

SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE

z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2014 roku

Poszukiwanie źródeł odporności owsa (*Avena sativa* L.) na nowy patogeniczny i mykotoksynotwórczy gatunek – *Fusarium langsethiae*

Decyzja MRiRW:

HOR hn – 801 – 4/14 z dnia 16 lipca 2014 r., zadanie nr 29

Okres realizacji zadania:

01.01.2014–31.12.2014

Podmiot realizujący zadanie:

**Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich
w Bydgoszczy**

Wydział/Katedra/Zakład:

**Wydział Rolnictwa i Biotechnologii, Katedra Entomologii i Fitopatologii Molekularnej,
Zakład Fitopatologii Molekularnej**

Kierownik zadania:

dr hab. inż. Grzegorz Lemańczyk

Wykonawcy zadania:

prof. dr hab. inż. Czesław Sadowski

dr inż. Aleksander Łukanowski

dr inż. Anna Baturo-Cieśniewska

1. Tytuł zadania

Poszukiwanie źródeł odporności owsa (*Avena sativa* L.) na nowy patogeniczny i mykotoksynotwórczy gatunek – *Fusarium langsethiae*

2. Cele zadania

Celem zadania jest uzyskanie informacji o wrażliwości linii hodowlanych i genotypów owsa na izolaty *Fusarium langsethiae* o zróżnicowanej wirulencji oraz monitoring polegający na molekularnej analizie ilościowej zanieczyszczenia prób ziarna owsa przez *F. langsethiae* i określeniu poziomu skażenia tego ziarna wybranymi mykotoksynami, wytworzonymi w ziarnie w następstwie porażenia tym gatunkiem w warunkach naturalnych

3. Opis tematów badawczych

3. 1. Temat badawczy 1

Określenie znaczenia *Fusarium langsethiae* w Polsce na podstawie przeprowadzonego monitoringu zasiedlenia zebranego ziarna owsa przy zastosowaniu techniki Real-Time PCR oraz zanieczyszczenia ziarna mykotoksynami.

Cel tematu badawczego 1

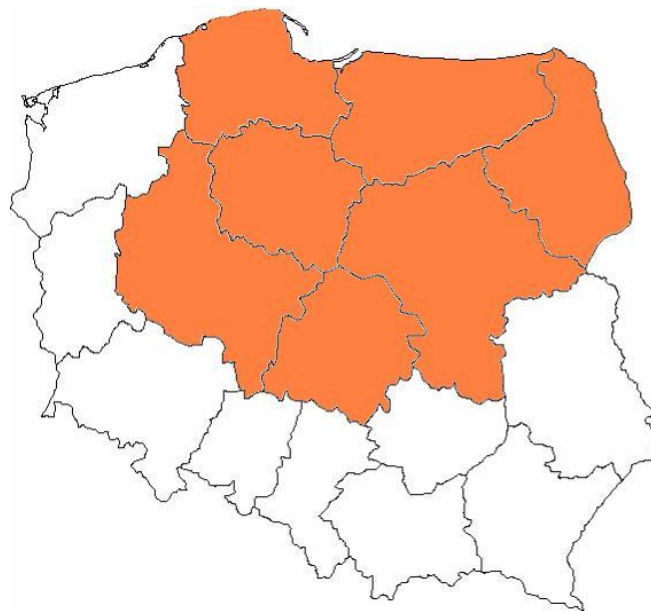
Celem tematu badawczego jest uzyskanie informacji o znaczeniu *Fusarium langsethiae* dla owsa uprawianego w Polsce, określonego na podstawie zanieczyszczenia prób ziarna grzybem i na podstawie poziomu skażenia tego ziarna wybranymi mykotoksynami (T-2 i HT-2), wytworzonymi w ziarnie w następstwie porażenia tym gatunkiem w warunkach naturalnych.

Materiały i metody

Przeprowadzony został monitoring zasiedlenia zebranego ziarna owsa przez *Fusarium langsethiae*. Badania te wykonano przy użyciu techniki Real-Time PCR, umożliwiającej określenie ilości materiału genetycznego grzyba w ziarnie także przy bardzo małych ilościach, jak również w przypadku bezobjawowego rozwoju patogena.

Krzywą standardową dla *Fusarium langsethiae* przygotowano wykorzystując czystą kulturę izolatu FL 0809. Izolację DNA grzyba przeprowadzono zgodnie ze zmodyfikowanym protokołem wg Doyle i Doyle (1990). Krzywa standardowa została przygotowana z wykorzystaniem serii 10-cio krotnych rozcieńczeń DNA *F. langsethiae*: 350 ng, 35 ng, 3,5 ng, 0,35 ng, 0,035 ng i 0,0035 ng z użyciem specyficznych gatunkowo starterów typu SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) amplifikujących produkt o wielkości 310 pz (Wilson i in. 2004). Reakcję przeprowadzono w LightCycler 480II (Roche, Szwajcaria) z użyciem niespecyficznego barwnika LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche) zawierającym nukleotydy, polimerazę Taq, bufor i jony Mg^{2+} . Do wszystkich próbek została dodana woda w ilości 1,8 μ l i po 0,6 μ l starterów o stężeniu 10 $pM \cdot \mu$ l⁻¹.

Monitoring zasiedlenia ziarna owsa przez *Fusarium langsethiae* przeprowadzono dla prób owsa zebranych w 2013 i 2014 roku, pochodzących z pól produkcyjnych, położonych w siedmiu województwach (rys. 1). W badaniach uwzględniono 21 prób ziarna owsa zebranego w 2013 r., pochodzących z 4 województw i 15 prób ziarna owsa zebranego w 2013 r., pochodzących z 3 województw.



Rys. 1. Położenie pól produkcyjnych owsa objętych monitoringiem zasiedlenia zebranego ziarna przez *Fusarium langsethiae* przy zastosowaniu techniki Real-Time PCR

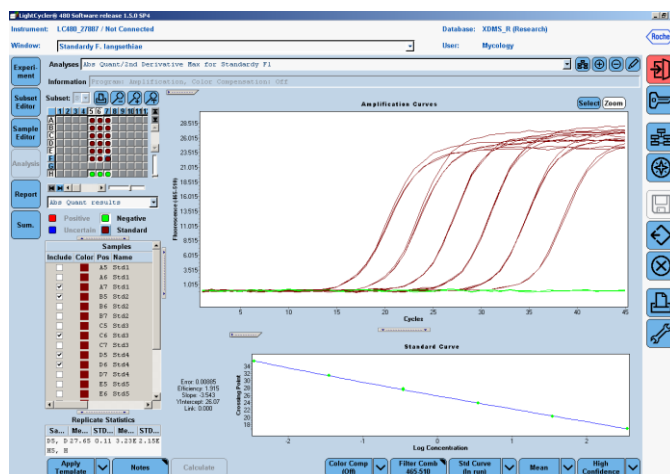
Izolację całkowitego DNA z ziarniaków owsa przeprowadzono zgodnie ze zmodyfikowanym protokołem wg Doyle i Doyle (1990). Z 20 g zmielonych w młynku ziarniaków owsa do probówki typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml pobrano 100 mg i zalano 600 μ l buforu ekstrakcyjnego. Kolejne etapy izolacji są zgodne z wyżej wymienionym protokołem izolacji DNA z wykorzystaniem CTAB, fenolu, chloroformu i alkoholu etylowego. Zawartość całkowitego DNA uzyskanego z ziarna owsa zmierzono spektrofotometrycznie wykorzystując Nanodrop (USA), a do dalszych analiz Real-Time PCR wszystkie próbki rozcieńczono w dejonizowanej wodzie sterylnej do stężenia 100 ng· μ l⁻¹. Reakcję przeprowadzono w LightCycler 480II z użyciem LightCycler 480 SYBR Green I Master. Objętość pojedynczej reakcji wynosiła 20 μ l (13 μ l mastermiks + 7 μ l badanej próbki DNA). Wszystkie próby wykonywano w trzech powtórzeniach, a wynik końcowy jest średnią z tych replikacji. W reakcji zastosowano startery SCAR, użyte wcześniej do przygotowania krzywej standardowej, generujące amplikon o długości 310 pz. Kontrola negatywna składała się ze studzienek, w których DNA zostało zastąpione sterylną wodą dejonizowaną. Reakcja amplifikacji była poprzedzona preinkubacją próbek w czasie 10 minut w temperaturze 95°, natomiast właściwa amplifikacja składała się z 55 cykli. Ostatnim etapem reakcji była analiza krzywej topnienia w zakresie temperatur 65–95°C. Otrzymane wyniki przemnożono przez miano rozcieńczenia danej próbki, aby uzyskać informację o rzeczywistej ilości DNA grzyba w ziarnie owsa. Badania te przeprowadzono w Zakładzie Fitopatologii Molekularnej Katedry Entomologii i Fitopatologii Molekularnej UTP w Bydgoszczy.

Ponadto dla wybranych 11 prób ziarna owsa, pochodzących z pól produkcyjnych, wykonano analizę dotyczącą zanieczyszczenia ziarna wybranymi mykotoksynami (toksyna T2 i HT-2). Ze względu na bardzo duże koszty takich analiz wybrano 11 prób, w których stwierdzono największą ilość *F. langsethiae* w ziarnie, próby o średniej zawartości grzyba i próby o najniższej zawartości grzyba. Ze względu na brak w Zakładzie Fitopatologii Molekularnej specjalistycznego wyposażenia niezbędnego do przeprowadzenia analiz ilościowego oznaczania zanieczyszczenia ziarna mykotoksynami, ich wykonanie zlecono Katedrze Fizjologii i Toksykologii Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy. Analizę ilościową zawartości toksyny T-2 i HT-2 wykonano metodą HPLC-MS/MS. Próby oczyszczano na kolumnkach Bond Elut[®] Mycotoxin firmy Agilent.

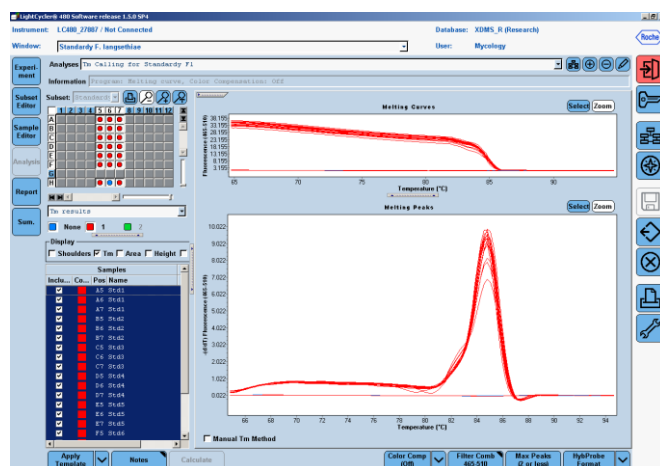
Wyniki

Zanim przystąpiono do analizy zawartości DNA w próbach ziarna owsa konieczne było przygotowanie krzywej standardowej dla *F. langsethiae*. W tym celu wykorzystano czystą kulturę izolatu FL 0809. Krzywą standardową przygotowano z wykorzystaniem serii 10-cio krotnych rozcieńczeń DNA *F. langsethiae*: 350 ng, 35 ng, 3,5 ng, 0,35 ng, 0,035 ng i 0,0035 ng. Przygotowując krzywą przeprowadzono kilka prób. Do wyznaczenia krzywej wykorzystano wyniki reakcji Real-Time PCR, dla których wydajność reakcji wynosiła 1,915 (rys. 2). Krzywa standardowa została wyznaczona na podstawie przebiegu reakcji z wcześniej wymienionymi standardami i stanowiła podstawę do ilościowej analizy materiału genetycznego *F. langsethiae* w próbach pochodzących z ziarniaków owsa.

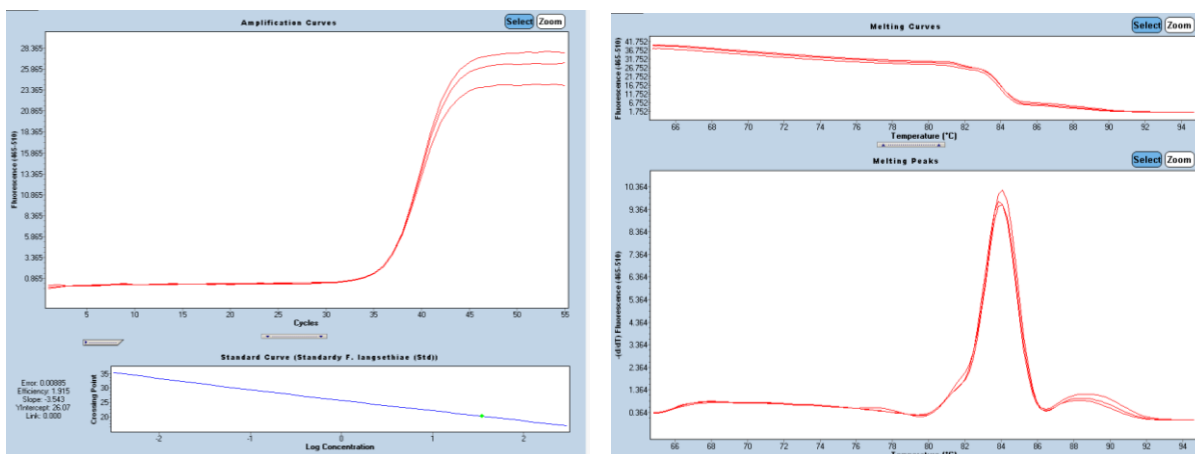
Reakcja Real-Time PCR została przeprowadzona z użyciem niespecyficznego barwnika SYBR Green I, który wiąże wszystkie dwuniciowe fragmenty DNA znajdujące się w badanej próbce, przez co może wykrywać także niespecyficzne produkty reakcji. W celu potwierdzenia uzyskania produktu docelowego została przeprowadzona analiza krzywej topnienia (rys. 3), która jednoznacznie wykazuje, że powstaje oczekiwany produkt reakcji. Uzyskanie w reakcji Real-Time PCR jednego produktu o temperaturze topnienia ok. 84°C świadczyło o obecności *F. langsethiae* w próbce ziarna (rys. 4). W części prób powstawał tylko produkt niespecyficzny, czyli nie stwierdzono obecności DNA *Fusarium langsethiae* (rys. 5).



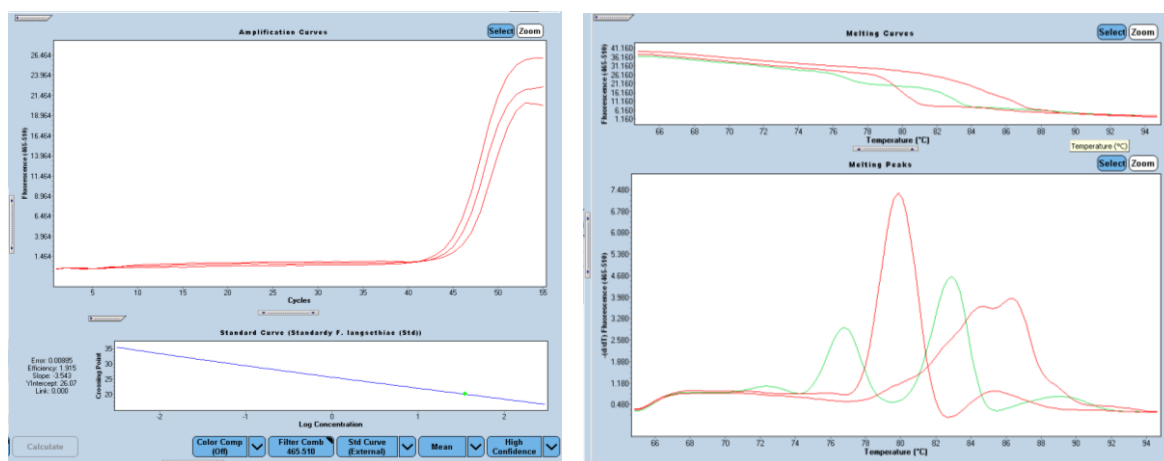
Rys. 2. Przygotowanie krzywej standardowej dla *Fusarium langsethiae* (standardy – od 350 ng do 0,0035 ng DNA grzyba *F. langsethiae* FL 0809; wydajność reakcji 1,915)



Rys. 3. Analiza krzywej topnienia, w której uzyskano specyficzny produkt reakcji PCR (jeden pik na wykresie)

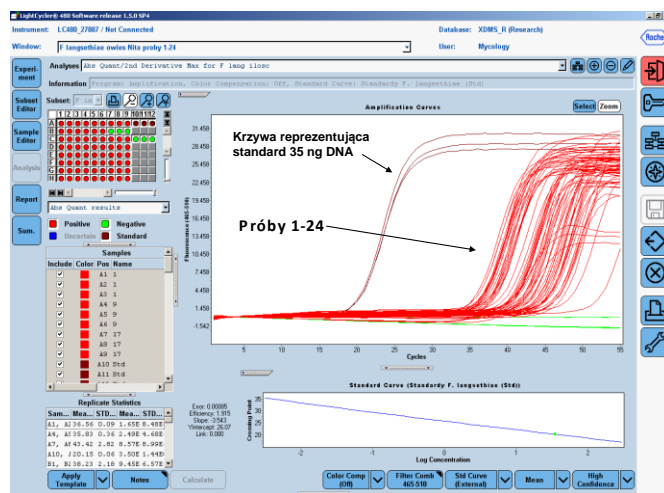


Rys. 4. Przebieg reakcji Real-Time PCR dla próby, w której wykryto *F. langsethiae* - jeden produkt o temperaturze topnienia ok. 84°C świadczący o obecności tego gatunku grzyba w próbce



Rys. 5. Przebieg reakcji Real-Time PCR dla próby, w której nie wykryto *F. langsethiae* - kilka niespecyficzných produktów o temperaturze topnienia innej niż 84°C świadczących o braku tego gatunku grzyba w próbce

Na podstawie przeprowadzonych analiz Real-Time PCR (rys. 6) stwierdzono niezbyt duże zasiedlenie ziarna owsa przez *Fusarium langsethiae*, zarówno w próbach pochodzących z 2013 r., jak i z 2014 r. (rys. 7). Średnio zasiedlenie przez *F. langsethiae* ziarna owsa pochodzącego z tych dwóch lat istotnie się różniło. Dla wartości średnich z lat więcej *F. langsethiae* stwierdzono w 2014 niż w 2013 roku, dla których stężenie DNA wynosiło odpowiednio 0,01108 i 0,00542 mg na kg ziarna owsa (tab. 1,2). Jednak nie we wszystkich próbach wykryto *F. langsethiae*. Spośród 21 prób ziarna owsa zebranego w 2013 r. obecność *F. langsethiae* stwierdzono w 9 próbach, a z 2014 r. – w 6 z 15 analizowanych prób. Najwięcej DNA *F. langsethiae* w ziarnie owsa zebranego w 2013 r. stwierdzono w próbach pochodzących z Biskupiec (0,03803 mg/kg), następnie Strzelec - odmiana Sławko (0,02063 mg/kg), Janowa - odmiana Bingo (0,01559 mg/kg) oraz Sławki Wielkiej (0,01497 mg/kg) (tab. 1). W próbach z 2014 r. najwięcej *F. langsethiae* stwierdzono w ziarnie z Samokłesk Dużych (0,10284 mg/kg) i Sławianowa (0,03735 mg/kg) (tab. 2).



Rys. 6. Przebieg reakcji Real-Time PCR dla prób ziarna owsa pochodzących z różnych rejonów Polski na obecność *F. langsethiae*

Tabela 1. Stężenie DNA *Fusarium langsethiae* w próbach ziarna owsa zebranego w 2013 r., pochodzącego z różnych rejonów Polski

Lp.	Miejscowość	Województwo	Odmiana	Zawartość [mg/kg ziarna]
1	Strzelce	łódzkie	- *	0,01002
2	Strzelce	łódzkie	Maczo	0,00086
3	Strzelce	łódzkie	Krezus	0,00851
4	Strzelce	łódzkie	Komfort	0,00299
5	Strzelce	łódzkie	Polar	n.w.**
6	Strzelce	łódzkie	Haker	n.w.
7	Strzelce	łódzkie	Koneser	n.w.
8	Strzelce	łódzkie	Sławko	0,02063
9	Podgórze	mazowieckie	-	0,00215
10	Rakowiec	mazowieckie	-	n.w.
11	Brzozówka Koronna	podlaskie	-	n.w.
12	Janów	podlaskie	-	n.w.
13	Janów	podlaskie	Bingo	0,01559
14	Ryboły	podlaskie	Rajtar	n.w.
15	Wąsosz	podlaskie	Zuch	n.w.
16	Biskupiec	warmińsko-mazurskie	-	0,03803
17	Nidzica	warmińsko-mazurskie	-	n.w.
18	Pilnik	warmińsko-mazurskie	-	n.w.
19	Pokrzywnica-Kuce	warmińsko-mazurskie	-	n.w.
20	Sławka Wielka	warmińsko-mazurskie	Pogon	0,01497
21	Szwarcenowo	warmińsko-mazurskie	Bingo	n.w.
Średnio				0,00542

* - brak pewnej informacji o odmianie

** - n.w. – nie wykryto obecności DNA *F. langsethiae*

Tabela 2. Stężenie DNA *Fusarium langsethiae* w próbach ziarna owsa zebranego w 2014 r., pochodzącego z różnych rejonów Polski

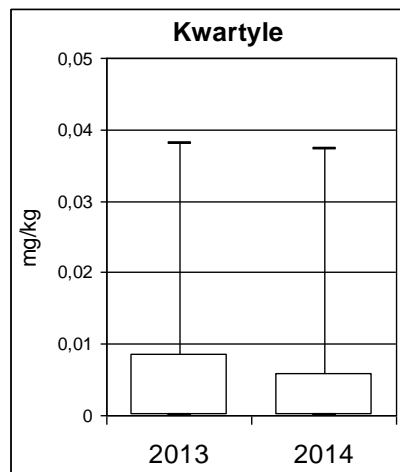
Lp.	Miejscowość	Województwo	Odmiana	Zawartość [mg/kg ziarna]
1	Chrzastowo	kujawsko-pomorskie	Siwek	n.w.**
2	Jacewo	kujawsko-pomorskie	Bingo	n.w.
3	Kończewice	kujawsko-pomorskie	Bingo	n.w.
4	Małe Rudy	kujawsko-pomorskie	-*	n.w.
5	Minikowo	kujawsko-pomorskie	Typhon	n.w.
6	Mochełek	kujawsko-pomorskie	-	0,00965
7	Samokłęski Duże	kujawsko-pomorskie	Zuch	0,10284
8	Wierzbick	kujawsko-pomorskie	-	n.w.
9	Wierzchucin Królewski	kujawsko-pomorskie	Arden	n.w.
10	Karsin	pomorskie	Furman	0,00569
11	Łosino	pomorskie	-	0,00588
12	Zielona Huta	pomorskie	Bingo	n.w.
13	Karłowice	wielkopolskie	Sławko	n.w.
14	Luchowo	wielkopolskie	-	0,00474
15	Sławianowo	wielkopolskie	Furman	0,03735
Średnio				0,01108

* - brak pewnej informacji o odmianie

** - n.w. – nie wykryto obecności DNA *F. langsethiae*

Tabela 3. Zawartość mykotoksyn T-2 i HT-2 w wybranych próbach ziarna owsa zebranego w 2013 i 2014 roku, pochodzącego z różnych miejscowości

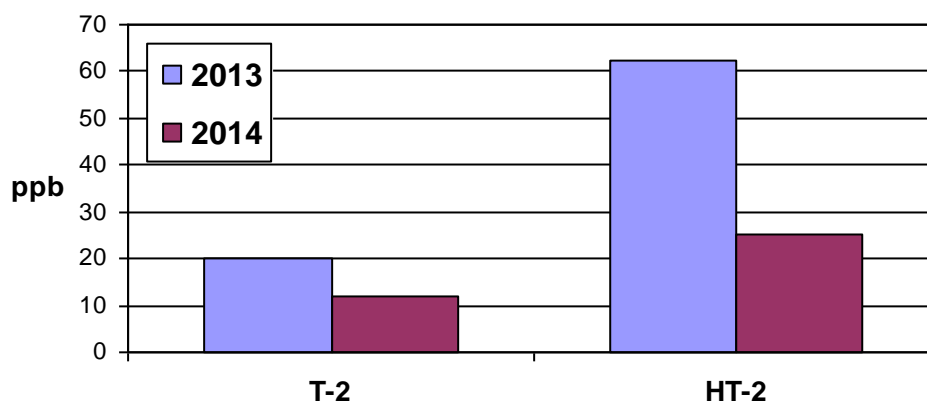
Lp.	Miejscowość	Województwo	Odmiana	Rok	Stężenie mykotoksyn (ppb)	
					T-2	HT-2
1	Biskupiec	warmińsko-mazurskie		2013	53,1	10,4
2	Janów	podlaskie	Bingo	2013	18,0	70,2
3	Ryboły	podlaskie	Rajtar	2013	1,75	57,4
4	Sławka Wielka	warmińsko-mazurskie	Pogon	2013	20,4	117,0
5	Strzelce	łódzkie	Maczo	2013	22,4	94,6
6	Szwarcenowo	warmińsko-mazurskie	Bingo	2013	4,98	24,4
7	Chrzastowo	kujawsko-pomorskie	Siwek	2014	19,9	31,7
8	Karsin	pomorskie	Furman	2014	9,81	28,2
9	Łosino	pomorskie		2014	15,0	40,2
10	Minikowo	kujawsko-pomorskie	Typhon	2014	< 0,6	< 2,0
11	Sławianowo	wielkopolskie	Furman	2014	14,1	25,2
Średnio					16,49	45,48



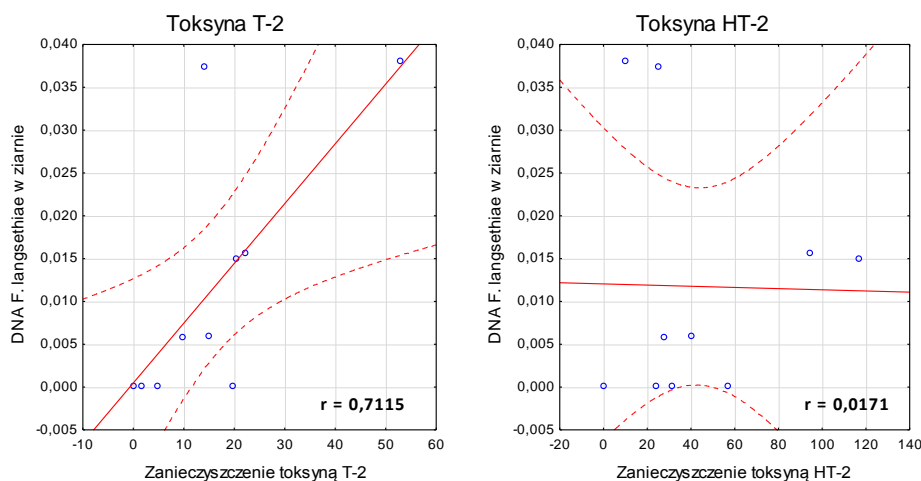
Rys. 7. Monitorowaniem zasiedlenia prób zebranego ziarna owsa przez *Fusarium langsethiae* przy zastosowaniu techniki Real-Time PCR – stężenie DNA *F. langsethiae* w próbach ziarna owsa zebranego w 2013 i 2014 r. (mediana, kwartyl górny i dolny, wartości min. i max.)

We wszystkich przebadanych próbach ziarna stwierdzono obecność toksyn T-2 i HT-2 (tab. 3). W ziarnie pochodzącym z Minikowa zanieczyszczenie było jednak poniżej zakresu dokładności przeprowadzonej analizy. Średnio w większym stopniu ziarno zanieczyszczone było przez toksyn HT-2. Najbardziej zanieczyszczone ziarno toksyną T-2 pochodziło z Biskupiec (53,1 ppb). Toksyny HT-2 było najwięcej w próbach pochodzących ze Sawki Wielkiej (117,0 ppb) oraz Strzelec (94,6 ppb). Silniej zanieczyszczone przez badane toksyny było ziarno owsa zebrane w 2013 niż w 2014 roku (rys. 8).

Stwierdzono istotną zależność pomiędzy zawartością w ziarnie owsa DNA grzyba *F. langsethiae* a zanieczyszczeniem go toksyną T-2 ($r=0,7115$). Próby ziarna owsa zawierające więcej DNA *F. langsethiae* były również silniej zanieczyszczone toksyną T-2 (rys. 9). Nie stwierdzono natomiast istotnej korelacji pomiędzy zawartością w ziarnie DNA *F. langsethiae* a zanieczyszczeniem go przez toksynę HT-2 ($r=-0,017$). Przeprowadzone analizy wskazują na fakt, iż nawet przy słabym zasiedleniu ziarna przez *F. langsethiae* może dojść do znacznego zanieczyszczenia ziarna owsa toksyną T-2 wytwarzaną przez ten gatunek grzyba.



Rys. 8. Zawartość mykotoksyn T-2 i HT-2 w ziarnie owsa zebranym w 2013 i 2014 roku



Rys. 9. Zależność pomiędzy zawartością w ziarnie owsa DNA *F. langsethiae* a zanieczyszczeniem ziarna toksynami T-2 oraz HT-2

Wnioski

- A. Czulość analizy Real-Time PCR na obecność *Fusarium langsethiae* w ziarnie owsa okazała się wystarczająca również w próbach z bardzo niskim zasiedleniem ziarniaków, podczas gdy standardowa analiza mykologiczna nie wykazała obecności tego grzyba.
- B. W ziarnie owsa pochodzącego z pól produkcyjnych stwierdzono stosunkowo małe ilości *F. langsethiae*.
- C. We wszystkich przebadanych próbach ziarna stwierdzono obecność toksyn T-2 i HT-2. Stwierdzono istotną zależność pomiędzy zawartością w ziarnie owsa DNA *F. langsethiae* a zanieczyszczeniem ziarna toksyną T-2.

3.2 Temat badawczy 2

Analiza odporności owsa na porażenie przez *F. langsethiae* prowadzona w formie testu liściowego

Cel tematu badawczego 2

Celem tematu jest poszukiwanie genotypów owsa odpornych lub wykazujących cechy zmniejszonej podatności na porażenie przez izolaty *Fusarium langsethiae* o zróżnicowanej wirulencji.

Materiały i metody

Ocena wrażliwości genotypów owsa na porażenie przez *Fusarium langsethiae* prowadzona została w formie testu liściowego w laboratorium Zakładu Fitopatologii Molekularnej. Badania te obejmowały 31 rodów hodowlanych i 9 zarejestrowanych odmian uprawnych owsa. Do testowania wrażliwości odmian na porażenie przez *F. langsethiae* miały zostać wykorzystane izolaty różniące się zjadliwością wobec owsa.

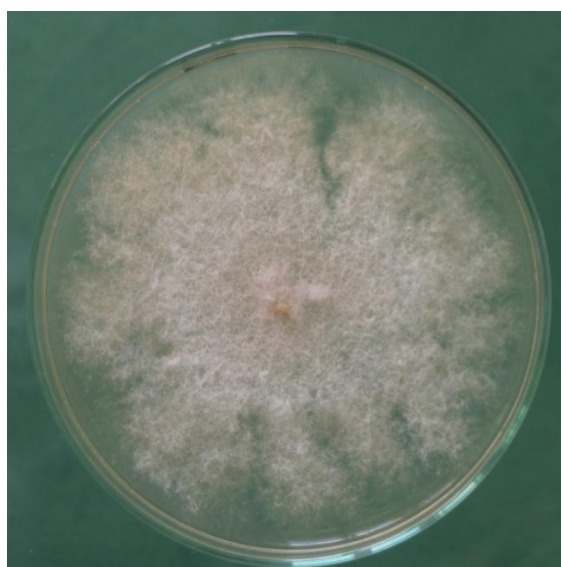
W celu pozyskania izolatów *F. langsethiae* przeprowadzona została izolacja grzybów na pożywce PDA z 35 prób ziarna owsa pochodzącego z pól produkcyjnych. Ziarno odkażano przez 3 minuty w 1% NaOCl, później trzykrotnie płukano w sterylnej wodzie destylowanej i wykładano po 6 sztuk na szalki Petriego z zestawoną pożywką PDA (pH 5,5), a następnie umieszczano w termostacie w temperaturze 22°C. Po 7-10 dniach inkubacji wyrastające kolonie przeszczepiano na skosy agarowe i przeznaczono do dalszego oznaczania. Szczególną uwagę zwrócono na izolaty cechujące się „prószystą” grzybnią powietrzną. Na podstawie

literatury (Schmidt i in. 2004; Torp i Nirenberg 2004) wstępnie zakwalifikowano je jako *F. langsethiae*. Następnie potwierdzano ich przynależność gatunkową metodą molekularną, przy użyciu PCR (Wilson i in. 2004).

Niestety w wyniku przeprowadzonej izolacji nie udało się uzyskać izolatów *F. langsethiae* z ziarna owsa i dlatego do sztucznej inokulacji genotypów owsa wykorzystano izolaty FL 0609 i FL 0809 (fot. 1) pozyskane wcześniej z pszenicy ozimej, znajdujące się w kolekcji Zakładu, a różniące się wirulencją.

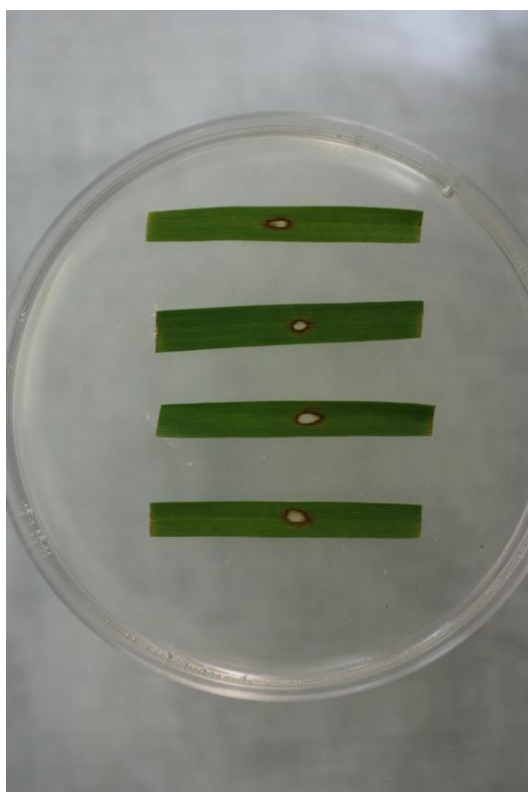


FL 0609



FL 0809

Fot. 1. Izolaty *F. langsethiae* wykorzystane do badań w teście liściowym



Porażenie DC 9031/2 przez FL 0609



Porażenie DC 09026/2 przez FL 0809

Fot. 2. Porównanie objawów porażenia przez *F. langsethiae*

Ocena wrażliwości genotypów owsa wykonana została zgodnie z metodyką opisaną przez Imathiu i in. (2009). Kultury jednozarodnikowe izolatów FL 0609 i FL 0809 grzyba *F. langsethiae* hodowane były na pożywce PDA w temp. 22°C przez 10 dni w ciemności. Zawiesinę zarodników uzyskano poprzez splukiwanie sterylną wodą powierzchni kultury. Do określenia koncentracji zarodników wykorzystano komorę Thoma, a następnie przygotowano zawiesinę o stężeniu 5×10^5 zarodników·ml⁻¹.

Liście różnych genotypów owsa wykorzystane w doświadczeniu pochodziły z dwutygodniowych roślin. Fragmenty długości ok. 4 cm pobierano ze szczytowej części pierwszego liścia. Następnie fragmenty liści uszkodzono mechanicznie w środkowej ich części po stronie doosiowej przy pomocy sterylnych 10 µl końcówek mikropipety. Eksplantaty wyłożono na płytkach Petriego na 0,5% agarze z wodą z dodatkiem kinetyny (10 mg·l⁻¹) stroną odosiową do podłoża przyklejając je delikatnie, aby cała powierzchnia eksplantatu stykała się z podłożem. Na każdej płytce umieszczone po 4 uszkodzone fragmenty liści i na każdy z nich w miejscu uszkodzenia nałożono 5 µl zawiesiny zarodników z dodatkiem TritonuX. Płytki inkubowano w temp. 20°C przez 6 dni. Wrażliwość genotypów określano poprzez mierzenie długości strefy nekrozy tkanki liści (fot. 2).

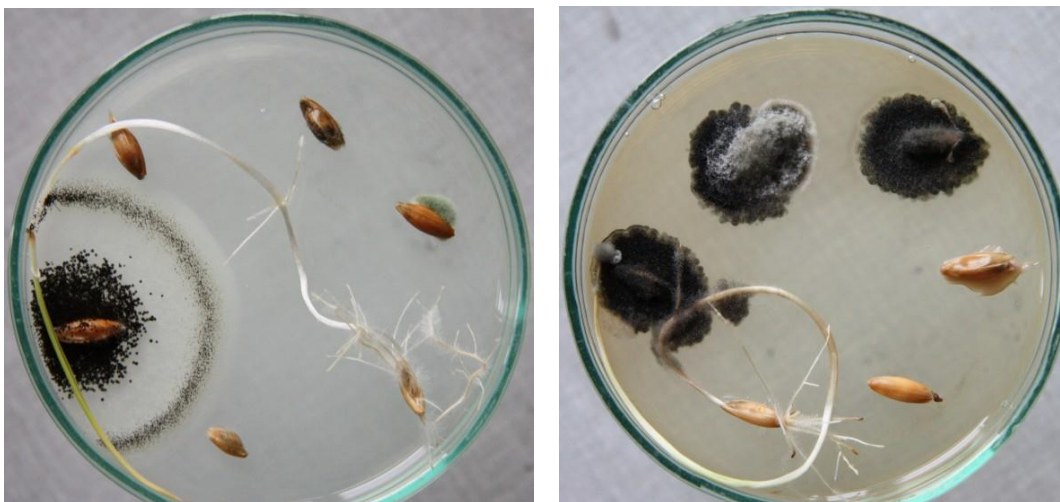
Wyniki

W wyniku przeprowadzonej izolacji grzybów z ziarna owsa pochodzącego z pól produkcyjnych nie udało się uzyskać izolatów *F. langsethiae*. Inne gatunki grzybów nie były przedmiotem badań. Jednak na podstawie pobieżnej analizy można było zauważyć, iż spośród grzybów z rodzaju *Fusarium* dominowały *Fusarium poae*, a znacznie izolowano *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* oraz *F. tricinctum*. Ziarno owsa najczęściej było jednak zasiedlone przez grzyby saprotroficzne, zwłaszcza *Alternaria alternata*, rzadziej *Penicillium* spp. i *Epicoccum* spp. (fot. 3,4).

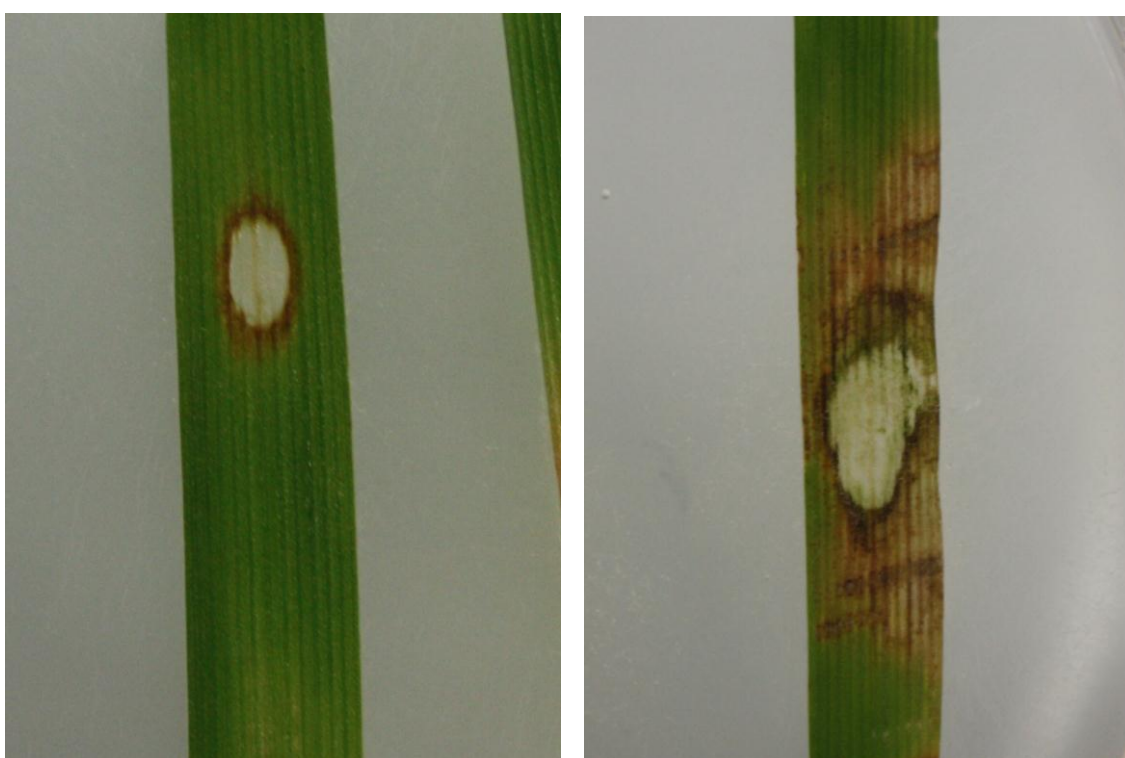
W teście liściowym dla wartości średnich nie stwierdzono większego zróżnicowania w wirulencji badanych izolatów FL 0609 i FL 0809 grzyba *F. langsethiae*. Takie zróżnicowanie obserwowano jedynie dla niektórych genotypów (fot. 5). Nie stwierdzono istotnej zależności pomiędzy zjadliwością wobec owsa izolatu FL 0609 a zjadliwością izolatu FL 0809 ($r=0,493$). Badane izolaty cechowały się podobną zjadliwością względem owsa.



Fot. 3. Kolonie grzybów wyrastające z ziarniaków owsa



Fot. 4. Ziarno owsa słabo zasiedlone przez grzyby



Porażenie przez FL 0609

Porażenie przez FL 0809

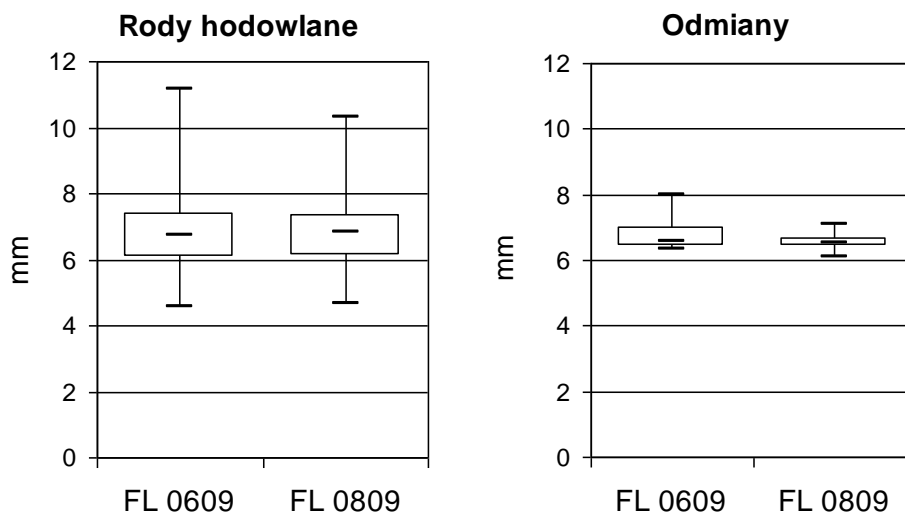
Fot. 5. Porównanie objawów porażenia rodu hodowlanego DC 9031/2 owsa przez dwa różne izolaty *F. langsethiae*

Stwierdzono istotne zróżnicowanie dotyczące wrażliwości pomiędzy zbadanymi 31 rodami hodowlanymi owsa (rys. 9), co zaobserwowano zarówno dla wartości średnich, jak również dla obu izolatów *F. langsethiae*. Średnio najmniej wrażliwymi rodami były: DC 07030a/11/2, DC 08114/3/2, DC 9055/4, a najbardziej wrażliwymi: DC 08124/2/2, DC 9105/9, DC 9107/4 (tab. 4). Zaobserwowano jednak odmienną wrażliwość rodów na poszczególne izolaty *F. langsethiae* ($r = 0,483$). Najmniej wrażliwymi rodami owsa na porażenie przez izolat FL 0609 były: DC 07030a/11/2, DC 09024/8, a najbardziej wrażliwym DC 08124/2/2. Najmniej wrażliwym rodem hodowlanym owsa na porażenie przez izolat FL 0809 były DC 08114/3/2, a najbardziej wrażliwymi: DC 9105/9, DC 9003/4 i DC 9107/4.

Tabela 4. Wrażliwość rodów hodowlanych owsa na porażenie przez dwa izolaty *F. langsethiae* badana w formie testu liściowego - długość strefy nekrozy tkanki liści [mm]

Lp.	Genotyp	Izolat <i>F. langsethiae</i>		Średnio
		FL 0609	FL 0809	
1	DC 08114/3/2	6,2	4,7	5,4
2	DC 07030a/11/2	4,6	5,2	4,9
3	DC 9055/4	6,0	5,5	5,7
4	DC 08121/1/4	7,0	5,6	6,3
5	DC 9099/3	6,6	5,8	6,2
6	DC 6011-8	5,9	5,9	5,9
7	DC 07058a/12/4	6,6	5,9	6,3
8	DC 07136-10/2/4	7,2	6,0	6,6
9	DC 9042/5	6,0	6,2	6,1
10	DC 07116-11/2	7,8	6,2	7,0
11	DC 9041/7	6,5	6,3	6,4
12	DC 9013/6	6,6	6,4	6,5
13	DC 09026/2	6,7	6,8	6,7
14	DC 9071/6	7,6	6,8	7,2
15	DC 9067/8	7,7	6,8	7,2
16	DC 9031/2	6,8	6,8	6,8
17	DC 9076/2	7,3	6,8	7,1
18	DC 9053/4	5,9	7,0	6,4
19	DC 07004a/13/3	7,2	7,0	7,1
20	DC 09024/8	5,6	7,2	6,4
21	DC 07051a/10/2	5,9	7,2	6,5
22	DC 07106a/1/3	6,0	7,3	6,6
23	DC 9005/4	7,3	7,3	7,3
24	DC 9088/10	7,4	7,4	7,4
25	DC 07005a/6/2	7,4	7,7	7,5
26	DC 9012/1	7,8	7,7	7,7
27	DC 08124/2/2	11,2	8,5	9,8
28	DC 9043/6	6,8	8,6	7,7
29	DC 9107/4	7,8	9,3	8,6
30	DC 9003/4	6,2	9,3	7,8
31	DC 9105/9	8,5	10,3	9,4
Średnio		6,9	6,9	6,9

Średnio dla dwóch badanych izolatów *F. langsethiae* nie stwierdzono większego zróżnicowania pomiędzy wrażliwością 9 przebadanymi odmianami owsa (rys. 9). Takie zróżnicowanie stwierdzono jedynie dla izolatu FL 0609. Najmniej wrażliwą odmianą na porażenie przez ten izolat okazały się odmiany Gniady, Zuch, Furman oraz Nagus a najbardziej wrażliwą odmianą była Arab (tab. 5).



Rys. 9. Wrażliwość rodów hodowlanych i odmian uprawnych owsa na porażenie przez *F. langsethiae* badana w formie testu liściowego (mediana, kwartył górny i dolny, wartości min. i max.)

Tabela 5. Wrażliwość odmian owsa na porażenie przez dwa izolaty *F. langsethiae* badana w formie testu liściowego - długość strefy nekrozy tkanki liści [mm]

Lp.	Odmiana	Izolat <i>F. langsethiae</i>		Średnio
		FL 0609	FL 0809	
1	Arab	8,0	6,3	7,1
2	Arden	7,1	6,1	6,6
3	Breton	7,0	7,1	7,0
4	Zuch	6,4	6,4	6,4
5	Furman	6,4	6,4	6,4
6	Berdysz	6,6	6,5	6,5
7	Rajtar	6,7	6,7	6,7
8	Gniady	6,3	6,7	6,5
9	Nagus	6,4	6,6	6,5
Średnio		6,8	6,5	6,6

Wnioski

- A. Zaobserwowano odmienną wrażliwość odmian uprawnych i rodów hodowlanych owsa na poszczególne izolaty *Fusarium langsethiae*.
- B. Stwierdzono istotne zróżnicowanie w podatności analizowanych rodów hodowlanych owsa na porażenie przez *F. langsethiae*. Najmniej wrażliwymi rodzajami były DC 07030a/11/2, DC 08114/3/2 i DC 9055/4, a najbardziej wrażliwymi DC 08124/2/2, DC 9105/9 i DC 9107/4.
- C. Nie stwierdzono istotnych różnic w podatności analizowanych odmian uprawnych owsa na porażenie przez *F. langsethiae*.
- D. Do tej pory nie stwierdzono istnienia genotypów owsa odpornych na porażenie przez *F. langsethiae*.

3. 3. Temat badawczy 3

Analiza odporności owsa na *F. langsethiae* na podstawie jego analizy ilościowej w ziarnie techniką Real-Time PCR.

Cel tematu badawczego 3

Celem tematu jest poszukiwanie genotypów owsa odpornych lub wykazujących cechy zmniejszonej podatności na porażenie przez *F. langsethiae* na podstawie jego analizy ilościowej w ziarnie techniką Real-Time PCR.

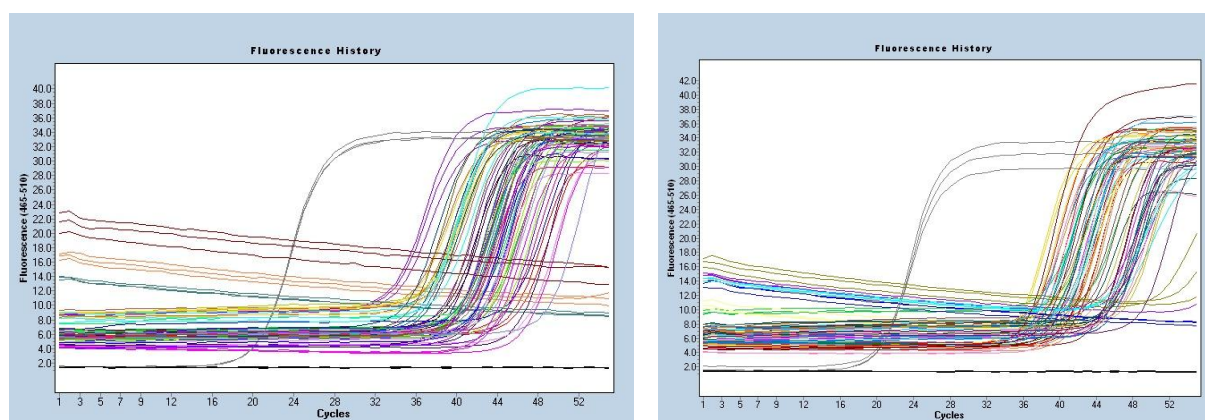
Materiały i metody

W ramach poszukiwania źródeł odporności przeprowadzono analizę ilościową i jakościową zasiedlenia ziarna linii hodowlanych i odmian uprawnych owsa przez *F. langsethiae*. Materiał badawczy pozyskano od firm zajmujących się hodowlą oraz dystrybucją owsa, tj. Zakładu Nasiennie-Rolnego w Kopaszewie (DANKO Hodowla Roślin sp. z o.o.), z Minikowa (Przedsiębiorstwa Nasiennego "ROLNAS" Sp. z o.o.) oraz z Chrzastowa (Stacji Doświadczalnej Oceny Odmian). Badania przeprowadzono przy użyciu techniki Real-Time PCR, umożliwiającej określenie ilości materiału genetycznego grzyba w ziarnie. Określanie ilości DNA *F. langsethiae* w ziarnie 40 prób w 3 powtórzeniach (31 rodów hodowlanych i 9 odmian uprawnych owsa), uzyskanego z genotypów owsa, wykonano podobnie jak w temacie badawczym nr 1. Badania te przeprowadzono w Zakładzie Fitopatologii Molekularnej UTP w Bydgoszczy.

Wyniki

Na podstawie analizy ilościowej *F. langsethiae* w ziarnie owsa techniką Real-Time PCR (rys. 7) stwierdzono istotne zróżnicowanie dotyczące wrażliwości pomiędzy przebadanymi 31 rodami hodowlanymi (tab. 6). Obecność tego patogena stwierdzono w ziarnie 9 rodów hodowlanych. Najwięcej DNA *F. langsethiae* odnotowano w ziarnie rodu DC 9071/6 (0,05454 mg/kg), następnie DC 08114/3/2 (0,0435 mg/kg), DC 9088/10 (0,02982 mg/kg), DC 9042/5 (0,02867 mg/kg) i DC 07106a/1/3 (0,02475 mg/kg). W ziarnie pozostałych rodów grzyba tego było znacznie mniej lub jego obecności nie stwierdzono.

Ze względu na to, iż po raz pierwszy *F. langsethiae* został stwierdzony w próbach pochodzących z Chrzastowa i Minikowa dlatego w badaniach zasiedlenia ziarna genotypów owsa uwzględniono te miejscowości. Wykorzystując technikę Real-Time PCR (rys. 7) nie stwierdzono produktów specyficznych dla *F. langsethia* w ziarnie owsa 7 odmian pochodzących z Minikowa (tab. 7). W związku z tym nie można było ustalić wrażliwości tych odmian na porażenie tego patogena. W ziarnie 4 odmian owsa, spośród 5 przebadanych, pochodzących z Chrzastowa stwierdzono produkt specyficzny dla *F. langsethia*. Obecności *F. langsethia* nie stwierdzono w ziarnie owsa nieoplewionego (Nagus). Spośród odmian owsa oplewionego najmniej DNA grzyba stwierdzono w ziarnie odmiany Arden (0,0138 mg/kg). Najwięcej grzyba *F. langsethia* stwierdzono w ziarnie owsa odmiany Typhon (0,0351 mg/kg). W ziarnie 2 odmian owsa, spośród 7 przebadanych, pochodzących z Kopaszewa wykryto obecność produktu specyficznego dla *F. langsethia*. Grzyb ten został stwierdzony tylko w ziarnie odmiany Furman (0,02508 mg/kg), a znacznie mniej było go w odmianie Gniady (0,0012 mg/kg). Dla średniej z odmian znacznie więcej DNA *F. langsethia* stwierdzono w próbach pochodzących z Chrzastowa (0,01809 mg/kg) niż z Kopaszewa (0,0036).



Rys. 7. Przebieg reakcji Real-Time PCR dla prób ziarna różnych rodów hodowlanych i odmian uprawnych owsa na obecność *F. langsethiae*

Tabela 6. Wrażliwość rodów hodowlanych owsa na porażenie przez *F. langsethiae* badana na podstawie ilościowej analizy DNA grzyba w ziarnie owsa techniką Real-Time PCR

Lp.	Rody hodowlane	Zawartość [mg/kg ziarna]
1	DC 6011-8	n.w.*
2	DC 07116-11/2	n.w.
3	DC 07136-10/2/4	n.w.
4	DC 07004a/13/3	n.w.
5	DC 07005a/6/2	n.w.
6	DC 07030a/11/2	n.w.
7	DC 07051a/10/2	n.w.
8	DC 07058a/12/4	0,00102
9	DC 07106a/1/3	0,02475
10	DC 08114/3/2	0,0435
11	DC 08121/1/4	n.w.
12	DC 08124/2/2	0,00824
13	DC 9003/4	0,00012
14	DC 9005/4	n.w.
15	DC 9012/1	n.w.
16	DC 9013/6	n.w.
17	DC 09024/8	n.w.
18	DC 09026/2	n.w.
19	DC 9031/2	n.w.
20	DC 9041/7	n.w.
21	DC 9042/5	0,02867
22	DC 9043/6	n.w.
23	DC 9053/4	n.w.
24	DC 9055/4	n.w.
25	DC 9067/8	0,00975
26	DC 9071/6	0,05454
27	DC 9076/2	n.w.
28	DC 9088/10	0,02982
29	DC 9099/3	n.w.
30	DC 9105/9	n.w.
31	DC 9107/4	n.w.
Średnio		0,00646

* - n.w. – nie wykryto obecności DNA *F. langsethiae*.

Nie stwierdzono większego zróżnicowania pomiędzy występowaniem *F. langsethia* w ziarnie rodów hodowlanych owsa a ziarnem odmian uprawnych. Średnia zawartość DNA tego grzyba wynosiła odpowiednio 0,00646 mg/kg - dla rodów oraz 0,0061 mg/kg - dla odmian (rys. 10).

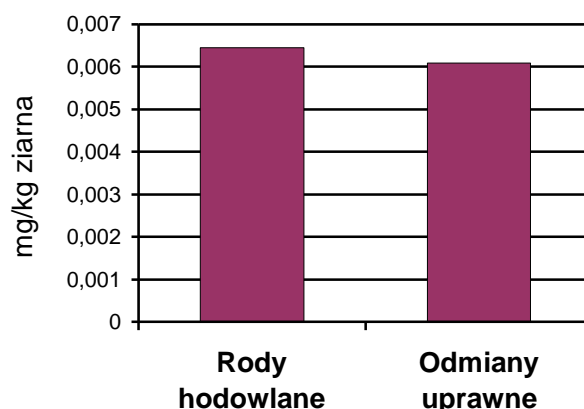
Na podstawie przeprowadzonych badań nie stwierdzono istotnych zależności pomiędzy wrażliwością rodów hodowlanych określaną w teście liściowym a wrażliwością określaną na podstawie analizy ilościowej DNA *F. langsethiae* w ziarnie owsa techniką Real-Time PCR (rys. 11). Zależności takiej nie obserwowano zarówno dla średniej z testu liściowego ($r = 0,095$), jak również dla poszczególnych izolatów, tj. izolatu FL 0609 ($r = 0,034$) oraz FL 0809 ($r = -0,187$). Rody które okazały się bardziej wrażliwe na porażenie przez *F. langsethia* nie zawierały więcej tego patogena w zebranych ziarnie.

Tabela 7. Wrażliwość odmian uprawnych owsa na porażenie przez *F. langsethiae* badana na podstawie ilościowej analizy DNA grzyba techniką Real-Time PCR, w trzech miejscowościach [mg/kg ziarna]

Lp.	Odmiana	Miejscowość		
		Chrząstowo	Kopaszewo	Minikowo
1	Arden	0,0138	n.w.*	n.w.
2	Nagus	n.w.	n.w.	n.w.
3	Zuch	0,02016	n.w.	n.w.
4	Poseidon	0,02140	-**	n.w.
5	Typhon	0,03507	-	n.w.
6	Berdysz	-	n.w.	n.w.
7	Breton	-	n.w.	n.w.
8	Furman	-	0,02508	-
9	Gniady	-	0,00012	-
Średnio		0,01809	0,00360	n.w.

* - n.w. – nie wykryto obecności DNA *F. langsethiae*.

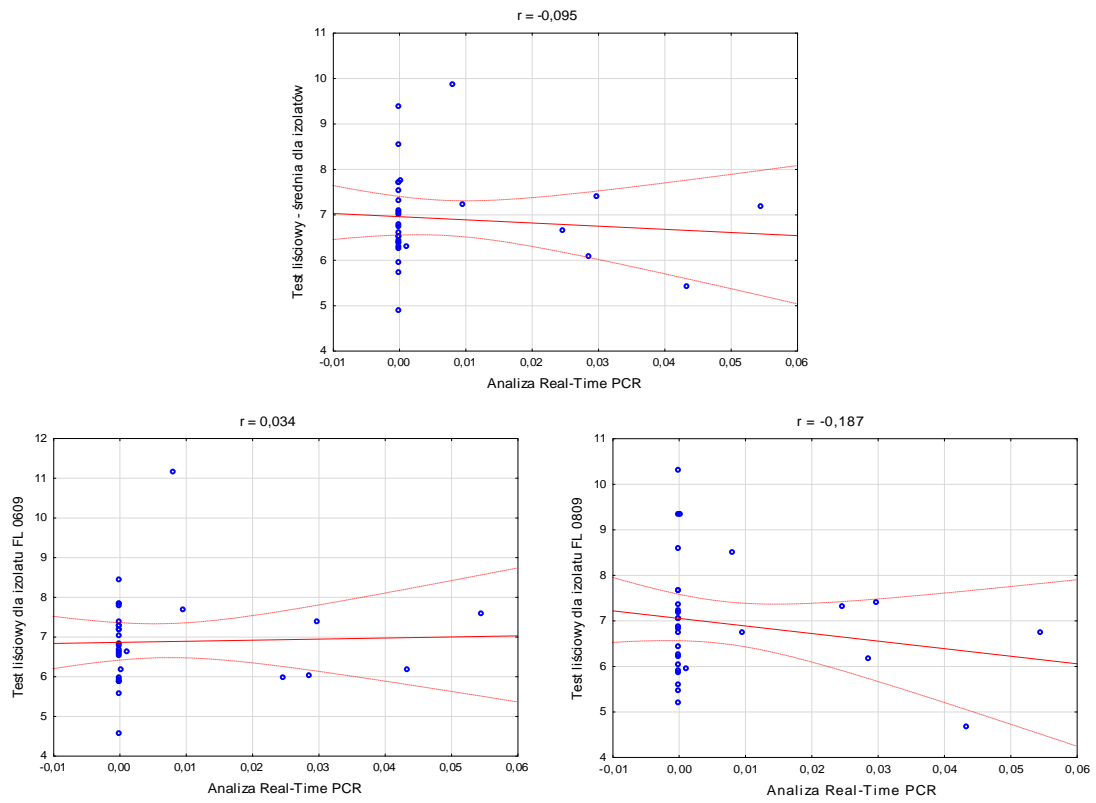
** - odmiana nie była testowana



Rys. 10. Średnie występowanie *F. langsethiae* w ziarnie rodów hodowlanych owsa i odmian uprawnych

Wnioski

- Czułość analizy Real-Time PCR na obecność *F. langsethiae* w ziarnie owsa okazała się przydatna w określaniu podatności owsa na porażenie przez tego patogena.
- Stwierdzono istotne zróżnicowanie w zasiedleniu przez *F. langsethiae* ziarna rodów hodowlanych owsa. Najwięcej DNA grzyba odnotowano dla rodu DC 9071/6, następnie DC 08114/3/2, DC 9088/10, DC 9042/5 i DC 07106a/1/3.
- Nie stwierdzono większego zróżnicowania pomiędzy występowaniem *F. langsethia* w ziarnie rodów hodowlanych owsa a ziarnem odmian uprawnych.
- Nie stwierdzono istotnej zależności pomiędzy wrażliwością rodów hodowlanych określaną w teście liściowym a wrażliwością określaną na podstawie ilości DNA *F. langsethiae* w ziarnie owsa ustaloną przy pomocy techniki Real-Time PCR.



Rys. 11. Zależność pomiędzy wrażliwością rodów hodowlanych określaną w teście liściowym a wrażliwością określaną na podstawie ilościowej analizy DNA *F. langsethiae* w ziarnie owsa techniką Real-Time PCR