

BARBARA WIEWIÓRA¹**MARIA PRONCZUK**²¹ Zakład Nasiennictwa i Nasionoznawstwa² Samodzielna Pracownia Traw i Roślin Motylkowych
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików

Porównanie metody mikroskopowej i immunologicznej do wykrywania grzybów endofitycznych w nasionach traw

Comparison of aniline blue staining and immunoblotting methods for detecting endophytic fungi in grass seeds

Porównano efektywność, pracochłonność i koszty dwóch metod do wykrywania grzybów endofitycznych w nasionach traw: mikroskopową z barwieniem błękitem anilinowym i immunologiczną. Materiałem do badań było 17 prób nasion pobranych z odmian, rodów i ekotypów kostrzewy łąkowej, kostrzewy czerwonej, życicy trwałej i śmiałka darniowego. Otrzymano wyniki porównywalne dla zasiedlenia nasion przez endofity przy zastosowaniu obu metod. Stwierdzono, że analiza nasion metodą barwieniową jest bardzo pracochłonna i długotrwała, ponieważ wymaga wielogodzinnych obserwacji przy użyciu mikroskopu, dużego doświadczenia w rozpoznawaniu grzybni *Neotyphodium* oraz odpowiednich warunków pracy (wyciąg), zapewniających bezpieczeństwo dla zdrowia osoby przygotowującej materiał do analizy. Metoda immunologiczna jest łatwa, szybka i mało pracochłonna, ale kosztowna ze względu na drogi zestaw odczynników sprowadzanych z USA.

Słowa kluczowe: błękit anilinowy, grzyby endofityczne, metoda mikroskopowa, metoda immunologiczna, nasiona traw

The objective of the study was to compare the efficiency of and the input of labour and money in aniline blue staining and immunoblotting assays used to identify endophytic fungi infesting grass seed. Seeds of 17 cultivars, strains and ecotypes of meadow fescue (*Festuca pratensis* L.), red fescue (*F. rubra* L.), perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and tufted hairgrass (*Deschampsia caespitosa* (L.) P. Beauv.) were tested. Detectability of endophytes using the two methods was comparable. However, the aniline blue staining was found to be a very laborious and time-consuming method. Moreover, great experience of the researcher is needed to recognize the endophyte mycelium under the microscope. Furthermore, the method requires additional laboratory equipment to protect the staff against the harmful effects of some reagents. The immunoblotting method is comparatively more expensive, but it is evidently easier and less labour- and time-consuming.

Key words: aniline blue, endophytic fungi, grass seed, immunoblot method, staining method

WSTĘP

Endofitami nazywane są mikroorganizmy, które część lub całe swoje życie zasiedlają bezobjawowo tkanki swoich gospodarzy (Petroni, 1986). Gospodarzami endofitów — grzybów z rodzaju *Neotyphodium*, są często trawy. Grzyby te przenoszone są z nasionami, a ich grzybnia zasiedla warstwę aleuronową ziarniaków (White, 1987; Siegel i in., 1985). Ponieważ zasiedlone ziarniaki nie posiadają zewnętrznych objawów, poszukiwane są efektywne i szybkie metody diagnostyczne (Prończuk, 2005). Znanych jest wiele metod służących do wykrywania endofitów np. izolacja grzybów *Neotyphodium* z ziarniaka (Bacon i White, 1994), badanie zawartości wytwarzanych przez nie alkaloidów (Belesky i in., 1987), wybarwienie grzybni *Neotyphodium* spp. błękitem anilinowym (Welty i Rennie, 1985) lub różem bengalskim (Saha i in., 1988), metoda fluorescencyjna (Dapprich i in., 1994), metoda immunologiczna (Hill i in., 2002) oraz metody molekularne (Liu i in., 1995; Doss i Welty, 1995). Powyższe metody różnią się pracochłonnością, kosztami i efektywnością wykrywania żywej grzybni. Hahn i wsp. (2000 a) podają, że jedynie metoda fluorescencyjna, izolacja grzybów z ziarniaka oraz badanie zawartości alkaloidów są zdolne wykryć żywą grzybnię *Neotyphodium* w nasionach traw.

Współżycie endofitów z trawami ma ujemne i dodatnie aspekty, dlatego jest niezbędne zarówno w hodowli traw, jak i w ocenie odmian, stosowanie szybkich i pewnych metod wykrywania tych grzybów w nasionach. Międzynarodowy Związek Oceny Nasion (ISTA) poleca dwie metody diagnostyczne: barwieniową opracowaną przez Welty i Rennie (1985) oraz immunologiczną przygotowaną przez Hilla (ISTA, 2005).

Celem pracy było porównanie efektywności, pracochłonności i kosztów związanych z zastosowaniem tych metod.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem do badań było 17 prób nasion pobranych z odmian, rodów i ekotypów kostrzewy łąkowej (*Festuca pratensis* L.), kostrzewy czerwonej (*F. rubra* L.), życicy trwałej (*Lolium perenne* L.) i śmiałka darniowego (*Deschampsia caespitosa* (L.) P. Beauv.). Do analizy ziarniaków na zawartość endofitów zastosowano metodę mikroskopową z barwieniem grzybni błękitem anilinowym (Welty i Rennie, 1985) i metodę immunologiczną (ISTA, 2005).

Postępując według procedury opisanej przez Welty i Rennie pobrano z każdej próby nasion 500 ziarniaków do analizy. Ziarniaki moczoło przez około 15 godzin w temperaturze pokojowej w 20–30 ml 5% zasady sodowej (NaOH) zawierającej 0,1% błękitu anilinowego. Potem nasiona płukano w wodzie destylowanej, a po odsączeniu zalewano 20–30 ml laktofenolu (1:1:1:5 odpowiednio: 85% kwas mlekowy, fenol, gliceryna i woda dejonizowana). Następnie dodawano 0,1% błękitu anilinowego i gotowano przez 15 min (pod wyciągiem), po czym płukano w destylowanej wodzie. Poszczególne ziarniaki umieszczano na szkiełku podstawowym w kropli roztworu gliceryny i destylowanej wody (w stosunku 1:2), przykrywano szkiełkiem nakrywkowym i przeglądano przy użyciu mikroskopu świetlnego pod powiększeniem $\times 100$ oraz $\times 400$. Notowano liczbę nasion,

w których stwierdzono obecność wybarwionych na kolor niebieski strzępek grzybni *Neotyphodium*.

Analizę metodą immunologiczną przeprowadzono na 100 ziarniakach według procedury dołączanej do każdego zestawu odczynników, które sprowadzono z Agrinostics Ltd. Co., Watkinsville, GA, USA. Ziarniaki moczo no przez godzinę w 5% roztworze zasady sodowej (NaOH), a potem płukano i układano na nitrocelulozową membranę znajdującą się na gąbce zwilżonej buforem ekstrahującym. Tak przygotowane nasiona inkubowano przez 12 godzin w temperaturze 35–45°C (nocą). Po tym okresie ziarniaki usuwano, a membranę suszono w 70°C przez 15 minut, po czym wkładano do szalki z 10 ml roztworu blokującego w celu zablokowania miejsc niespecyficznego wiązania przeciwciał i umieszczano na wytrząsarce na 30 minut. Następnie membranę zanurzano na okres 1 godziny w roztworze przeciwciała pierwotnego specyficznego dla *Neotyphodium*, płukano dwukrotnie w roztworze blokującym, a potem umieszczano w roztworze przeciwciała wtórnego na 1 godzinę. Po moczeniu w każdym z roztworów przeciwciał membranę inkubowano w roztworze fosfatazy alkalicznej. Po ostatnim płukaniu dodawano substrat fosfatazy, który w następstwie działania enzymu zmieniał barwę w miejscach, gdzie wcześniej umieszczone były nasiona zasiedlone przez endofity. Rodzaj reakcji odczytywano na podstawie porównania z nasionami wzorcowymi załączonymi do każdego zestawu odczynników przez producenta.

Wyniki analizy podano w procentach ziarniaków zasiedlonych przez grzyby z rodzaju *Neotyphodium* w stosunku do ogólnej liczby ziarniaków badanych. Wyniki uzyskane dla odmian, rodów i ekotypów przy zastosowaniu obydwu metod porównano przy pomocy analizy korelacji prostej. Pracochłonność każdej metody przedstawiono jako czas ogólny potrzebny na wykonanie jednej analizy oraz jako czas efektywny, w którym podsumowano czas zużyty przez pracownika na przeprowadzenie poszczególnych etapów analizy (bez okresów inkubacji i oczekiwania). Orientacyjny koszt analizy obliczono na podstawie ilości odczynników zużytych na jedną próbę nasion oraz ich cenę.

WYNIKI I DYSKUSJA

Przeprowadzone badania wykazały wysoką efektywność zarówno metody barwieniowej, jak i immunologicznej. Badane próby pobrane z nasion odmian, rodów i ekotypów czterech gatunków traw różniły się pod względem zasiedlenia przez endofity, a wyniki uzyskane przy zastosowaniu każdej z metod okazały się zbieżne. Współczynnik korelacji wyniósł $r = 0,9991^{***}$ (tab. 1). W przypadku ziarniaków odmian i rodów życicy trwałe różnice pomiędzy wynikami uzyskanymi dla metody immunologicznej i barwieniowej wahały się od 0 do 8%, dla kostrzewy łąkowej od 0 do 4,8%, dla kostrzewy czerwonej od 0% do 1%, a dla ekotypów śmiałka darniowego od 0,5 do 3,5%.

W badanym zestawie odmian wyróżniała się Pasja — odmiana kostrzewy łąkowej, u której nie wykryto grzybni *Neotyphodium* spp. w ziarniakach, zarówno metodą barwieniową, jak i immunologiczną. Próba nasion tej odmiany była oznaczona przez hodowcę jako wolna od endofitów (E-). Odmiana ta znana była z dość wysokiego zasiedlenia nasion przez *N. uncinatum* (Pańka i in. 2004; Wiewióra i in., 2006). Staraniem hodowcy odmiana

została uwolniona od tych grzybów, co potwierdziły powyższe badania. Pozostałe analizowane próby nasion były porażone przez grzyby endofityczne w różnym stopniu od 0,0 do 93,0% przy ocenie metodą barwieniową i od 1,0% do 88,0% przy zastosowaniu metody immunologicznej. Najczęściej ich obecność stwierdzano w próbach pobranych z ziarniaków odmian życicy trwałej (2–93%) i kostrzewy łąkowej (74–92,8%). Wśród badanych odmian i rodów życicy trwałej najbardziej porażona była odmiana Vigor. Znacznie niższe, a u niektórych odmian nawet śladowe, zasiedlenie ziarniaków notowano u odmian kostrzewy czerwonej (0–4%), natomiast infekcja ziarniaków u niektórych ekotypów śmiełka darniowego sięgała 20% (tab. 1). Śmiełek darniowy jest nowym gatunkiem trawy od niedawna wprowadzonym do uprawy trawnikowej. Guillaumin i wsp. (2000) podają, że śmiełek darniowy występujący na naturalnych użytkach zielonych bywa zasiedlony przez te grzyby.

Tabela 1

Porównanie wykrywalności zasiedlenia nasion przez endofity przy użyciu metody barwieniowej (MB) i immunologicznej (MI)
Comparison of detectability of seed infestation by endophytes using aniline blue staining (MB) and immunoblotting (MI)

Gatunek Species	Odmiany, rody i ekotypy Cultivars, strains and ecotypes	Rok zbioru nasion Year of seed harvest	Procent nasion zasiedlonych przez endofity Percentage of seeds with endophytes	
			MB	MI
Kostrzewa łąkowa Meadow fescue	Pasja E-	2004	0,0	0,0
	Justa	2001	76,8	74,0
	Justa	2002	92,8	88,0
Życica trwała Perennial ryegrass	Vigor	2000	88,0	86,0
	Vigor	2003	88,0	80,0
	Vigor	2004	93,0	88,0
	Ba 1229	2004	4,0	4,0
	Ba 1233	2004	2,0	2,0
	S-60-47	2004	6,5	7,0
	Zastów G 5266	2004	10,0	11,0
Kostrzewa czerwona Red fescue	Logro	?	3,5	4,0
	134×Luba	2003	2,5	3,0
	Dark	2003	1,0	1,0
	Rapsodia II	2003	0,0	1,0
Śmiełek darniowy Tufted hairgrass	2/96	1996	17,5	20,0
	7/96	1996	5,5	9,0
	13/96	1996	4,5	5,0
Współczynnik korelacji Correlation coefficient			0,9991	

Podejmując badania nad porównaniem powyższych metod oczekiwano zbieżnych wyników dla zasiedlenia nasion odmian, rodów i ekotypów przez endofity. Autoryzowany zestaw do testu immunologicznego był wcześniej porównywany z metodami barwieniowymi i wyniki opisane były przez kilku autorów (Hill i in., 2002; Hahn i in., 2000 b). W teście porównawczym prowadzonym w 1999 roku przez Hilla i wsp. (2002) badano 6 prób dwóch gatunków traw (trzy próbki kostrzewy trzcinowej i trzy próbki życicy trwałej) w czterech laboratoriach z trzema ślepymi powtórzeniami każdej próbki. Średni

poziom infekcji był podobny dla obu metod immunologicznej i barwieniowej, a zmienność między laboratoriami była w zasadzie taka sama. Na tej podstawie metoda immunologiczna została uznana przez ISTA (2005) jako dająca porównywalne wyniki z metodą barwieniową.

Podobne badania były przeprowadzone także przez Hahn i wsp. (2000 b) do wykrywania endofitów zasiedlających rośliny kostrzewy trzcinowej, łąkowej, czerwonej i owczej. Autorzy ci porównywali metodę immunologiczną (tissue print immunoblot assay — TPIA) z metodą konwencjonalną barwienia różem bengalskim. Stwierdzili, że test immunologiczny jest wystarczająco czuły, aby wykryć niewielką ilość grzybnii nawet w odgałęzieniach, czy odcinkach środkowego pędu kwiatostanu. Autorzy uznali metodę TPIA za bardzo szybką, efektywną i wiarygodną do wykrywania grzybnii endofitycznych w gatunkach *Festuca*. Procedura testu jest łatwa do wykonania i przydatna w badaniach dużej liczby próbek, dlatego jest zalecaną techniką do rutynowych badań endofitów zarówno w hodowli traw, jak i pracach badawczych.

Celem naszych badań była nie tylko ocena zbieżności wyników uzyskanych za pomocą tych metod, ale głównie porównanie ich pracochłonności, łatwości wykonywania analizy i kosztów związanych ze zastosowaniem każdej z tych metod. Dane dotyczące tej części badań zamieszczono w tabeli 2.

Tabela 2

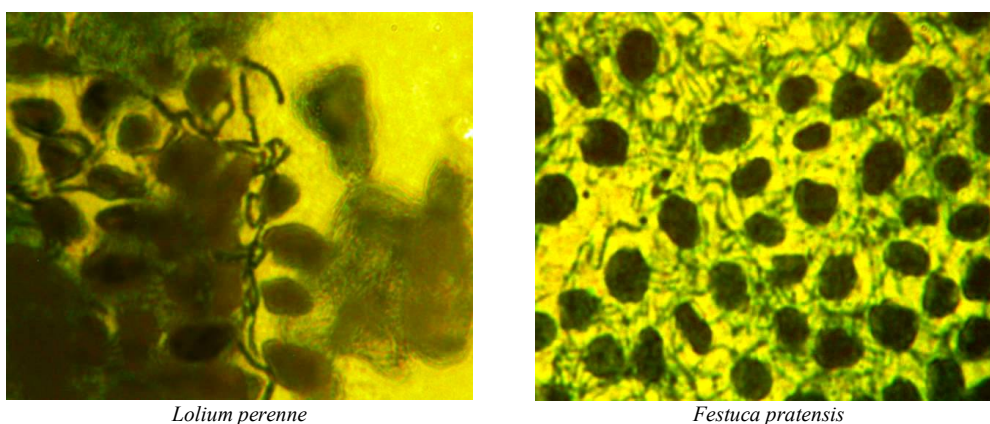
Porównanie pracochłonności i kosztowności metody mikroskopowej z barwieniem błękitem anilinowym (MB) i immunologicznej (MI)
Comparison of the expenditures associated with aniline blue staining (MB) and immunoblotting methods (MI)

Wyszczególnienie — Specification	MB	MI
Liczba nasion badanych w jednej próbce ¹⁾ Number of seeds examined in the sample ¹⁾	500 sztuk (pieces)	100 sztuk (pieces)
Czas potrzebny do wykonania analizy Time necessary to perform the assay	ok. 32 h	20–21 h
Czas rzeczywisty analizy (bez inkubacji) Real time (without incubation)	ok. 16 h	ok. 8 h
Liczba próbek możliwa do wykonania w tym samym czasie Number of samples examined at the same time	jedna single	kilka several
Warunki pracy Work conditions	wyciąg exhauster	nie wymaga szczególnych no particular requirements
Koszt analizy jednej próby (odczynniki) Cost of reagents per one sample	ok. 15 zł c. 5 USD	ok. 120 zł. 40 USD

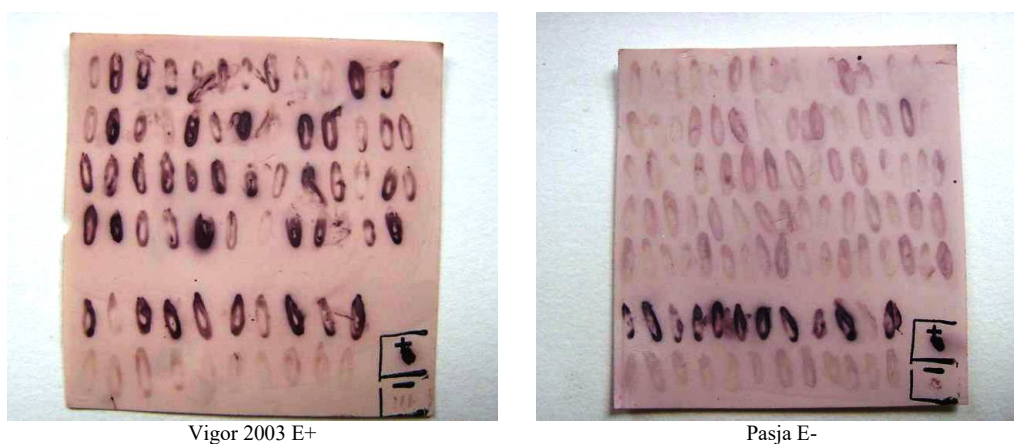
¹⁾ Zalecana przez ISTA; Recommended by ISTA

Na ich podstawie stwierdzono, że ocena zawartości endofitów metodą barwieniową jest pracochłonna, niezbędne są odpowiednie warunki pracy (wyciąg) zapewniające bezpieczeństwo dla zdrowia oraz potrzebne jest duże doświadczenie w rozpoznawaniu grzybnii endofitów z rodzaju *Neotyphodium*. Ponadto analizy mikroskopowe są czasochłonne, powodują zmęczenie wzroku i dlatego jest możliwe zbadanie nie więcej niż 100–200 sztuk nasion dziennie. Zastosowany barwnik powoduje wybarwienie strzępek grzybnii, która zasiedla głównie warstwę aleuronową (rys. 1 i 2). Podczas kiełkowania nasion grzyb przerasta skrobię bielma (Siegel i in., 1985), a wzrost grzybnii, charakterystycznie skręconej, ale

nierozgałęziającej się przebiega równolegle do osi liścia lub źdźbła (Welty i in., 1986). Majewska-Sawka i Nakashima (2004) stosując metodę immunologiczną mogli poszerzyć wiedzę o lokalizacji grzybni *Neotyphodium* w dojrzałych nasionach. Potwierdzili, że duża koncentracja grzybni występuje w warstwie aleuronowej, w obszarze bezpośrednio przylegającym do podstawy zarodka. Badania te wskazują, że metoda immunologiczna ze względu na swoją specyfikę daje możliwość szerszych badań nad patogenizacją roślin i nasion przez grzyby *Neotyphodium*.



Rys. 1. Metoda barwienia błękitem anilinowym — strzępki grzybni *Neotyphodium* spp. widoczne pomiędzy ziarnami aleuronowymi w ziarniaku: *Lolium perenne* i *Festuca pratensis*
 Fig. 1. Staining with aniline blue — hyphae of *Neotyphodium* spp. associated with aleurone layer in *Lolium perenne* and *Festuca pratensis* seeds



Rys. 2. Metoda immunologiczna — membrana przedstawiająca nasiona wykazujące pozytywną (lewa) i negatywną (prawa) reakcję na *Neotyphodium* spp. oraz kontrolę (dwa dolne rzędy) pozytywną (+) i negatywną(-)
 Fig. 2. Immunoblotting method — membrane showing positive (left) and negative (right) *Neotyphodium* spp. reaction, and control (two bottom rows) positive (+) and negative (-)

Badania nasze wykazały, że wykrywanie endofitów w ziarniakach traw metodą immunologiczną jest dużo łatwiejsze, mniej pracochłonne i szybsze w stosunku do metody barwieniowej, ale bardzo kosztowne (tab. 2). Poza tym zestaw odczynników do testu jest możliwy do zakupu tylko w firmie amerykańskiej Agrinostics Ltd. Co. w Watkinsville i musi być wykorzystany w określonym terminie ważności. Sprowadzanie zestawu jeszcze podwyższa koszty. Dodatkową zaletą metody jest możliwość testowania większej liczby prób nasion przy małym względnym zmęczeniu osoby wykonującej test w porównaniu do żmudnego przeglądania pod mikroskopem każdego z 500 ziarniaków według metody barwieniowej.

WNIOSKI

1. Potwierdzono, że wykrywanie endofitów w nasionach traw metodą mikroskopową z barwieniem błękitem anilinowym i metodą immunologiczną jest efektywne, a uzyskane wyniki są porównywalne. Dlatego obydwie metody mogą być polecane do rutynowych badań nad zawartością endofitów zarówno w hodowli traw jak i ocenie nasion.
2. Metoda barwieniowa okazała się mało kosztowna, ale bardzo pracochłonna, długotrwała i wymagająca dużego doświadczenia w rozpoznawaniu grzybnicy *Neotyphodium* oraz odpowiednich warunków pracy (wyciąg) zapewniających bezpieczeństwo dla zdrowia osoby przygotowującej materiał do analizy.
3. Metoda immunologiczna jest łatwa, szybka i mało pracochłonna, ale kosztowna ze względu na drogi zestaw odczynników sprowadzanych z USA.
4. Potwierdzono, że odmiany, rody i ekotypy traw różnią się zawartością endofitów w nasionach. Wskazuje to na konieczność badania nasion na ich obecność.

LITERATURA

- Bacon C. W., White J. F. Jr. 1994. Stains, media and procedure for analyzing endophytes. In: Biotechnology of endophytic fungi of grasses. Bacon C. W., White J.F.Jr. (eds.) CRC Press, Boca Raton: 47 — 56.
- Belesky D. P., Robbins J. D., Stuedemann J. A., Wilkinson S. R., Devine O. J. 1987. Fungal endophyte infection-loline derivative alkaloid concentration of grazed tall fescue. *Agron. J.* 79: 217 — 220.
- Dapprich P., Paul V. H., Krohn K. 1994. A novel and rapid staining method for the detection of vital endophytes in seeds and leaf sheaths of *Lolium perenne*. *IOBC wprs Bulletin* 17/1: 139 — 146.
- Doss R. P., Welty R. E. 1995. A polymerase chain reaction-based procedure for detection of *Acremonium coenophialum* in tall fescue. *Phytopathology* 85: 913 — 917.
- Guillaumin J. J., Frain M., Pichon N., Ravel C. 2000. Survey of fungal endophytes in wild grass species in the Auvergne region (central France). *Proc. of the 4th International Neotyphodium*. Grass Interactions Symposium, Soest, Germany: 85 — 92.
- Hahn H., Huth W., Schöberlein W. 2000 a. Tissue print immunoassay — a rapid and sensitive method also for detection of *Neotyphodium* endophytes. *Proc. of the 4th International Neotyphodium/ Grass Interactions Symposium*, Soest, Germany: 139 — 143.
- Hahn H., Huth W., Schöberlein W. 2000 b. A rapid and sensitive method also for detection of *Neotyphodium* endophytes. *4th International Neotyphodium*. Grass Interactions Symposium, Soest, Germany. Book of Abstracts: 40.

- Hill N. S., Hiatt E. E., III, De Battista J. P., Costa M. C., Griffiths C. H., Klap J., Thorogood D., Reeves J. H. 2002. Seed testing for endophytes by microscopic and immunoblot procedures. *Seed Sci. & Technol.* 30: 347 — 355.
- ISTA. 2005. International Rules for Seed Testing. Annexe to Chapter 7 Seed Health Testing Methods. Edition 2005. Published by The International Seed Testing Association (ISTA), P. O. BOX 308, 8303 Bassersdorf, CH-Switzerland.
- Liu D., Van Heeswijck R., Latch G., Leonforte T., Panaccio M., Langford C., Cunninham P., Reed K. 1995. Rapid identification of *Acremonium coenophialum* endophytes through arbitrarily primed PCR. *FEMS Microbiology Letter* 133: 95 — 98.
- Majewska-Sawka A., Nakashima H. 2004. Endophyte transmission via seeds of *Lolium perenne* L.: immunodetection of fungal antigens. *Fung. Genet. Biol.* 41: 534 — 541.
- Pańska D., Podkówka L., Lamparski R. 2004. Preliminary observations on the resistance of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) infected by *Neotyphodium uncinatum* to diseases and pests and native value. In: Proc. of the 5th International Symposium on *Neotyphodium* Grass Interactions. Kallenbach R et al. (eds.). Fayetteville, AR USA, May, 2004, 401: 88 — 90.
- Petroni O. 1986. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: *Microbiology of Phyllosphere*. Cambridge. Cambridge University Press: 175 — 187.
- Prończuk M. 2005. Endofity traw — znaczenie, występowanie i metody wykrywania. *Przegląd literatury. Biul. IHAR* 235: 297 — 309.
- Saha D. C., Jackson M. A., Jonson-Cicalese J. M. 1988. A rapid staining method for detection of endophytic fungi in turf and forage grasses. *Phytopathology* 78: 237 — 239.
- Siegel M. R., Latch G. C. M., Johnes M. C. 1985. *Acremonium* fungal endophytes of tall fescue and perennial ryegrass: significance and control. *Plant Dis.* 69/2: 179183.
- Welty R. E., Rennie W. J. 1985. ISTA Handbook on Seed Health Testing, Working sheet No. 55: Grasses, Endophyte. International Seed Testing Association, Zurich, Switzerland: 1 — 4.
- Welty R. E., Azevedo M. D., Cook K. L. 1986. Detecting viable *Acremonium* endophytes in leaf sheaths and meristems of tall fescue and perennial ryegrass. *Plant Dis.* 70: 431 — 435.
- White J. F. Jr. 1987. Widespread distribution of endophytes in the *Poaceae*. *Plant Dis.* 71: 340 — 342.
- Wiewióra B., Prończuk M., Ostrowska A. 2006. Infekcja nasion traw przez endofity w kolejnych latach użytkowania plantacji. *Biul. IHAR* 242: 285 — 293.

PODZIĘKOWANIE

Autorki pragną podziękować Pani prof. Annie Majewskiej-Sawka za życzliwość i pomoc w analizie ziarniaków traw metodą immunologiczną.