

## Genetic diversity of *Rhizoctonia cerealis* isolates from western Poland

### Zróżnicowanie genetyczne izolatów *Rhizoctonia cerealis* pochodzących z zachodniej Polski

Ilona Świerczyńska, Katarzyna Pieczul

#### Summary

*Rhizoctonia cerealis* cause sharp eyespot, a common disease of cereals in Poland. The study was aimed at assessing the level of genetic diversity of *R. cerealis* isolates from the Wielkopolska region using RAPD (random amplification of polymorphic DNA) method. All isolates were identified by staining of nucleus in hyphal cells with a safranin solution. Genomic DNA (deoxyribonucleic acid) was extracted from fresh mycelium growing on NB (nutrient broth) liquid medium. The PCR (polymerase chain reaction) reaction was carried out using a series of RAPD primers. The isolates showed high level of genetic diversity. There was no correlation between the host plant, a place of origin of the isolates studied, and their RAPD profiles.

**Key words:** sharp eyespot, *Rhizoctonia cerealis*, genetic diversity, RAPD

#### Streszczenie

*Rhizoctonia cerealis* powoduje ostrą plamistość oczkową, powszechną w Polsce chorobę podstawy źdźbła zbóż. Przeprowadzone badania miały na celu poznanie zróżnicowania genetycznego izolatów *R. cerealis* pochodzących z terenu Wielkopolski za pomocą metody RAPD (random amplification of polymorphic DNA). Izolaty zostały zidentyfikowane na podstawie wybarwienia jąder komórkowych safraniną. Izolację DNA (deoxyribonucleic acid) przeprowadzono z grzybni rosnącej na pożywce NB (nutrient broth). Reakcję PCR (polymerase chain reaction) przeprowadzono z wykorzystaniem szeregu starterów RAPD. Badane izolaty wykazały wysoki poziom zróżnicowania genetycznego badanych izolatów. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy rośliną żywicielską i miejscem pochodzenia izolatów a ich profilami RAPD.

**Słowa kluczowe:** ostra plamistość oczkowa, *Rhizoctonia cerealis*, zróżnicowanie genetyczne, RAPD

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy  
Zakład Mikologii  
Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań  
i.swierczynska@iorpi.b.poznan.pl

## Wstęp / Introduction

*Rhizoctonia cerealis* Van der Hoeven (*Ceratobasidium cereale* D. Murray & L.L. Burpee) należy do podstawczaków. Patogen ten nie wytwarza zarodników konidialnych, a jego stadium doskonałe jest rzadko spotykane w naturze. Ze względu na różną ilość jąder komórkowych gatunki z rodzaju *Rhizoctonia* dzielą się na dwie grupy: gatunki dwujądrowe i gatunki wielojądrowe. Za pomocą wybarwiania jąder komórkowych można dokonać identyfikacji gatunku *R. cerealis*, który posiada po dwa jądra w każdej komórce (Hoeven i Bollen 1980).

Grzyb powoduje ostrą plamistość oczkową, powszechną w Polsce chorobę zbóż. Nazwa choroby pochodzi od charakterystycznych symptomów występujących na zakażonej roślinie. Typowe objawy choroby to ostro zakończone eliptyczne przebarwienia z wyraźnie zaznaczoną brunatną obwódką obserwowane na podstawie źdźbła roślin. Patogen może przetrwać jako grzybnia w szczątkach roślin lub w postaci sklerocjów w glebie. Nasilenie choroby w zasiewach zależy również od systemu uprawy (Colbach i wsp. 1997) oraz przebiegu pogody (Clarkson 1983).

Przeprowadzone badania miały na celu określenie poziomu zróżnicowania genetycznego izolatów *R. cerealis* pochodzących z zachodniej części Polski za pomocą metody RAPD (random amplification of polymorphic DNA).

## Materiały i metody / Materials and methods

Izolaty były zbierane na terenie Wielkopolski. Wszystkie pochodziły z naturalnie porażonych fragmentów podstawy źdźbła pszenicy, żyta i jęczmienia (tab. 1). Izolację z materiału roślinnego przeprowadzono według standardowej procedury. Wszystkie izolaty zostały zidentyfikowane mikroskopowo przez wybarwienie jąder komórkowych zasadowym roztworem safraniny. Szczepy dwujądrowe zostały oznaczone jako *R. cerealis*. Do badań wybrano 46 izolatów *R. cerealis* i 1 izolat *R. solani* (R 39). Wszystkie przeznaczone do badań izolaty hodowano na pożywce PDA (Potato Dextrose Agar). Z kultur 3-tygodniowych wycinano korkoborem 0,5 cm krążki i przenoszono na płynną pożywkę NB (nutrient broth) w szklanych probówkach. Tak przygotowane kultury umieszczano na wytrząsarce i hodowano w temperaturze 22°C aż do uzyskania ilości grzybni odpowiedniej do izolacji DNA.

Izolację DNA przeprowadzono z grzybni rosnącej na pożywce NB. Wykorzystano do tego celu zestaw do izolacji „DNeasy Plant Mini Kit” (Qiagen), izolację przeprowadzono według procedury producenta. Koncentrację otrzymanego DNA zmierzono przy użyciu spektrofotometru.

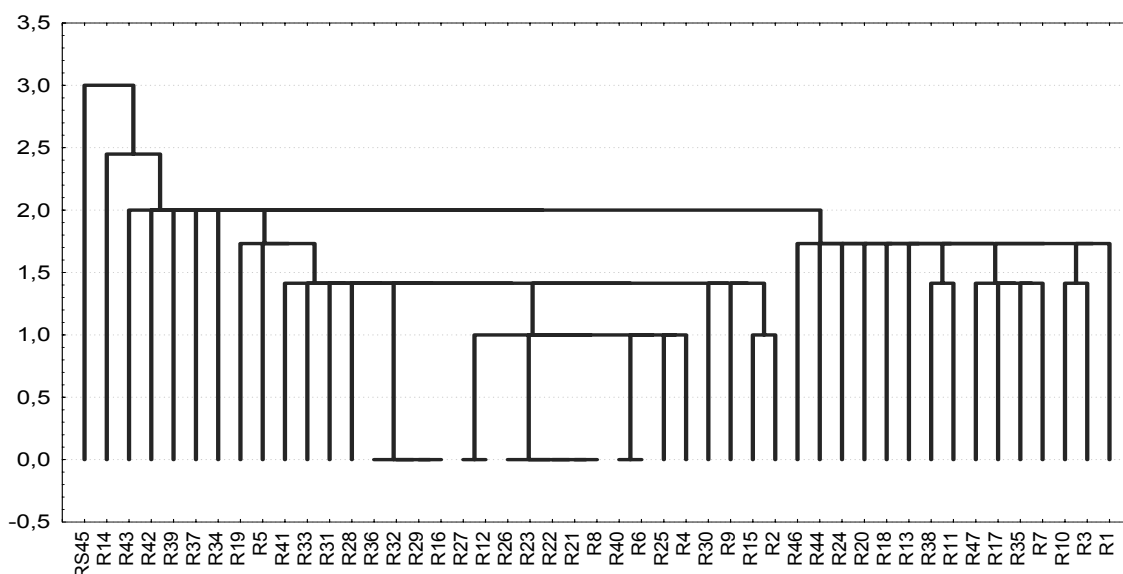
Tabela 1. Izolaty *R. cerealis* przeznaczone do badań  
Table 1. Isolates of *R. cerealis* intended for the study

Lp. No.	Numer izolatu Isolate number	Roślina żywicielska Host plant	Pochodzenie Origin	Lp. No.	Numer izolatu Isolate number	Roślina żywicielska Host plant	Pochodzenie Origin
1	R 1	pszenica – wheat	–	25	R 25	pszenżyto – triticales	Wojnowice
2	R 2	pszenica – wheat	Pawłowice	26	R 26	pszenżyto – triticales	Wojnowice
3	R 3	pszenica – wheat	Pawłowice	27	R 27	pszenżyto – triticales	Wąsowo
4	R 4	pszenica – wheat	Pawłowice	28	R 28	żyto – rye	Daleszyce
5	R 5	pszenica – wheat	Pawłowice	29	R 29	pszenżyto – triticales	Wąsowo
6	R 6	pszenica – wheat	Pawłowice	30	R 30	pszenica – wheat	Wojnowice
7	R 7	pszenica – wheat	Pawłowice	31	R 31	pszenica – wheat	Wojnowice
8	R 8	pszenica – wheat	Baborówko	32	R 32	jęczmień – barley	Wąsowo
9	R 9	pszenica – wheat	Baborówko	33	R 33	jęczmień – barley	Wąsowo
10	R 10	pszenica – wheat	Karnice	34	R 34	pszenica – wheat	Sokołowo
11	R 11	jęczmień – barley	Rzewnowo	35	R 35	pszenica – wheat	Pawłowice
12	R 12	pszenica – wheat	–	36	R 36	pszenica – wheat	Ostrówek
13	R 13	pszenżyto – triticales	Tomice	37	R 37	jęczmień – barley	Wąsowo
14	R 14	pszenżyto – triticales	Pniewy	38	R 38	pszenica – wheat	Rzeszów
15	R 15	pszenica – wheat	Separowo	39	R 39	rzepak – rape	–
16	R 16	pszenica – wheat	Jeziorki	40	R 40	pszenica – wheat	Pawłowice
17	R 17	pszenica – wheat	Pawłowice	41	R 41	pszenica – wheat	Pawłowice
18	R 18	pszenżyto – triticales	Konarzewo	42	R 42	pszenica – wheat	Zalipie
19	R 19	pszenica – wheat	Mikoszewo	43	R 43	pszenica – wheat	Łągowie
20	R 20	pszenica – wheat	Głubczyce	44	R 44	pszenżyto – triticales	Łągów
21	R 21	pszenica – wheat	Głubczyce	45	RS 45	pszenica – wheat	Łągowie
22	R 22	jęczmień – barley	Świdnica	46	R 46	pszenica – wheat	Łągowie
23	R 23	pszenica – wheat	Wschowa	47	R 47	pszenica – wheat	Łągowie
24	R 24	pszenica – wheat	–				

Do reakcji PCR (polymerase chain reaction) wykorzystano startery RAPD: OPA 04 (5-AATCGGGCTG-3), OPA 09 (5-GGGTAACGCC-3), OPA 13 (5-CAGCACCCAC-3) i OPJ 04 (5-CCGAACACGG-3). Każdą reakcję przeprowadzono dwukrotnie w mieszaninie reakcyjnej o objętości 12,5 µl zawierającej: 0,5 U polimerazy Taq i 1,25 µl 10 × bufor PCR (Fermentas), 200 mM mix dNTP, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,8 µM starter, 30 ng matrycowego DNA. Amplifikacja PCR została przeprowadzona zgodnie z programem: 2 min w 94°C; następnie 39 cykli: 1 min w 94°C, 1 min w 36°C, 1,5 min w 72°C, a na końcu 5 min w 72°C. Produkty PCR były rozdzielane na 1,5% żelu agarozowym zawierającym 0,25 µg/ml bromku etydyny i przez 6–7 go-

dzin pod napięciem 70 V. Otrzymane produkty PCR zostały ocenione i sfotografowane w świetle UV.

Analizę statystyczną przeprowadzono przy wykorzystaniu programu Statistica. Jako metodę klasyfikacji poszczególnych przypadków wybrano analizę skupień. Grupowanie dokonywano metodą aglomeracji pełnego wiązania. Produkt reakcji PCR-RAPD o określonej wielkości znajdujący się w pojedynczej linii traktowano jako pojedynczą cechę izolatu oznaczając jako 1, a jego brak jako 0. Analizę statystyczną przeprowadzono łącznie dla wszystkich starterów, a wyniki przedstawiono w formie dendrogramu (rys. 1).



Rys. 1. Podobieństwo genetyczne badanych izolatów *R. cerealis*

Fig. 1. The genetic similarity of tested *R. cerealis* isolates

## Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Badania genetyczne z wykorzystaniem technik PCR mają coraz szersze zastosowanie w diagnostyce grzybów. Mogą służyć m.in. do wykrywania obecności patogenów w próbie roślinnej jak i określania zróżnicowania genetycznego badanych patogenów (Nicholson i Parry 1996; Irzykowska i wsp. 2005). Badane izolaty wykazały wysoki poziom zróżnicowania genetycznego (rys. 1). Na podstawie przeprowadzonych analiz wyodrębnionych zostało 38 profili RAPD. Uzyskane wyniki potwierdzają obserwacje innych autorów dotyczących wysokiego stopnia różnorodności genetycznej izolatów *R. cerealis* (Irzykowska i wsp. 2005). Analiza statystyczna uzyskanych wyników rozdziałów elektroforetycznych produktów RAPD pozwoliła na podzielenie izolatów na grupy zawierające szczepy charakteryzujące się wyższym stopniem podobieństwa genetycznego. Największa grupa (III) zawiera 5 izolatów o takich samych profilach RAPD,

pochodzących z różnych lokalizacji geograficznych. Kolejna większa grupa (II) zawiera cztery izolaty pochodzące także z różnych miejsc. Pozostałe izolaty zostały sklasyfikowane jako odrębne – jedno- lub dwuelementowe grupy charakteryzujące się niższym stopniem podobieństwa genetycznego. Podobieństwo pomiędzy badanymi izolatami zostało przedstawione w postaci dendrogramu (rys. 1). Nie stwierdzono korelacji pomiędzy miejscem pochodzenia a rośliną żywicielską izolatów i ich profilem RAPD.

## Wnioski / Conclusions

1. Analiza danych RAPD wykazała wysoki poziom różnorodności pomiędzy testowanymi izolatami *R. cerealis*.
2. Nie stwierdzono korelacji między pochodzeniem i rośliną żywicielską izolatów a ich profilem genetycznym.

## Literatura / References

- Clarkson J.D.S. 1983. Effect of sharp eyespot (*Rhizoctonia cerealis*) on field loss in winter wheat. *Plant Pathol.* 32: 421–428.
- Colbach N., Lucas P., Cavelier N., Cavelier A. 1997. Influence of cropping system on sharp eyespot in winter wheat. *Crop Prot.* 16 (5): 415–422.
- Hoeven van der E.P., Bollen G.J. 1980. Effect of benomyl on soil fungi associated with rye. 1. Effect on the incidence of sharp eyespot caused by *Rhizoctonia cerealis*. *Neth. J. Plant Pathol.* 86: 163–180.
- Irzykowska L., Żółtańska E., Bocianowski J. 2005. Use of molecular and conventional techniques to identify and analyze genetic variability of *Rhizoctonia* spp. Isolates. *Acta Agrobot.* 58 (2): 19–32.
- Nicholson P., Parry D.W. 1996. Development and use of a PCR assay to detect *Rhizoctonia cerealis* the cause of sharp eyespot in wheat. *Plant Pathol.* 45: 872–883.