

JACEK PISZCZEK**MAŁGORZATA JEŻEWSKA**¹ Instytut Ochrony Roślin w Poznaniu, Terenowa Stacja Doświadczalna w Toruniu² Instytut Ochrony Roślin w Poznaniu

Określenie optymalnego okresu pobierania prób dla wykrywania BNYVV metodą ELISA w roślinach buraka pochodzących z plantacji podejrzanych o występowanie rizomanii

Determination of optimal sampling time for detection of BNYVV by ELISA in sugar beet plants from fields suspected of rhizomania occurrence

Warunki klimatyczne panujące w Polsce zwykle nie sprzyjają wystąpieniu wyraźnych objawów rizomanii na burakach cukrowych porażonych przez wirus nekrotycznego żółknięcia nerwów buraka (*Beet necrotic yellow vein virus*, BNYVV). W większości wypadków jedynym zauważalnym symptomem jest słabszy rozwój porażonych roślin oraz żółknięcie liści. Często zmiany takie przypisywane są innym czynnikom sprawczym, zwykle powiązanym ze zmiennością warunków glebowych i jej wilgotnością. Celem pracy było ustalenie optymalnego okresu pobierania prób do analiz ELISA na obecność wirusa BNYVV w roślinach buraka pochodzących z plantacji podejrzanych o występowanie choroby. Wypowano sześć plantacji buraka cukrowego w rejonach, w których wykrywano BNYVV w latach poprzedzających wykonanie powyższych badań. Próby pobierano w czterech terminach: III dekadzie lipca, II i III dekadzie sierpnia oraz II dekadzie września 2000 roku. Testowano sok z korzenia, liści sercowych oraz liści okółków zewnętrznych. Użyto koniugatów i surowic firmy Bio-Rad. Uzyskane wyniki wykazały, że im późniejszy był termin pobierania próby na badanych plantacjach, tym bardziej wzrastało prawdopodobieństwo wykrycia wirusa w roślinach. W kolejnych terminach uzyskano pozytywny wynik testu ELISA dla odpowiednio 65%, 80%, 93% i 100% pobranych roślin.

Słowa kluczowe: burak cukrowy, rizomania, termin pobierania prób

Climatic conditions in Poland are mostly unfavourable for development of characteristic rhizomania symptoms in sugar beet plants. In most cases, the limited growth and leaf yellowing are the only symptoms found in plants infected with BNYVV. Such symptoms are often confused with those caused by poor soil quality or water deficit. The aim of this work was to determine the optimal period for BNYVV diagnostics in plants originating from the fields suspected of rhizomania infestation. Samples were taken four times (III decade of July, II and III decade of August, II decade of September 2000) from six fields located near the sites on which the occurrence of BNYVV was recorded in earlier years. The samples for ELISA were extracts from root, plant heart, and the oldest leaves. Bio-Rad

products were used in the test. It was found that a frequency of positive readings increased from 65% in the first term of sampling up to 100% in the last one.

Key words: rhizomania, sampling term, sugar beet

WSTĘP

Burak cukrowy jest jedną z ważniejszych roślin uprawianych w wielu regionach świata, szczególnie w Europie. Intensywność jego uprawy powoduje, że ta roślina jest szczególnie narażona na oddziaływanie szeregu czynników chorobotwórczych i szkodników. Jednocześnie specyfika pozyskiwania korzeni jako surowca, ich transportu i przerobu, jest przyczyną bardzo łatwego rozprzestrzeniania się organizmów szkodliwych związanych ze środowiskiem glebowym. Przykładem takim jest rizomania — choroba wywoływana przez wirus nekrotycznego żółknięcia nerwów buraka (*Beet necrotic yellow vein virus*, BNYVV) przenoszony przez organizm glebowy, *Polymyxa betae*. Choroba ta w stosunkowo krótkim czasie rozprzestrzeniła się na wszystkie rejony uprawy buraka cukrowego w Europie (Richard-Molard, 1998). W Polsce po raz pierwszy wykryto i potwierdzono jej występowanie pod koniec lat osiemdziesiątych ubiegłego stulecia (Osińska i in., 1989). Na przełomie lat 80. i 90. rizomania występowała sporadycznie i nie stanowiła poważnego zagrożenia dla upraw buraków cukrowych (Jeżewska i in. 1991). Wiadomo, że czynnikami sprzyjającymi rozwojowi choroby są podwyższona wilgotność i temperatura (Asher i Blunt, 1987), a szczególnie nawadnianie (Tuitert i Hofmeester, 1994). Późna infekcja, spowodowana niekorzystnymi dla aktywności wektora warunkami (przedłużające się wiosną okresy o temperaturach poniżej 20°C) może spowodować, że choroba w ogóle nie wywoła na roślinach objawów makroskopowych (Schäufele, 1983). Z sytuacją taką często mamy do czynienia w Polsce. Buraki cukrowe porażone przez BNYVV wykazują szereg objawów chorobowych, z których większość jest mało specyficzna i może być spowodowana obecnością innych patogenów lub niedoborem składników pokarmowych w glebie (Müller, 1982). Na polach bez wyraźnych objawów choroby trudno jest na podstawie obserwacji makroskopowych podać przyczynę słabszego wzrostu buraków. Zwykle przyczyn upatruje się w błędach w nawożeniu, zróżnicowaniu podglebia i wilgotności gleby lub też nie znajduje się żadnych racjonalnych przesłanek, dla których obserwuje się daną sytuację na polu. Dopiero odpowiednie testy diagnostyczne, najpowszechniej stosowany jest test ELISA, pozwalają na stwierdzenie czy sprawcą takiego stanu rzeczy jest BNYVV — i wywoływana przez niego rizomania.

Celem naszej pracy było ustalenie optymalnego terminu pobierania prób do badań na obecność BNYVV metodą ELISA w roślinach buraka pochodzących z plantacji podejrzanych o występowanie rizomanii.

MATERIAŁ I METODY

Wytypowano 6 plantacji buraka cukrowego zlokalizowanych w 3 rejonach, w których przeprowadzano obserwacje polowe oraz, z których systematycznie pobierano próby: rejon I — Wielkopolska, 1. okolice Środy Wielkopolskiej; 2. Winnagóra

rejon II. — Kujawy, 1. Kusowo; 2. Strzelce Górne.

rejon III. — Pomorze, 1. Kosowo 1; 2. Kosowo 3.

Próby polowe pobierano 4-krotnie w następujących terminach:

T1 — III dekada lipca	Rej. I 27.07; Rej. II i III 26.07
T2 — II dekada sierpnia	Rej. I 11.08; Rej. II i III 14.08
T3 — III dekada sierpnia	Rej. I 31.08; Rej. II i III 21.08
T4 — II dekada września	Rej. I 14.09; Rej. II i III 10.09.

We wszystkich terminach z każdego pola pobierano po 10 roślin buraka z objawami nieprawidłowego rozwoju. BNYVV wykrywano według metody testu ELISA (Clark i Adams, 1977), niezależnie w 3 częściach każdej rośliny: w liściach zewnętrznych (najstarszych) i sercowych (najmłodszych) (Jeżewska i Piszczek, 2002) oraz w korzeniu (w strefie korzonków bocznych, do 1 cm w głąb skórki, w części wierzchołkowej).

Do testów używano koniugatów i surowic firmy Sanofi Phytodiagnostics (obecnie Bio-Rad). Za próby pozytywne uważano takie, w których uzyskiwano wynik pozytywny dla jednego z prowadzonych testów, tzn. gdy wirus wykryto w soku z liści lub korzeni badanych roślin.

WYNIKI

Obserwacje polowe

Stan roślin w trzech rejonach pobierania prób na poszczególnych plantacjach w kolejnych terminach był następujący.

Rejon I

— Plantacja w okolicy Środy Wielkopolskiej

T 1 (termin 1) — 27 lipca. Stan ogólny roślin był dobry. Nie stwierdzono wyraźnych objawów porażenia przez wirusy.

T 2 — 11 sierpnia. Stopniowe różnicowanie wyglądu roślin, zwłaszcza na brzegach pola były widoczne rośliny słabiej rozwinięte. Pojawiły się pierwsze objawy porażenia przez wirusy, nie tylko rizomanii, ale także mozaiki i żółtaczkę.

T 3 — 31 sierpnia. Objawy chorób nasiliły się. Zaobserwowano rośliny z objawami rizomanii, tzn. przejaśnień nerwów liści.

T 4 — 14 września. Obraz plantacji nie uległ większym zmianom.

— Plantacja w Winnejgórze

T 1 — 27 lipca. Stan ogólny roślin był dobry. Pojedyncze rośliny wykazywały objawy mozaiki i pofałdowań liści.

T 2 — 11 sierpnia. Liczba roślin z objawami powodowanymi przez wirusy uległa zwiększeniu.

T 3 — 31 sierpnia. Większość roślin wykazywała objawy silnego porażenia wirusami, co sprawiło, że stan ogólnej uprawy był raczej słaby. Korzenie główne były słabo rozwinięte.

T 4 — 14 września. Stan ogólny uprawy był słaby z powodu znacznego udziału roślin z objawami porażenia wirusami.

Rejon II

— Plantacja w Kusowie — Kujawy

T 1 — 26 lipca. Stan pola był bardzo nierówny, z widocznymi zagłębieniami terenu (wymokliska) i miejscami z silnie ugniecioną glebą. Na tych częściach pola stwierdzono rośliny wyraźnie gorzej rosnące o systemie korzeniowym silnie skróconym, typowym dla gleby o złej strukturze i podwyższonej kwasowości. Nie zanotowano różnic w wybarwieniu liści.

T 2 — 14 sierpnia. Ogólny widok pola nie uległ zmianie. Pojawiły się pierwsze przejaśnienia i żółknięcia liści, obejmujące części wierzchołkowe blaszek liściowych.

T 3 — 21 sierpnia. Widoczne było coraz wyraźniejsze żółknięcie blaszek liściowych od ich górnych brzegów, zanikające ku dołowi. Zaobserwowano zmiany kształtu liści sercowych na bardziej wydłużony oraz z nieznacznym pofałdowaniem blaszek liściowych.

T 4 — 10 września. Obraz był podobny do obserwowanego poprzednio - wyraźne żółknięcie liści oraz zmiany kształtu liści sercowych. Na przekrojach niektórych korzeni roślin ujawniło się ściemnienie wiązek przewodzących. Korzenie były twardsze przy krojeniu.

— Plantacja w Strzelcach Górnych

T 1 — 26 lipca. Występowało zróżnicowanie roślin na skutek nierównomiernych wschodów. Część roślin była wyraźnie słabsza, z objawami niedokarmienia.

T 2 — 14 sierpnia. Zanik zróżnicowania w wielkości roślin.

T 3 — 21 sierpnia. Obraz plantacji w zasadzie nie uległ zmianom. Zaobserwowano rośliny z dużą liczbą korzeni bocznych.

T 4 — 10 września. Buraki nie wykazywały objawów porażenia przez wirusy.

Rejon III

Plantacja 1 w Kosowie — Pomorze. Na polu, na którym prowadzono obserwacje, buraki nie były uprawiane od ponad 15 lat.

T 1 — 26 lipca. Na plantacji placowo widoczne były rośliny nieco wolniej rosnące, o mniejszych korzeniach, z liśćmi o słabszym zielonym wybarwieniu.

T 2 — 14 sierpnia. Różnice w wybarwieniu roślin pogłębiły się, obszary ich występowania przybrały wyrazisty kształt wydłużonych placów. Na niektórych korzeniach widoczne były „brody” korzeniowe.

T 3 — 21 sierpnia. Żółknięcie liści stwierdzono u większej liczby roślin. Na przekroju korzeni wiązki przewodzące wyraźnie widoczne i stwardniałe.

T 4 — 10 września. Niemal na całej powierzchni pola występowały rośliny pożółkłe, wielkość korzeni były zróżnicowane. Ogólna kondycja roślin była dobra, wskazująca na uzyskanie wysokiego plonu.

— Plantacja 2 w Kosowie

T 1 — 26 lipca. Objawy na roślinach były podobne do obserwowanych na plantacji 1 w Kosowie, dodatkowo zauważono pierwsze zmiany pokroju liści sercowych.

T 2 — 14 sierpnia. Przeciwnie niż na plantacji 1, nieliczne pożółkłe rośliny obserwowano jedynie na obrzeżu pola.

T 3 — 21 sierpnia. Pojawiły się pierwsze wyraźne objawy chorobowe na liściach; żółknięcie wiązek przewodzących, deformacje blaszek liściowych (pofałdowania). Na korzeniach były widoczne wyraźne brody. Na przekroju korzeni widoczne były wyraźne

pociemniałe wiązki przewodzące. Rośliny o opisanych objawach rosły pomiędzy roślinami z pozoru zdrowymi.

T 4 — 10 września. Objawy na plantacji nie uległy większym zmianom. Zanotowano więcej roślin o pożółkłych blaszkach liściowych, ale bez dodatkowych symptomów chorobowych.

Badania laboratoryjne

Ogółem przebadano 240 roślin buraka zebranych z wytypowanych 6 plantacji. Przy uwzględnieniu trzech części rośliny: liście zewnętrzne, liście wewnętrzne i korzeń, analizie poddano 720 prób.

Obecność BNYVV wykryto w 203 roślinach uznając za porażoną przez wirus, gdy wynik dodatni uzyskano dla dowolnej, testowanej części rośliny. Stanowiło to 84,6% ogólnej liczby badanych roślin. Wyniki dotyczące obecności BNYVV w próbach pobranych w czterech terminach z sześciu plantacji buraka zamieszczono w tabeli 1.

Tabela 1

Obecność BNYVV w roślinach pobranych z sześciu plantacji buraka w czterech terminach
Presence of BNYVV in sugar beet plants collected from 6 plantations in four terms

Lokalizacja Location	Liczba roślin z wykrytą obecnością BNYVV Number of plants infected by BNYVV			
	termin pobierania prób — sampling term			
	III dekada lipca III decade of July	II dekada sierpnia II decade of August	III dekada sierpnia III decade of August	II dekada września II decade of September
Środa Wlkopolska	6	9	10	10
Winnagóra	9	8	9	10
Kusowo	10	8	10	10
Strzelce G.	3	8	10	10
Kosowo I	7	7	7	10
Kosowo II	4	8	10	10
Ogółem Total	39 (65%)	48 (80%)	56 (93%)	60 (100%)

Najwyższą wykrywalność wirusa uzyskano w ostatnim teście, tzn. badając próby roślin pobrane w najpóźniejszym, wrześniowym terminie. Zdecydowanie zbyt wczesny okazał się pierwszy termin pobierania prób, tzn. trzecia dekada lipca. Obserwowany efekt był spowodowany stopniowym wzrostem liczby infekcji zachodzących w trakcie sezonu wegetacyjnego. Testy wykazały również, że na plantacjach, na których stwierdzano makroskopowo słabe i mało specyficzne objawy choroby (Kusowo, Strzelce Górne i Kosowo 1), BNYVV wykryto we wszystkich roślinach pobranych w II dekadzie września.

WNIOSEK

1. Najwyższą wykrywalność BNYVV w roślinach buraka stwierdzono przy pobieraniu prób w ostatniej dekadzie sierpnia i we wrześniu.

LITERATURA

- Asher M. J. C., Blunt S. J. 1987. The ecological requirements of *Polymyxa betae*. Proc. 50th Winter Congress of IIRB, Brussels, 11–12 Feb. 45 — 55.
- Clark M. F., Adams A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34: 475 — 483.
- Jeżewska M., Maćkowiak D., Wójtowicz A. 1991. Problem rizomanii w świetle badań nad występowaniem wirusa — sprawcy tej choroby (BNYVV) na plantacjach buraka cukrowego w niektórych rejonach Polski. Hod. Rośl. Nasien. 2: 19 — 22.
- Jeżewska M., Piszczek J. 2001. Surprisingly high frequency of the detection of Beet necrotic yellow vein virus in sugar beet leaves by ELISA. Phytopathol. Pol. 21: 165 — 170.
- Müller H. J. 1982. Rizomania in Österreich im Anbaujahr 1981. Zuckerind. 107 (11), 1037 — 1041.
- Osińska B., Szymczak-Nowak J., Nowakowska H., Paczuski R. 1989. Rizomania i jej występowanie w Polsce. Ochrona Roślin 8, 3 — 4.
- Schäufele W. R. 1983. Die Viröse Wurzelbärtigkeit (*Rhizomania*) — eine ernste Gefahr für den Rübenanbau. Gesunde Pflanzen 35 (9): 269 — 274.
- Richard-Molard M. R. 1998. Rhizomania — Development en Europe Occidental. Proceedings of Symposium „Rhizomania in Europe” Budapest 16–17 September 1998: 29 — 41.
- Tuitert G., Hofmeester Y. 1994. Epidemiology of beet necrotic yellow vein virus in sugar beet at different initial inoculum levels in the presence or absence of irrigation: disease incidence, yield and quality. Eur. J. Plant Pathology 100 (1): 19 — 53.