

## Wykorzystanie emisji fotonowej do identyfikacji zmian chorobowych jodły pospolitej

**Streszczenie.** Choroby wywoływane przez pasożytnicze grzyby przez wiele lat wpływały na stabilność, zdrowotność i trwałość drzewostanów oraz utrudniały produkcję materiału sadzeniowego do odnowień. Niektóre z chorób grzybowych mogą powodować zamieranie dużych ilości drzew. Do grzybów powodujących choroby drzew iglastych należą rodzaje: *Cylindrocarpon*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Alternaria* i *Botrytis*. *Alternaria alternata* jest najbardziej rozpowszechnionym gatunkiem z rodzaju *Alternaria*, którego zarodniki występują na całym świecie. Umiejętność dokładnej identyfikacji organizmu ma fundamentalne znaczenie dla wszystkich aspektów diagnostyki i epidemiologii grzybów, niezależnie od tego, czy chodzi o patologię roślin, nauki medyczne, badania środowiskowe czy kontrolę biologiczną. Alternatywą dla podstawowych technik diagnostycznych może być pomiar emisji fotonowej, wykorzystujący zjawisko luminescencji. Celem pracy jest identyfikacja grzybów wywołujących chorobę jodły pospolitej oraz określenie możliwości zastosowania emisji fotonów jako szybkiej metody wykrywania infekcji badanego drzewa. Zakres prac obejmował izolację i identyfikację mikrobiologiczną grzybów wywołujących chorobę jodły pospolitej oraz pomiar emisji ultra-słabych fotonów z fragmentów drzew zdrowych i dotkniętych zmianami chorobowymi. Za powstawanie zmian chorobowych jodły pospolitej odpowiedzialny jest grzyb *Alternaria alternata*. Przeprowadzone badania potwierdziły możliwość identyfikacji obecności infekcji grzybowej w organach drzew iglastych za pomocą emisji ultra słabych fotonów.

**Abstract** Diseases caused by parasitic fungi have for many years affected the stability, health and sustainability of forest stands and hindered the production of planting material for restoration. Some of the fungal diseases can cause large numbers of trees to die. Fungi that cause conifer diseases include genera: *Cylindrocarpon*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Alternaria* and *Botrytis*. *Alternaria alternata* is the most widespread species of the genus *Alternaria*, whose spores are found worldwide. The ability to accurately identify the organism is fundamental to all aspects of fungal diagnostics and epidemiology, whether in plant pathology, medical science, environmental research or biological control. An alternative to basic diagnostic techniques can be photon emission measurement, using the phenomenon of luminescence. The purpose of this study is to identify the fungi that cause disease in common fir and to determine the feasibility of using photon emission as a rapid method of detecting infection of the tree under study. The scope of work included isolation and microbiological identification of fungi causing disease in the common fir tree and measurement of ultra-weak photon emission from fragments of healthy and lesion-affected trees. The fungus *Alternaria alternata* is responsible for the formation of common fir lesions. The conducted research confirmed the possibility of identifying the presence of fungal infection in coniferous tree organs by means of ultra-weak photon emission. (The use of photon emission for identification of disease lesions in fir needles)

**Słowa kluczowe:** emisja fotonowa, jodła, igły jodły, grzyby

**Keywords:** photon emission, fir, fir needles, fungi

### Wstęp

Rolą grzybów w ekosystemie leśnym jest rozkład martwej materii organicznej, co umożliwia innym organizmom korzystanie z zawartych w niej substancjach organicznych. Ze względu na swoje zdolności celulolityczne, grzyby jako pierwsze rozkładają drewno, powodując jego zgniliznę szarą, białą lub brunatną, dając początek kolejnym przemianom, których skutkiem jest całkowity rozkład drewna martwych drzew [1]. Zasiedlenie drewna przez grzyby saprotroficzne odbywa się w określonej kolejności. Grzyby z klasy *Ascomycetes* preferują słabo rozłożone, niemal świeże drewno, inne należą do kolonizatorów wtórnych, a ich obecność można zaobserwować dopiero w późniejszych, zaawansowanych stadiach rozkładu. [2]. Z tego powodu grzyby mają istotny wpływ na poprawę żyzności i jakości siedliska leśnego.

Obecnie według badań Instytutu Badawczego Leśnictwa uszkodzenia powodowane przez grzyby stanowią niewielki procent wszystkich szkód w lasach. Szkody powodowane przez najgroźniejsze patogeny udało się ograniczyć dzięki prawidłowo prowadzonej gospodarce leśnej, poznaniu biologii grzybów chorobotwórczych i wypracowaniu działań profilaktycznych. Infekcje powodowane przez patogeniczne grzyby nie przeszły do historii i wciąż stanowią zagrożenie dla stabilności polskich lasów. Choroby wywoływane przez grzyby pasożytnicze od wielu lat wpływają na stabilność, zdrowotność i trwałość drzewostanów, oraz utrudniają produkcję materiału sadzeniowego do odnowień. Niektóre z chorób grzybowych mogą powodować zamieranie dużych ilości drzew. Choroby grzybowe najsilniej atakują wtedy, gdy drzewostany osłabione są innymi czynnikami, np.: suszami, wahaniami poziomu wody gruntowej, skażeniami atmosferycznymi lub żerami owadów [3,4,5]. Do

grzybów powodujących choroby drzew iglastych należą rodzaje: *Cylindrocarpon*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Alternaria* oraz *Botrytis*.

*Alternaria alternata* jest najbardziej rozpowszechnionym gatunkiem z rodzaju *Alternaria*, którego zarodniki występują na całym świecie. Przez cały rok zarodniki można znaleźć w organicznych składnikach gleby, natomiast od wiosny do jesieni są one przenoszone drogą powietrzną, przez co stają się jeszcze bardziej wszechobecne [6]. Konidia *Alternaria* tworzą ciemnobrazowe, zielono-czarne lub czarne kolonie. *Alternaria*, choć zwykle uważana za saprofityczne zanieczyszczenie, jest obecnie uważana za przyczynę wielu chorób zarówno roślinnych jak i zwierzęcych. Jako patogeny roślin, gatunki z rodzaju *Alternaria* mają szeroki zakres żywicieli [6,7].

Umiejętność dokładnej identyfikacji organizmu ma fundamentalne znaczenie dla wszystkich aspektów diagnostyki i epidemiologii grzybów, niezależnie od tego, czy chodzi o patologię roślin, nauki medyczne, badania środowiskowe czy kontrolę biologiczną. W fitopatologii wczesna identyfikacja czynnika powodującego chorobę jest najważniejsza w celu rozpoznania patogenu oraz wdrożenia przepisów dotyczących kontroli i kwarantanny. Konwencjonalne metody często polegają na identyfikacji objawów chorobowych, izolacji i hodowli organizmów środowiskowych oraz identyfikacji laboratoryjnej za pomocą testów morfologicznych i biochemicznych. Metody te, choć stanowią podstawę diagnostyki grzybów, mogą prowadzić do problemów w identyfikacji, co skutkuje błędną interpretacją oraz diagnozą i ostatecznie wdrożeniem błędnego leczenia. Efektywność diagnostyki zależy od doświadczonego i wykwalifikowanego personelu laboratoryjnego oraz możliwości wyhodowania

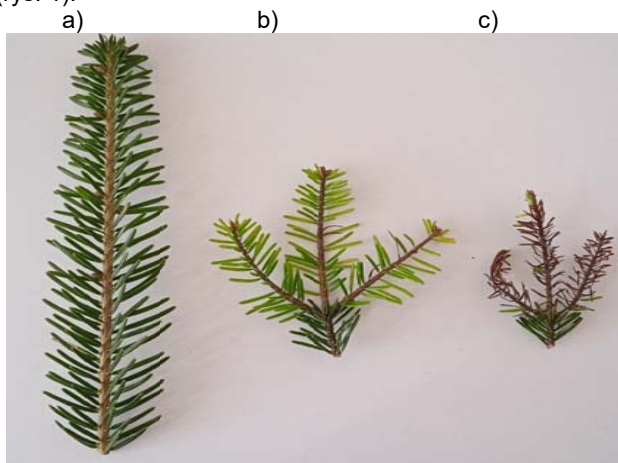
mikroorganizmu. Techniki te są dodatkowo czasochłonne, nie ilościowe, podatne na zanieczyszczenia i błędy, a w przypadku patologii roślin i medycyny często opóźniają leczenie [8,13].

Alternatywą dla podstawowych technik diagnostycznych może być pomiar emisji fotonowej, wykorzystujący zjawisko luminescencji. W czasie emisji fotonowej dochodzi do wysyłania pojedynczego lub grupy fotonów z obiektu materiału. Przejście elektronu, atomu lub cząsteczki ze stanu wzbudzonego i jednocześnie wyższego energetycznie do stanu nie wzbudzonego, który jest niższy energetycznie, czasem podstawowy nazywany stabilnym czego efektem jest wydzielanie energii. Takie zjawiska mogą zachodzić spontanicznie lub poprzez stymulację [10]. Popp zaproponował wykorzystanie luminescencji do oceny jakości żywności [9]. Według niego, stan organizmu precyzyjnie określa poziom emisji fotonów. Dlatego jakość żywności jest uzależniona od zgromadzonej w niej energii świetlnej w postaci fotonów. Wykazano, że produkty żywnościowe najwyższej jakości mają większą zdolność do kumulowania światła oraz charakteryzują się wysokim poziomem emisji fotonów [11]. Ponieważ każdy materiał biologiczny kumuluje pewnego rodzaju energię, którą można uznać za swojego rodzaju nośnik informacji o jego stanie zdrowotności czy żywotności, emisję fotonową można wykorzystać do celów diagnostycznych. Dużą zaletą metody jest jej bezinwazyjność w stosunku do analizowanego materiału oraz stosunkowo krótki czas postawienia diagnozy [9,12].

Celem badań jest identyfikacja grzybów powodujących chorobę jodły pospolitej oraz określenie możliwości wykorzystania emisji fotonowej jako szybkiej metody wykrywania zakażenia badanego drzewa.

### Materiały i metody

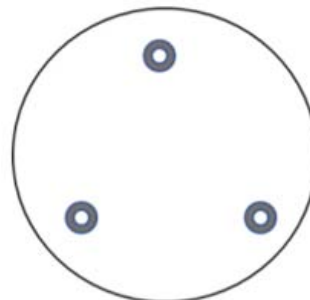
Do badań wykorzystano igły jodły pospolitej pobrane z drzew w różnym stadium rozwoju patogenu grzybowego (rys. 1).



Rys. 1. Igły jodły pospolitej wykorzystane w badaniach: a) organ zdrowy; b) organ w początkowym stadium chorobowym; c) organ w końcowym stadium chorobowym

W celu wyizolowania szczepów grzybów powodujących zmiany chorobowe na jodle, sterylną wymazówką pobrano zarodniki, które następnie posiano trójpunktowo (rys. 2) na szalce Petriego, na podłożu stałym Yeast Pepton Dextrose (YPD). Płytki przechowywano w cieplarni w temperaturze 30°C przez 5 dni. Do identyfikacji gatunkowej wykorzystano technikę MALDI TOF MS, dzięki której organizm zostaje zidentyfikowany przez porównanie jego profilu spektralnego z referencyjną bazą danych. Korelacje pozycji pików i intensywności między widmami eksperymentalnymi i bazami danych są wykorzystywane do generowania

wyniku dopasowania. Ten wynik dopasowania jest poziomem pewności, że nieznaną izolat jest reprezentantem kandydującego mikroorganizmu dopasowanego z bazy danych [14]. Identyfikacja gatunkowa została przeprowadzona przez Jagiellońskie Centrum Innowacji w Krakowie.

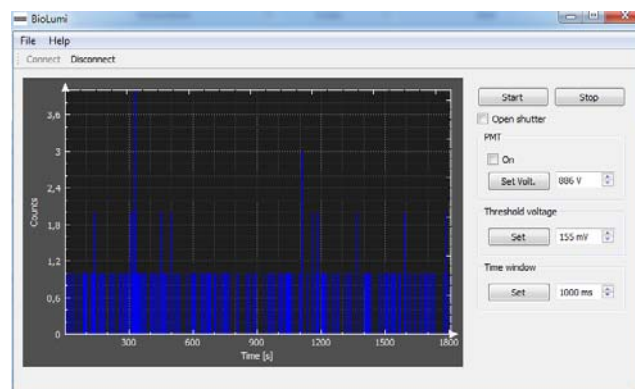


Rys. 2. Schemat posiewu zarodników grzybowych na szalce Petriego

Pomiar emisji fotonowej wykonano wg akredytowanej przez PCA procedury pomiarowej w Laboratorium Eksperymentalnych Technic Badawczych Produktów i Surowców Biologicznych. Do wyznaczenia emisji fotonów (rys. 3) wykorzystano metodę zliczania pojedynczych fotonów (Single Photon Counting). Wynik pomiaru emisji fotonów stanowi bezwzględna różnica pomiędzy liczbą fotonów zarejestrowanych przez fotopowielacz w komorze światłoszczelnej z materiałem, a liczbą fotonów zarejestrowanych przez fotopowielacz w tej komorze bez materiału, zgodnie z zależnością 1:

$$(1) \quad L = A - B \text{ [impuls]}$$

gdzie: L – liczba fotonów emitowanych przez badaną próbkę, A – liczba fotonów emitowana przez próbkę umieszczoną w komorze światłoszczelnej, ; B – liczba wskazań (fotonów) generowana przez pustą komorę światłoszczelną [15].

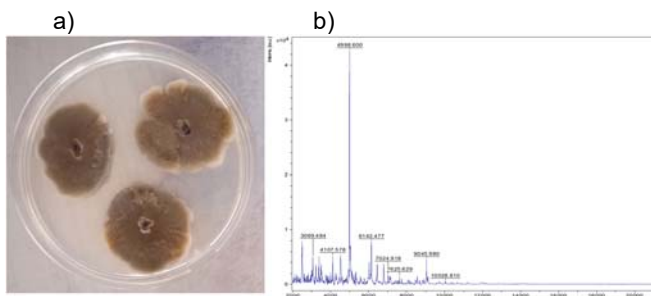


Rys. 3. Program używany do zliczania fotonów

Materiał przed badaniami był stabilizowany termicznie. Do badania odważono po 5g igieł jodły pospolitej w różnym stadium rozwoju patogenu grzybowego. Pojedynczy pomiar emisji fotonów trwał 30 minut. Wartości emisji fotonowej przeliczono na 1g badanego materiału.

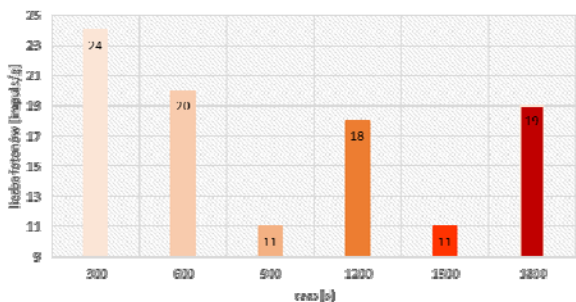
### Wyniki

Zbadano właściwości luminescencyjne igieł jodły pospolitej w różnym stadium rozwoju patogenu grzybowego oraz wyizolowanego patogenu. Z zainfekowanego materiału wyizolowano jeden szczep grzybowego patogenu, który na podstawie oględzin makro – i mikroskopowych oraz uzyskanego widma masowego (rys. 4), został zidentyfikowany jako gatunek *Alternaria alternata*.

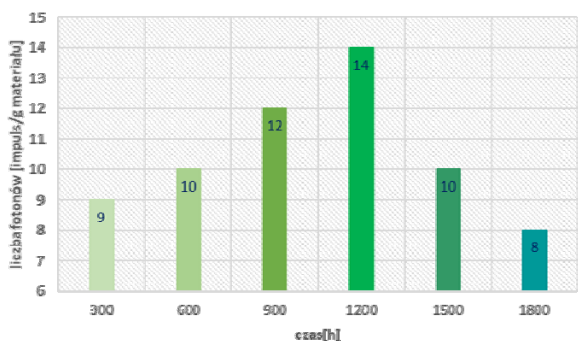


Rys. 4. Wyniki otrzymane dla grzyba *Alternaria alternata*: a) widok makroskopowy; b) widmo masowe

Na rysunku 5 przedstawiono całkowitą liczbę fotonów wyemitowanych przez *Alternaria alternata*. Czas ekspozycji materiału podzielono na mniejsze odcinki - 300 sekundy, co umożliwiło identyfikację ilościowej struktury czasowej emisji fotonów badanego materiału. Sumaryczna liczba fotonów emitowanych przez *Alternaria alternata* w przeliczeniu na 1g masy wyniosła 103. Najwyższą wartość równą 24 fotony zarejestrowano w pierwszych 300 sekundach pomiaru. Natomiast najniższą wartość 11 fotonów w 900 i 1500 sekundzie pomiaru. Największą różnicę w ilości emitowanych fotonów (9 fotonów/g materiału) odnotowano między 600 a 900 sekundą pomiaru. Można zauważyć naprzemienne spadki oraz wzrostu liczby emitowanych fotonów w przedziale czasowym 600 – 1800 sekund.



Rys. 5. Emisja fotonowa zarejestrowana dla dojrzałej formy grzyba *Alternaria alternata*

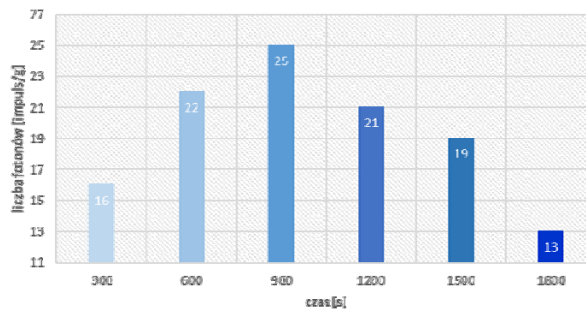


Rys. 6. Emisja fotonowa zarejestrowana dla zdrowych igieł jodły pospolitej

Rysunek 6 przedstawia liczbę fotonów wyemitowanych przez zdrowe igły jodły pospolitej. Sumaryczna liczba fotonów emitowanych przez zdrowe igły jodły pospolitej wyniosła 63. Można zauważyć, że liczba emitowanych fotonów stopniowo rosła do 1200 sekundy pomiaru, a następnie spadła. Najwyższą wartość równą 14 fotonów zarejestrowano w 1200 sekundzie pomiaru. Natomiast najniższą wartość (8 fotonów/g materiału) w 1800 sekundzie pomiaru. Największą różnicę w ilości

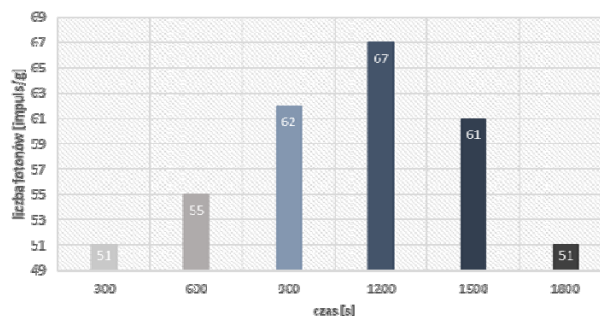
emitowanych fotonów (4 fotonów/g materiału) odnotowano między 1200 a 1500 sekundą pomiaru.

Dla igieł w początkowym stadium chorobowym, sumaryczna liczba fotonów wyniosła 116 (rys. 7). Podobnie jak w przypadku zdrowych igieł jodły pospolitej zaobserwowano, że liczba emitowanych fotonów stopniowo rosła do 900 sekundy pomiaru, a następnie spadła. Najwyższą wartość równą 25 fotonów zarejestrowano w 900 sekundzie pomiaru, a najniższą wartość (13 fotonów/g materiału) w 1800 sekundzie pomiaru. Największą różnicę w ilości emitowanych fotonów (6 fotonów/g materiału) odnotowano między 300 a 600 sekundą pomiaru.



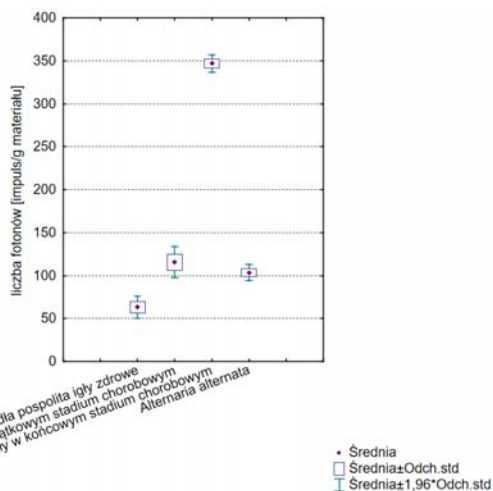
Rys. 7. Emisja fotonowa zarejestrowana dla igieł jodły pospolitej w początkowym stadium chorobowym

Sumaryczna liczba fotonów igieł w końcowym stadium chorobowym została przedstawiona na rysunku 8 i wyniosła aż 347 fotonów/g materiału. Również podobnie jak w przypadku igieł zdrowych i w początkowym stadium jodły pospolitej zaobserwowano, że liczba emitowanych fotonów stopniowo rosła do 1200 sekundy pomiaru, a następnie spadła. Najwyższą wartość równą 67 fotonów zarejestrowano w 1200 sekundzie pomiaru, a najniższą wartość (51 fotonów/g materiału) w 300 i 1800 sekundzie pomiaru. Największą różnicę w ilości emitowanych fotonów (10 fotonów/g materiału) odnotowano między 1500 a 1800 sekundą pomiaru.



Rys. 8. Emisja fotonowa zarejestrowana dla igieł jodły pospolitej w końcowym stadium chorobowym

Rysunek 9 przedstawia całkowitą liczbę fotonów uzyskanych w czasie pomiarów z igieł jodły pospolitej w różnym stadium chorobowym oraz dojrzałej formy grzyba *Alternaria alternata*. Najniższą liczbę fotonów zarejestrowano dla zdrowych igieł jodły pospolitej (63 impulsy/g materiału), natomiast najwyższą liczbę fotonów zarejestrowano dla zdrowych igieł jodły pospolitej w końcowym stadium chorobowym (347 impulsów/g materiału). Zbliżoną emisję fotonową odnotowano dla igieł jodły pospolitej w początkowym stadium chorobowym i dojrzałej formy grzyba *Alternaria alternata*, która wyniosła odpowiednio 116 i 103 impulsy/g materiału.



Rys. 9. Emisja fotonowa zarejestrowana dla igieł jodły pospolitej w różnym stadium chorobowym

Przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA), do której wykorzystano program Statistica 13 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Istotność różnic pomiędzy średnimi zweryfikowano testem Scheffe'go ( $\alpha=0,05$ ). Wyniki zostały przedstawione w tabeli 1. Wyodrębniono cztery grupy jednorodnie wartości emisji fotonowej igieł jodły pospolitej w różnym stadium chorobowym oraz dojrzałej formy grzyba *Alternaria alternata*. Do pierwszej grupy jednorodnej zaliczono wartość emisji fotonowej zdrowych igieł jodły pospolitej. W drugiej i trzeciej grupie jednorodnej znalazła się liczba fotonów igieł jodły pospolitej odpowiednio w początkowym i końcowym stadium chorobowym. Natomiast czwartą grupę stanowiła emisja fotonowa zarejestrowana dla dojrzałej formy grzyba *Alternaria alternata*. Świadczy to o zróżnicowaniu emisji fotonowej między grupami jednorodnymi igieł jodły pospolitej w różnym stadium chorobowym oraz dojrzałej formy grzyba *Alternaria alternata*.

Tabela 1. Wielkość emisji fotonowej poszczególnych organów drzew iglastych

Materiał badawczy	Liczba fotonów [impuls/g]
igły jodły pospolitej zdrowe	63,4 <sup>a</sup>
igły jodły pospolitej w początkowym stadium chorobowym	115,6 <sup>b</sup>
igły jodły pospolitej w końcowym stadium chorobowym	346,8 <sup>c</sup>
<i>Alternaria alternata</i>	103,5 <sup>d</sup>

- obliczenia wykonane na poziomie istotności  $\alpha=0,05$

a – pierwsza grupa jednorodna, b – druga grupa jednorodna, c – trzecia grupa jednorodna, d – czwarta grupa jednorodna

### Podsumowanie

Za powstawanie zmian chorobowych jodły pospolitej odpowiada grzyb *Alternaria alternata*. Przeprowadzone badania potwierdzają możliwość identyfikacji obecności infekcji grzybiczej w organach drzew iglastych przy wykorzystaniu emisji fotonowej. Analiza wyników pozwala na wyciągnięcie wniosku, że badania emisją fotonowej pozwalają na wczesne wykrycie infekcji grzybiczej, dzięki czemu można na wczesnym etapie zakażenia wdrożyć metody prewencyjne, skutkujące ograniczeniem stosowania środków grzybobójczych i zachwiania homeostazy ekosystemu leśnego.

Sfinansowano z subwencji Ministerstwa Edukacji i Nauki dla Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie na rok 2022.

**Autorzy:** mgr inż. Anna Miernik, Wydział Inżynierii Produkcji i Energetyki, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Balicka 116B, 30–149 Kraków, E-mail: anna.miernik@urk.edu.pl

### LITERATURA

- [1] Rayner A.D.M., Boddy L. 1988. Fungal decomposition of wood: its biology and ecology. Willey
- [2] Fukasawa Y., Osono T., Takeda H. 2011. Wood decomposing abilities of diverse lignicolous fungi on nondecayed and decayed beech wood. Mycologia 103, 3: 474-482.
- [3] Sołtys A., Zawadzki G. 2018. Choroby grzybowe jako czynnik zagrażający stabilności lasów. Studia i Materiały CEPL w Rogowie, R. 20. Zeszyt 54 / 4, 83 - 92
- [4] Tadeusiewicz, R., Tylek, P., Adamczyk, F., Kielbasa, P., Jabłoński, M., Pawlik, P., Szaroleta, M. (2017). Automation of the Acorn Scarification Process as a Contribution to Sustainable Forest Management. Case Study: Common Oak. Sustainability, 9(12), 2276. doi:10.3390/su9122276
- [5] Tadeusiewicz, R., Tylek, P., Adamczyk, F., Kielbasa, P., Jabłoński, M., Bubliski, Z., ... Szaroleta, M. (2017). Assessment of Selected Parameters of the Automatic Scarification Device as an Example of a Device for Sustainable Forest Management. Sustainability, 9(12), 2370. doi:10.3390/su9122370
- [6] Kustrzeba-Wójcicka, I., Siwak, E., Terlecki, G. et al. Alternaria alternata and Its Allergens: a Comprehensive Review. Clin Rev Allerg Immunol 47, 354–365 (2014).
- [7] Lee, Y. M., Lee, H., Jang, Y., Cho, Y., Kim, G.-H., & Kim, J.-J. (2014). Phylogenetic analysis of major molds inhabiting woods. Part 4. Genus Alternaria. Holzforschung, 68(2). doi:10.1515/hf-2013-0089
- [8] Atkins S.D., Clark I.M. Fungal molecular diagnostics: a mini review, J. Appl. Genet. 45(1), 2004, pp. 3-15
- [9] Kobayashi M Takeda M Sato T Yamazaki Y Kaneko K Ito K-I Kato H Inaba H 1999 In vivo imaging of spontaneous ultraweak photon emission from a rat's brain correlated with cerebral energy metabolism and oxidative stress. Neurosci. Res., 34, 103–113.
- [10] Popp F.A. Przekaz jedzenia, czyli co nas odżywia. Wydawnictwo Virgo, (2010), Warszawa ISBN 978-83-923879-4-7
- [11] Ruth B., Popp F. A., Experimentelle Untersuchungen zur ultraschwachen Photonemission biologischer Systeme. Zeitschrift für Naturforschung, 31c (1976), 741-745
- [12] Nawara, P., Trzyniec, K., Drózd, T., Popardowski, E., Juliszewski, T., Zagórda, M., Miernik, A. Analysis of the possibility of identifying the quality parameters of the oil using ultra-weak secondary luminescence (2020) Przegląd Elektrotechniczny, 96 (2), pp. 117-120.
- [13] Korzeniewska, E., Szczęsny, A., Lipiński, P., Drózd, T., Kielbasa, P., Miernik, A. (2020). Prototype of a Textronic Sensor Created with a Physical Vacuum Deposition Process for Staphylococcus aureus Detection. Sensors, 21(1), 183
- [14] Santos I.C., Hildenbrand Z., Schug K.A. 2016. Applications of MALDI-TOF MS in environmental microbiology. Royal Society of Chemistry, 141(10): 2827-2837
- [15] Gałazka-Czarnecka, I.; Korzeniewska, E.; Czarnecki, A.; Sójka, M.; Kielbasa, P.; Drózd, T. Evaluation of Quality of Eggs from Hens Kept in Caged and Free-Range Systems Using Traditional Methods and Ultra-Weak Luminescence. Appl. Sci. 2019, 9, 2430. https://doi.org/10.3390/app9122430