

Identification of benzimidazole resistant strains of *Cercospora beticola* by PCR-RFLP

Identyfikacja szczepów *Cercospora beticola* odpornych na benzimidazole metodą PCR-RFLP

Katarzyna Pieczuł, Jacek Piszczek

Summary

Cercospora leaf spot caused by the fungus *Cercospora beticola* is one of the most serious diseases of sugar beet. The widespread use of benzimidazoles to protect sugar beets led to increased incidence of resistant strains of *C. beticola*. The immediate cause of the resistance is a single mutation causing a substitution of amino acid in the β -tubulin protein. The aim of the study was to use PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism) analysis to identify benzimidazole sensitive and resistant strains of *C. beticola*. Applied studies enabled a precise and rapid identification of individual strains of *C. beticola*.

Key words: leaf spot of sugar beet, *Cercospora beticola*, benzimidazole resistance

Streszczenie

Grzyb *Cercospora beticola* wywołuje jedną z najgroźniejszych chorób liści buraka cukrowego – chwościka. Powszechne stosowanie do ochrony buraków substancji z grupy benzimidazoli spowodowało nasilenie częstości występowania odpornych szczepów *C. beticola*. Bezpośrednią przyczyną odporności jest pojedyncza mutacja powodująca zamianę jednego z aminokwasów w białku β -tubuliny. Celem badań było zastosowanie analizy PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism) do identyfikacji szczepów *C. beticola* odpornych oraz wrażliwych na benzimidazole. Zastosowane badania umożliwiły precyzyjną i szybką identyfikację poszczególnych szczepów *C. beticola*.

Słowa kluczowe: chwościk buraka, *Cercospora beticola*, odporność na benzimidazole

Institut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań
k.pieczul@iorpib.poznan.pl

Wstęp / Introduction

Grzyb *Cercospora beticola* Sacc. jest sprawcą jednej z najpoważniejszych chorób liści buraka cukrowego – chwościka. Choroba rozpowszechniona jest w wielu rejonach uprawy buraków na świecie, także w Polsce (Nowakowska i wsp. 1997, 1999; Holtschulte 2000). Porażenie roślin powoduje znaczne obniżenie wielkości i jakości plonu, co przekłada się na konieczność stosowania chemicznej ochrony upraw (Holtschulte 2000; Wolf i Verreet 2002). W ochronie buraka cukrowego przed chwościkiem przez wiele lat wykorzystywane były związki chemiczne z grupy benzimidazoli. Konsekwencją ich intensywnego stosowania stało się rozpowszechnienie występowania odpornych szczepów grzyba. Pierwsze izolaty *C. beticola* odporne na benzimidazole obserwowano w Europie już na początku lat 70. XX wieku, a w Polsce od 2001 roku (Campbell i wsp. 1998; Briere i wsp. 2001; Weiland i Halloin 2001; Piszczek 2004; Piszczek i Czekalska 2006). Obecnie *C. beticola* jest jednym z patogenów, u których odporność na benzimidazole jest obserwowana bardzo często, co właściwie powinno wykluczać stosowanie fungicydów z tej grupy chemicznej w ochronie buraka cukrowego przed chwościkiem.

Badania molekularne wykazały mutacje w genie β -tubuliny, które są bezpośrednią przyczyną występowania odporności na benzimidazole u różnych gatunków grzybów patogenicznych dla roślin uprawnych (Ma i Michailides 2005). Mutacje te powodują zmiany w sekwencji aminokwasów białka β -tubuliny grzybów wpływające na obniżenie wiązania przez β -tubulinę substancji aktywnych z grupy benzimidazoli (Davidse 1986). W przypadku *C. beticola* zidentyfikowana została dotychczas pojedyncza mutacja w genie β -tubuliny, w pozycji 198, prowadząca do zamiany kwasu glutaminowego alaniną u szczepów odpornych (Davidson i wsp. 2006). Szybka identyfikacja takich zmian jest możliwa przy zastosowaniu technik biologii.

Celem badań było zastosowanie analizy PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism) do identyfikacji szczepów *C. beticola* odpornych oraz wrażliwych na karbendazym i tiofanat metylu.

Materiały i metody / Materials and methods

Izolaty zbierane były w latach 2007–2009 na terenie centralnej i północnej Polski. Porażony materiał roślinny po odkażeniu powierzchniowym wykładany był na pożywkę PDA (Potato Dextrose Agar). Identyfikacji uzyskanych kultur *C. beticola* dokonywano na podstawie oceny cech morfologicznych kolonii i zarodników konidialnych (Ellis 2001).

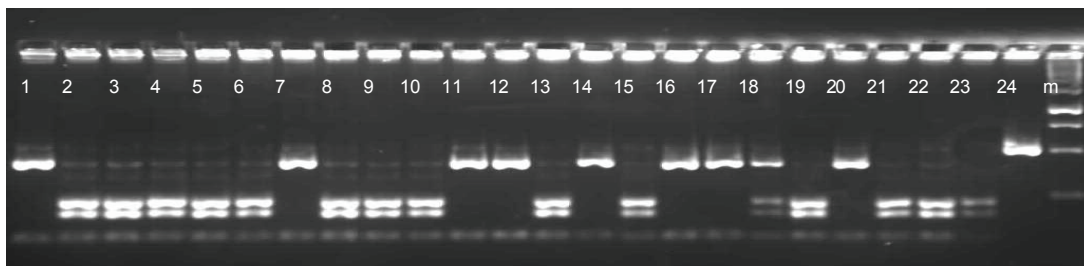
Izolaty przeznaczone do badań genetycznych wybrano na podstawie wyników testów laboratoryjnych określających stopień odporności na karbendazym i tiofanat metylu. Wykonano je na pożywkę PDA z dodatkiem fungicydów: Karben 500 SC i Topsin 500 SC, tak aby końcowa zawartość substancji aktywnej wynosiła 1 ppm (Karaoglanidis i wsp. 2000; Briere i wsp. 2001). Kontrolę

stanowiły kolonie grzyba rosnące na pożywkę PDA wolnej od fungicydów. Po 7 dniach inkubacji w temperaturze 25°C dokonywano pomiarów średnicy kolonii (Karaoglanidis i wsp. 2000). Wzrost liniowy grzybni badanych izolatów na podłożach z fungicydami wyrażano w procentach do wzrostu na podłożu kontrolnym. Izolaty pogrupowano według ich zdolności do wzrostu liniowego w stosunku do kontroli. W badaniach wykorzystano 90 izolatów *C. beticola*: 45 izolatów bardzo wrażliwych (0 do 20%) oraz 45 odpornych (60,1 do 80%) i bardzo odpornych (> 80%) na karbendazym i tiofanat metylu (Piszczek 2010).

Izolację DNA (deoxyribonucleic acid) przeprowadzono ze świeżej grzybni rosnącej na stałej pożywkę PDA przy użyciu zestawu „DNeasy Plant Mini Kit” (Qiagen). Fragmenty grzybni oddzielone od podłoża przenoszono do moździerza i rozcierano na jednolitą masę. Do analiz przygotowano roztwór DNA o stężeniu 20 ng/ μ l. W reakcji PCR (Polymerase Chain Reaction) zastosowano startery Bt 512F i Bt 922R (Davidson i wsp. 2006) pozwalające na amplifikację fragmentu DNA kodującego β -tubulinę o wielkości około 500 pz. Reakcję PCR przeprowadzono w mieszaninie reakcyjnej o końcowej objętości 20 μ l, która zawierała: po 0,2 μ l 10 mM starterów, 1 μ l Dream Tag PCR Bufor (Fermentas), 0,2 μ l dNTP mix (Fermentas), 0,05 μ l Dream Taq Polimerase (Fermentas), 40 ng DNA. Zastosowano następujący profil termiczny reakcji PCR: wstępna denaturacja przez 2 min w 94°C; 39 cykli obejmujących: denaturację 40 s w 95°C, hybrydyzację starterów 30 s w 62°C, elongację 40 s w 72°C; końcową elongację – 5 min w 72°C. Do trawienia powielonych fragmentów DNA stosowano enzym restrykcyjny Bsh 1236 I (Fermentas). Został on wybrany na podstawie analizy sekwencji genu β -tubuliny izolatów *C. beticola* wrażliwych oraz odpornych na karbendazym i tiofanat metylu (dane niepublikowane) przeprowadzonej w programie Nebcutter V 2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). Mieszanina reakcyjna zawierała 5 μ l produktu PCR, 1 μ l buforu R oraz 1 U enzymu restrykcyjnego (Bsh 1236 I). Trawienie prowadzono przez noc w 37°C. Produkty trawienia rozdzielano elektroforetycznie w 2,5% żelu agarozowym z bromkiem etydyny i analizowano w świetle UV.

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

W wyniku trawienia restrykcyjnego fragmentu DNA kodującego β -tubulinę (500 pz) szczepów *C. beticola* odpornych na benzimidazole obserwowano 3 fragmenty o wielkościach około 80, 220 oraz 200 pz, a w wyniku trawienia DNA szczepów wrażliwych dwa o wielkościach około 80 i 420 pz (rys. 1). Użyty do trawienia enzym restrykcyjny Bsh 1236 I rozpoznaje i trawi DNA wyłącznie w miejscu sekwencji zasad 5'...C G[^]C G...3'. Sekwencja zasad GCG jest kodonem alaniny, która u szczepów *C. beticola* odpornych na benzimidazole zastąpiła kwas glutaminowy (kodon GAG) w wyniku zamiany C – A w pozycji 198. Podwójne cięcie restrykcyjne badanego DNA obserwowane u izolatów *C. beticola* odpornych na benzimidazole może stanowić marker odporności na w/w związki. Uzyskane wyniki



2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 13, 15, 19, 21, 22, 23 – DNA izolatów *C. beticola* odpornych na benzimidazole – DNA of *C. beticola* strains resistant to benzimidazole; 1, 7, 11, 12, 14, 16, 17, 20, – DNA izolatów *C. beticola* wrażliwych na benzimidazole – DNA of *C. beticola* strains sensitive to benzimidazole; 24 – nietrawiony produkt PCR – non digested PCR product, m – marker wielkości – size marker

Rys. 1. Analiza polimorfizmu miejsc restrykcyjnych izolatów *C. beticola* odpornych oraz wrażliwych na benzimidazole
Fig. 1. Analysis of polymorphic digestion sites of *C. beticola* strains resistant and sensitive to benzimidazole

potwierdzają informacje zawarte w pracy Davidsona i wsp. (2006). Autorzy opisują badaną w niniejszej pracy mutację jako jedyną, która odpowiada za powstawanie odporności na benzimidazole u *C. beticola* na terenie Stanów Zjednoczonych. Także w Polsce, szczepy *C. beticola* zawierające opisaną mutację są powszechnie obserwowane, stanowiąc dodatkowe utrudnienie w efektywnej ochronie upraw. Zastosowanie opisanej analizy umożliwia szybkie rozpoznawanie szczepów odpornych na benzimidazole

i może być wykorzystywane do oceny zagrożenia upraw ze strony szczepów grzyba odpornych na benzimidazole.

Wnioski / Conclusions

Zastosowanie analizy RFLP umożliwia identyfikację szczepów *C. beticola* odpornych na benzimidazole i może być wykorzystywane do oceny częstości ich występowania na terenie Polski.

Literatura / References

- Briere S.C., Franc G.D., Kerr E.D. 2001. Fungicide sensitivity characteristics of *Cercospora beticola* isolates recovered from the high plains of Colorado, Montana, Nebraska, and Wyoming. Benzimidazole and triphenyltin hydroxide. J. Sugar Beet Res. 38: 111–120.
- Campbell L.G., Smith G.A., Lamey H.A., Cattanaach A.W. 1998. *Cercospora beticola* tolerant to triphenyltin hydroxide and resistant to tiophanate methyl in North Dakota and Minnesota. J. Sugar Beet Res. 35: 29–41.
- Davidse L.C. 1986. Benzimidazole fungicides: mechanism of action and biological impact. Annu. Rev. Phytopathol. 24: 43–65.
- Davidson R.M., Hanson L.E., Franc G.D., Panella L. 2006. Analysis of β -tubulin gene fragments from benzimidazole-sensitive and tolerant *Cercospora beticola*. J. Phytopathology 154: 321–328.
- Ellis M.B. 2001. More Dematiaceus Hyphomycetes. CABI Publishing, 248 pp.
- Holtshulte B. 2000. *Cercospora beticola* – worldwide distribution and incidence. p. 5–16. In: „*Cercospora beticola* Sacc. Biology, Agronomic Influence and Control Measures in Sugar Beet. Advances in Sugar Beet Research” (M.J.C. Ascher, B. Holtshulte, M.R. Molard, F. Rosso, G. Steinrücken, R. Beckers, eds). International Institute for Beet Research, Brussels, 215 pp.
- Karaoglanidis G.S., Ioannidis P.M., Thanassouloupoulos C.C. 2000. Reduced sensitivity of *Cercospora beticola* isolates to sterol-demethylation-inhibiting fungicides. Plant Pathol. 49: 567–572.
- Ma Z., Michailides T.J. 2005. Advances in understanding molecular mechanism of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. Crop Prot. 24: 853–863.
- Nowakowska H., Piszczek J., Włodarski J. 1997. Porażenie odmian buraka cukrowego przez *Cercospora beticola* w 1995 i 1996 roku w różnych rejonach uprawy. Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin 37 (2): 340–342.
- Nowakowska H., Piszczek J., Lewińska-Frymark L. 1999. Występowanie *Erysiphe betae* i *Cercospora beticola* w 1998 roku na buraku cukrowym w różnych rejonach kraju. Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin 39 (2): 848–851.
- Piszczek J. 2004. Odporność na fungicydy stosowane w uprawach buraka. Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin 44 (2): 1028–1031.
- Piszczek J. 2010. Epidemiologia chwościka buraka cukrowego (*Cercospora beticola*) w Centralnej Polsce. Rozpr. Nauk. Inst. Ochr. Roślin – PIB 23, 70 ss.
- Piszczek J., Czekalska A. 2006. Odporność chwościka buraka – grzyba *Cercospora beticola* Sacc. na fungicydy stosowane do jego zwalczania w Polsce. Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin 46 (1): 375–379.
- Wolf P.F.J., Verreet J.A. 2002. An integrated pest management system in Germany for the control of fungal leaf diseases in sugar beet: the IPM sugar beet model. Plant Dis. 86: 336–344.
- Weiland J.J., Halloin J.M. 2001. Benzimidazole resistance in *Cercospora beticola* sampled from sugarbeet fields in Michigan, USA. Can. J. Plant. Pathol. 23: 78–82.