans. Br. Mycol. Soc. 79 (3): 415–421.

Wiese M.V. 1987. Compendium of Wheat Diseases. Second edition. The APS, St. Paul, 112 pp.

KRZYSZTOF KUBIAK, ANNA PUKACKA, MARIA RATAJ-GURANOWSKA

LIQUID NITROGEN STORAGE OF WHEA T SORI WITH TELIOSPORES OF *TILLETIA CARIES* (DC.) TUL. IN PLANT PATHOGENS COLLECTION

SUMMARY

In Collection of Plant Pathogens in Poznan an attempt to freeze wheat sori with teliospores of *Tilletia caries* (DC.) Tul. in liquid nitrogen was carried out. This fungus almost never develops teliospores on synthetic media. In the experiment, winter wheat sori containing teliospores of *T. caries* were frozen to –196°C. After 5 months of storage in liquid nitrogen, wheat seeds were inoculated with the teliospores. For all experimental objects (except control object) common bunt was observed. Therefore, this method can be used to preserve *T. caries* but it requires modification, particularly with focus on the freezing rate and the presence of cryoprotectant.

Key words: *Tilletia caries*, common bunt, winter wheat, liquid nitrogen, storage