

## SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE

z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2015 roku

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

Decyzja MRiRW:

**HOR hn – 801 – PB – 8/15 z dnia 25 września 2015 r., zadanie nr 29**

Okres realizacji zadania:

**01.01.2015–31.12.2015**

Podmiot realizujący zadanie:

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

Kierownik zadania:

**dr hab. inż. Grzegorz Lemańczyk, prof. nadzw. UTP**

Zakład Fitopatologii Molekularnej Katedry Entomologii i Fitopatologii Molekularnej

Wydział Rolnictwa i Biotechnologii, UTP w Bydgoszczy

Ul. Ks. A. Kordeckiego 20

85-225 Bydgoszcz

tel.: 52 3749491 / 52 3749342

e-mail: Grzegorz.Lemanczyk@utp.edu.pl

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 *F. langsethiae* dla owsa uprawianego w Polsce, określonego na podstawie zanieczyszczenia prób ziarna pochodzących z pól produkcyjnych grzybem oraz na podstawie poziomu skażenia tego ziarna wybranymi mykotoksynami (T-2 i HT-2), wytworzonymi w ziarnie w następstwie porażenia tym gatunkiem w warunkach naturalnych. Cel założony na rok 2015 został osiągnięty, jednak badania wymagają kontynuacji ze względu na duży wpływ czynników środowiskowych na występowanie grzybów rodzaju *Fusarium*.

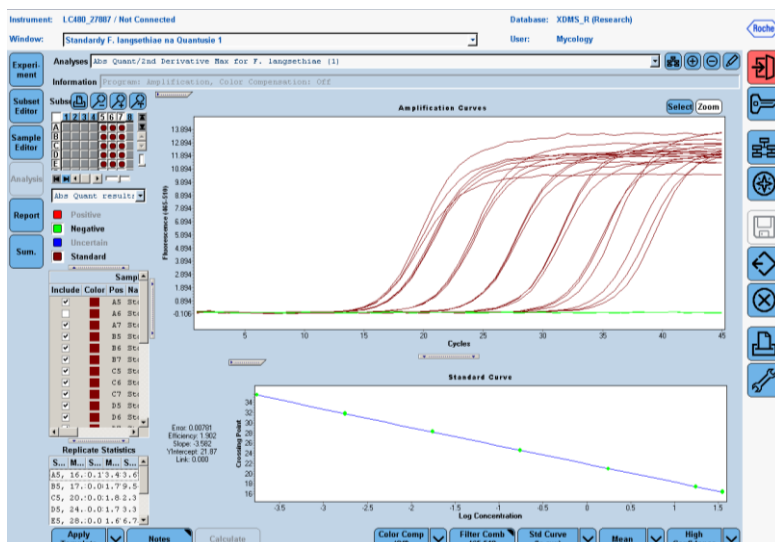
#### Materiały i metody

Przeprowadzony został monitoring zasiedlenia zebranego ziarna owsa przez *F. 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. Monitoring zasiedlenia ziarna owsa przez *F. langsethiae* przeprowadzono dla 40 prób owsa zebranych w 2015 roku, pochodzących z pól produkcyjnych, położonych w dziewięciu województwach: 11 prób pochodziło z województwa kujawsko pomorskiego, 6 prób z woj. mazowieckiego, 5 z woj. pomorskiego, po 4 próby z woj. wielkopolskiego, łódzkiego i lubelskiego, 3 próby z woj. zachodniopomorskiego, 2 próby z woj. małopolskiego i 1 próba z woj. lubuskiego (rys. 1).



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

Krzywą standardową dla *F. langsethiae* przygotowano wykorzystując czystą kulturę izolatu FL 0809. Izolację DNA grzyba przeprowadzono zgodnie ze zmodyfikowanym protokołem wg Doyle i Doyle (1990). Krzywa standardowa (rys. 2) 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  $Mg^{2+}$ .



Rys. 2. Przygotowanie krzywej standardowej dla *F. langsethiae* (standardy – od 350 ng do 0,0035 ng DNA *F. langsethiae* FL 0809; wydajność reakcji 1,902)

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 2,0 ml pobrano 100 mg i zalano 600  $\mu$ 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 wykorzystując fluorometr Quantus (Promega), a do dalszych analiz Real-Time PCR wszystkie próbki rozcieńczono w dejonizowanej wodzie sterylnej do stężenia 100  $ng \cdot \mu l^{-1}$ . Reakcję przeprowadzono w LightCycler 480II z użyciem LightCycler 480 SYBR Green I Master. 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°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.

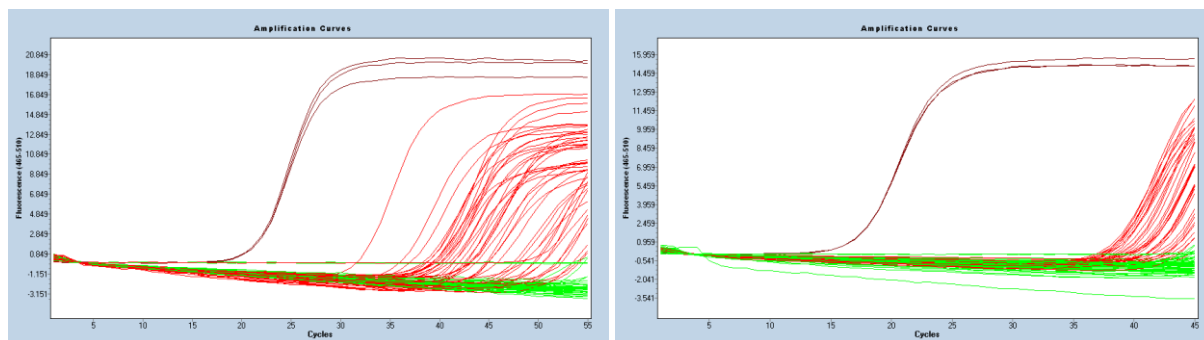
Monitoring uzupełniono z wykorzystaniem tradycyjnych metod badawczych polegających na izolacji grzybów na sztucznej pożywce mikrobiologicznej. Tę technikę zastosowano również w celu pozyskania izolatów *F. langsethiae* do dalszych badań związanych z testowaniem wrażliwości genotypów owsa. Ze względu na to, iż z prób owsa pochodzących z 2014 r. udało się uzyskać tylko jeden izolat *F. langsethiae* istniała konieczność kontynuacji tych badań. Izolacja grzybów na pożywce PDA przeprowadzona została z 40 prób ziarna owsa pochodzących z pól produkcyjnych. Ziarno odkażano przez

w NaOCl, trzykrotnie płukano w sterylnej wodzie destylowanej i wykładano po 6 sztuk na szalki Petriego z zestaloną pożywką PDA (pH 5,5), a następnie umieszczano w termostacie w temperaturze 22°C. Na jedną próbę składało się 100 ziarniaków owsa. 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 techniki PCR (Wilson i in. 2004).

Ponadto dla wybranych 11 prób ziarna owsa, pochodzących z pól produkcyjnych, wykonano analizę dotyczącą zanieczyszczenia ziarna toksyną T2 i HT-2. Ze względu na bardzo duże koszty takich analiz wybrano tylko 11 prób, reprezentujące różne rejony Polski. 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

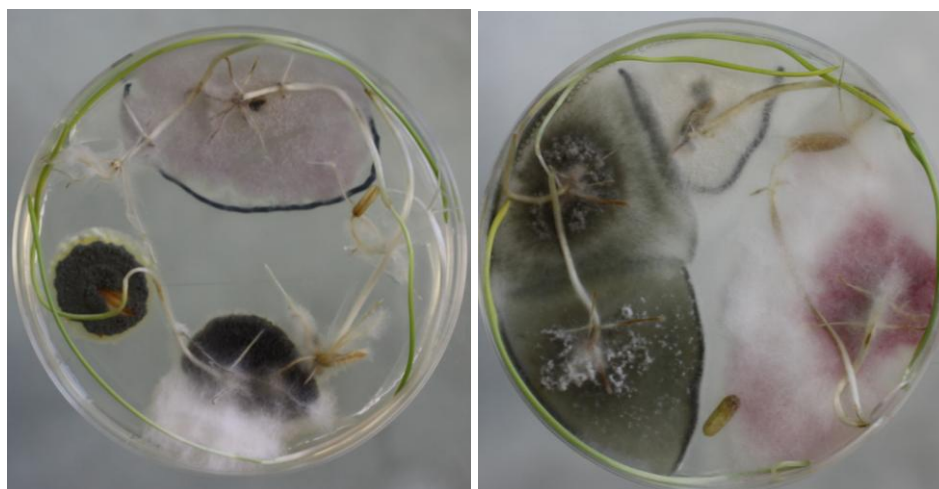
Reakcja Real-Time PCR została przeprowadzona z użyciem niespecyficznego barwnika SYBR Green I, który wiąże wszystkie dwuniciowe fragmenty DNA znajdujące się w badanej próbce, przez co może wykrywać także niespecyficzne produkty reakcji. W celu potwierdzenia uzyskania produktu docelowego została przeprowadzona analiza krzywej topnienia, 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. W części prób powstawał tylko produkt niespecyficzny, czyli nie stwierdzono obecności DNA *F. langsethiae*.



Rys. 3. Przebieg reakcji Real-Time PCR dla prób ziarna owsa pochodzących z różnych rejonów Polski na obecność *F. langsethiae*

Na podstawie dotychczasowych przeprowadzonych analiz Real-Time PCR (rys. 3) stwierdzono niezbyt duże zasiedlenie przez *F. langsethiae* ziarna owsa zebranego z pól produkcyjnych w 2015 r. Średnio stężenie DNA grzyba *F. langsethiae* w ziarnie owsa wynosiło 66,13 ng w 1 kg ziarna. Jednak nie we wszystkich próbach wykryto *F. langsethiae*. Spośród 40 przeanalizowanych prób obecność *F. langsethiae* stwierdzono w 12 próbach. Najwięcej DNA *F. langsethiae* odnotowano w próbach ziarna owsa pochodzącego z miejscowości Dobrze (936 ng/kg) i z Bieganowa (852 ng/kg), a następnie Strzelec (323,25 ng/kg). Rozpatrując występowanie grzyba w zależności od województwa można zauważyć, iż najwięcej DNA *F. langsethiae* stwierdzono w próbach ziarna owsa pochodzącego z województwa łódzkiego (226,25 ng/kg), następnie woj. kujawsko-pomorskiego (138,1 ng/kg), pomorskiego (30,75 ng/kg), małopolskiego (12,94 ng/kg), wielkopolskiego (2,53 ng/kg) i zachodniopomorskiego (1,18 ng/kg). W próbach pochodzących z trzech pozostałych badanych województw grzyba tego nie stwierdzono.

W wyniku przeprowadzonej izolacji grzybów na sztucznej pożywce mikrobiologicznej PDA, z ziarna owsa pochodzącego z pól produkcyjnych owsa, spośród 40 oznaczonych prób ziarna, z 5 prób uzyskano po jednym izolacie *F. langsethiae* (fot. 1). Inne gatunki grzybów nie były głównym przedmiotem badań, jednak ich występowanie mogło znacząco wpływać na liczbę uzyskanych izolatów *F. langsethiae*. Z tego względu zostały one również uwzględnione w analizie. Ziarno owsa najczęściej było zasiedlone przez grzyby saprotroficzne, zwłaszcza *Alternaria alternata*, rzadziej *Penicillium* spp. i *Epicoccum* spp. (fot. 2). Spośród grzybów rodzaju *Fusarium* dominowały *Fusarium poae*, a znacznie rzadziej izolowano *F. avenaceum*, *F. sporotrichoides*, *F. tricinctum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* oraz *F. equiseti* (fot. 3).



Fot. 1. Kolonie *F. langsethiae* wyrastające z ziarniaków owsa



Fot. 2. Kolonie grzybów wyrastające z ziarniaków owsa



Fot. 3. Kolonie *Alternaria alternata* i *Fusarium poae* wyrastające z ziarno owsa



W 10 spośród 11 przebadanych prób ziarna owsa pochodzących z pól produkcyjnych stwierdzono obecność toksyn T-2 i HT-2 (tab. 1). Tylko w ziarnie owsa pochodzącego z Minikowa nie stwierdzono obecności tych toksyn. Średnio w większym stopniu ziarno zanieczyszczone było przez toksynę HT-2 (19,642 ppb) niż toksynę T-2 (6,655 ppb). Najbardziej zanieczyszczone ziarno toksyną T-2 pochodziło z Kończewa (31,1 ppb). Toksyny HT-2 było również najwięcej w próbach pochodzących z Kończewa (77,9 ppb). Silniej zanieczyszczone przez badane toksyny było ziarno owsa oplewionego niż ziarna owsa nieoplewionego.

Stwierdzono istotną zależność pomiędzy zawartością w ziarnie owsa DNA grzyba *F. langsethiae* a zanieczyszczeniem go toksyną T-2 ( $r=0,637$ ). Próby ziarna owsa zawierające więcej DNA *F. langsethiae* były również silniej zanieczyszczone toksyną T-2. Nie stwierdzono natomiast istotnej korelacji pomiędzy zawartością w ziarnie DNA *F. langsethiae* a zanieczyszczeniem go przez toksynę HT-2. 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.

#### Wnioski

- A. W ziarnie owsa pochodzącego z pól produkcyjnych stwierdzono stosunkowo małe stężenie DNA *F. langsethiae*,
- B. Przeprowadzone badania wskazują, iż czułość analizy Real-Time PCR na obecność *F. langsethiae* w ziarnie owsa okazała się wystarczająca również w próbach z bardzo niskim zasiedleniem ziarniaków, podczas gdy standardowa analiza mykologiczna wykazała sporadyczną obecność tego grzyba,
- C. W 10 spośród 11 przebadanych próbach ziarna owsa stwierdzono obecność toksyn T-2 i HT-2. Zanieczyszczenie ziarna tymi toksynami nie zależało tylko od występowania *F. langsethiae*.

#### 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 *F. langsethiae* o zróżnicowanej wirulencji. Cel ten został osiągnięty częściowo, gdyż nie udało się wyodrębnić genotypów odpornych. Wyróżniono jednakże genotypy mniej wrażliwe na porażenie.

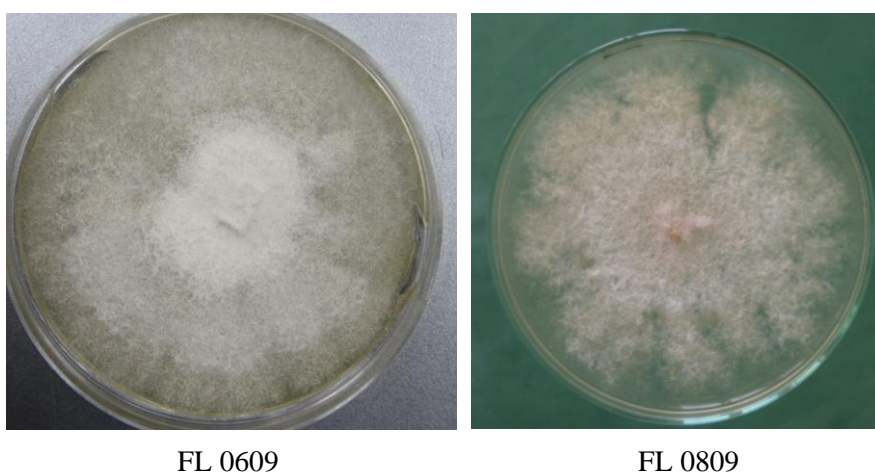
##### Materiały i metody

Ocena wrażliwości genotypów owsa na porażenie przez *F. langsethiae* przeprowadzona została w formie testu liściowego w laboratorium Zakładu Fitopatologii Molekularnej Katedry Entomologii i Fitopatologii Molekularnej UTP w Bydgoszczy. Badania te obejmowały 40 genotypów owsa, w tym 3 gatunki: owies zwyczajny (*Avena sativa*) – zarówno genotypy owsa o ziarnie oplewionym jak i ziarnie nieoplewionym, owies szorstki (*Avena strigosa*) i owies głuchy (*Avena fatua*). Na przebadane genotypy owsa składało się 6 zarejestrowanych odmian uprawnych owsa, 1 próba owsa szorstkiego, 1 próba owsa głuchego oraz 32 rodów hodowlanych. Materiał badawczy pozyskano od firm zajmujących się hodowlą oraz dystrybucją materiału siewnego owsa, tj. DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o., Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR, Małopolska Hodowla Roślin Spółka z o.o., Przedsiębiorstwo Nasienne "ROLNAS" Sp. z o.o. oraz COBORU Stacja Doświadczalna Oceny Odmian w Chrzastowie. Do sztucznej inokulacji liści owsa wykorzystane zostały 3 izolaty *F. langsethiae*. 2 izolaty tego grzyba (FL 0609 i FL 0609) uzyskano z ziarna pszenicy ozimej, a jeden izolat pozyskano z ziarna owsa (FL 11H41).

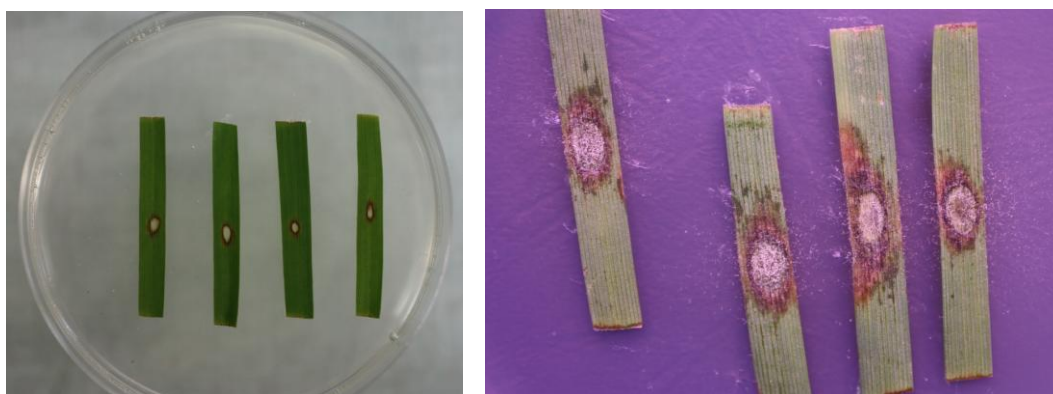
W sumie przetestowano 120 prób.

W celu pozyskania izolatów *F. langsethiae* przeprowadzona została izolacja grzybów na pożywce PDA z 40 prób ziarna owsa pochodzącego z pól produkcyjnych oraz 40 prób, na które składały się różne badane na wrażliwość genotypy owsa. Niestety przed przystąpieniem do testowania wrażliwości genotypów owsa, w wyniku przeprowadzonej izolacji udało się uzyskać tylko 1 izolat *F. langsethiae* z ziarna owsa (11H41), dlatego do sztucznej inokulacji genotypów owsa wykorzystano 2 izolaty (FL 0609 i FL 0809, fot. 4) pozyskane wcześniej z pszenicy ozimej, znajdujące się w kolekcji Zakładu, a różniące się wirulencją.

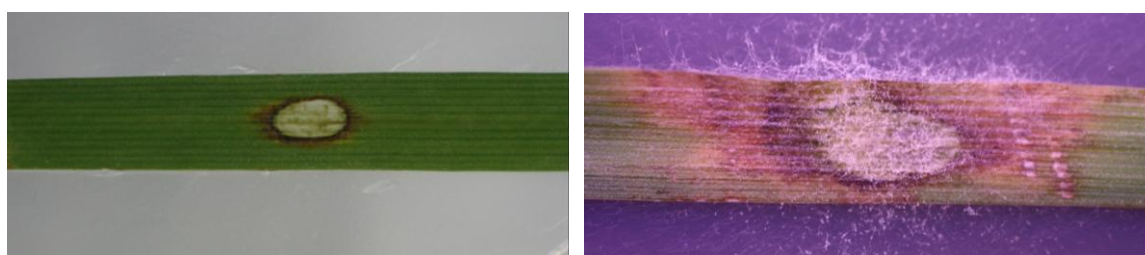
Ocena wrażliwości genotypów owsa wykonana została zgodnie z metodyką opisaną przez Imathiu i in. (2009). Kultury jednozarodnikowe wybranych izolatów *F. langsethiae* hodowane były na pożywce PDA w temp. 22°C przez 10 dni w ciemności. Zawiesinę zarodników uzyskano poprzez splukiwanie sterylną wodą powierzchni kultury a zawiesinę zbierano za pomocą pipety automatycznej. Do określenia koncentracji zarodników wykorzystano komorę Thoma, za pomocą której przygotowano zawiesinę o stężeniu  $5 \times 10^5$  zarodników·ml.



Fot. 4. Izolaty *F. langsethiae* wykorzystane do badań w teście liściowym



Fot. 5. Test liściowy - porównanie objawów porażenia przez *F. langsethiae*



Fot. 6. Porażenie dwóch genotypów owsa przez izolat FL 0809 *F. langsethiae*

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 stroną odosiową do podłoża przyklejając je delikatnie, aby cała powierzchnia eksplantatu stykała się z podłożem. Na każdej płytce umieszczone po 4 uszkodzone fragmenty. Płytki inkubowano w temp. 20°C przez 6 dni. Wrażliwość genotypów określano poprzez mierzenie długości strefy nekrozy (fot. 5, 6).

#### Wyniki

W przeprowadzonym teście liściowym wykazano silniejszą wirulencję izolatu *F. langsethiae* uzyskanego z owsa (FL 11H41) w porównaniu z izolatami uzyskanymi z pszenicy (FL 0609, FL 0809). Średnio długość strefy z wyraźnymi zmianami chorobowymi na liściach owsa powodowanymi przez izolat FL 11H41 wynosiła 15,1 mm, dla izolatu FL 0609 – 12,9 mm, a izolatu FL 0809 – 11,5 mm.

Porażeniu przez *F. langsethiae* uległy genotypy owsa zwyczajnego jak i owies szorstki oraz owies głuchy. Średnia długość strefy z nekrozą na badanych liściach dla genotypów owsa o ziarnie oplewionym wynosiła 13 mm, owsa o ziarnie nieoplewionym – 7,3 mm, owsa szorstkiego – 9,6 mm a owsa głuchego – 10,5 mm.

Wszystkie przebadane genotypy owsa były porażane przez *F. langsethiae*. Stwierdzono jednak wyraźne zróżnicowanie w ich podatności. Wśród 32 przebadanych rodów hodowlanych odnotowano istotne różnice w ich podatności na *F. langsethiae*, co zaobserwowano zarówno dla wartości średnich, jak również dla wszystkich trzech izolatów *F. langsethiae*. Średnio dla trzech izolatów *F. langsethiae*, jak i izolatu uzyskanego z owsa, najmniej wrażliwym był ród DC 08114/3/2 (6,3 mm), a najbardziej wrażliwym ród DC 09130/2 (22,5 mm). Ogólnie zaobserwowano jednak odmienną wrażliwość rodów na poszczególne izolaty *F. langsethiae*. Najmniej wrażliwymi rodami owsa na porażenie przez izolat FL 0609 były: DC 07030a/11/2 i POB 762/11, a najbardziej wrażliwym DC 09130/2. Najmniej wrażliwym rodem hodowlanym owsa na porażenie przez izolat FL 0809 były DC 08114/3/2, a najbardziej wrażliwym DC 09130/2.

Średnio dla trzech badanych izolatów *F. langsethiae* stwierdzono wyraźne zróżnicowanie pomiędzy wrażliwością 6 przebadanych odmian owsa. Najmniej wrażliwymi odmianami na porażenie okazały się odmiany Bingo i Amant, a najbardziej wrażliwą była odmiana Haker. Na izolat *F. langsethiae* uzyskany z owsa zwyczajnego (FL 11H41) najmniej wrażliwą była odmiana Amant, a najbardziej wrażliwą okazała się odmiana Nawigator.

#### Wnioski

- A. Izolat *F. langsethiae* uzyskany z owsa cechował się silniejszą wirulencją w porównaniu z izolatami pozyskanymi z pszenicy.
- B. Stwierdzono istotne zróżnicowanie w podatności analizowanych rodów hodowlanych owsa na porażenie przez *F. langsethiae*. Najmniej wrażliwym był ród DC 08114/3/2, a najbardziej wrażliwym DC 09130/2,
- C. Spośród przebadanych odmian najmniej wrażliwymi na *F. langsethiae* okazały się odmiany Bingo i Amant,
- D. Do tej pory nie stwierdzono istnienia genotypów owsa odpornych na porażenie przez *F. langsethiae*,
- E. Wszystkie cztery przebadane gatunki owsa były porażane 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. Cel ten został osiągnięty.

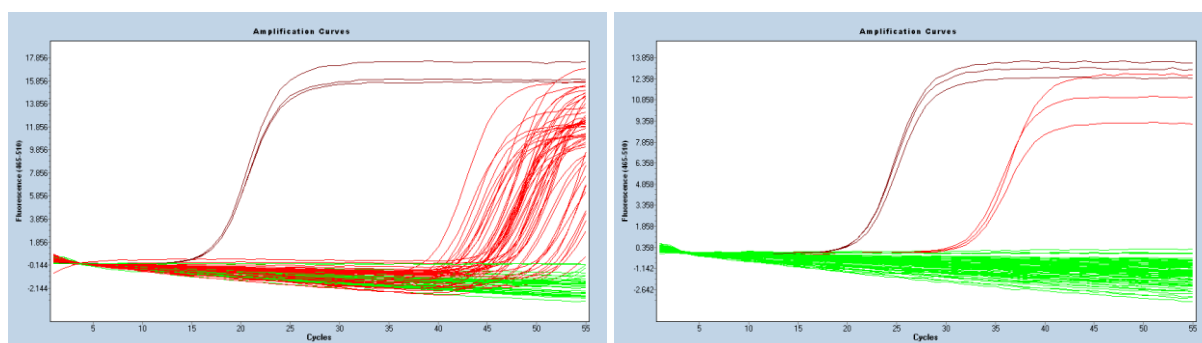
### Materiały i metody

W ramach poszukiwania źródeł odporności przeprowadzono również analizę ilościową i jakościową zasiedlenia ziarna rodów hodowlanych, odmian uprawnych owsa, różnych gatunków owsa (w tym owsa szorstkiego i owsa głuchego) przez *F. langsethiae*. Materiał badawczy pozyskano od firm zajmujących się hodowlą oraz dystrybucją materiału siewnego owsa, tj. DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o., Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR, Małopolska Hodowla Roślin Spółka z o.o., Przedsiębiorstwo Nasienne "ROLNAS" Sp. z o.o. oraz COBORU Stacja Doświadczalna Oceny Odmian w Chrzastowie. 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 (29 rodów hodowlanych i 9 odmian uprawnych owsa zwyczajnego oraz po jednej próbie gatunków owies szorstki i owies głuchy) wykonano podobnie jak w temacie badawczym nr 1. Badania te przeprowadzono w Zakładzie Fitopatologii Molekularnej UTP w Bydgoszczy.

W celu pozyskania izolatów *F. langsethiae* do dalszych badań związanych z testowaniem wrażliwości genotypów owsa przeprowadzono również izolację grzybów na pożywce mikrobiologicznej. Izolacja grzybów na pożywce PDA przeprowadzona została z 40 prób ziarna wykorzystywanych do testowania wrażliwości genotypów owsa. Izolację wykonano w taki sam sposób jak w przypadku badań dotyczących izolacji grzybów z ziarna pochodzącego z monitoringu występowania *F. langsethiae* w Polsce

### Wyniki

Na podstawie przeprowadzonej analizy ilościowej *F. langsethiae* w ziarnie owsa techniką Real-Time PCR (rys. 4) stwierdzono istotne zróżnicowanie dotyczące wrażliwości pomiędzy przebadanymi gatunkami owsa. Spośród wszystkich przebadanych genotypów owsa największe stężenie DNA *F. langsethiae* stwierdzono w ziarnie owsa głuchego – 9975 ng/kg, natomiast w próbie ziarna owsa szorstkiego nie stwierdzono obecności tego patogena.



Rys. 4. Przebieg reakcji Real-Time PCR dla prób ziarna różnych rodów hodowlanych i odmian uprawnych owsa na obecność *F. langsethiae*

Na podstawie analizy ilościowej *F. langsethiae* stwierdzono istotne zróżnicowanie dotyczące wrażliwości pomiędzy przebadanymi 29 rodami hodowlanymi. Obecność tego patogena stwierdzono w ziarnie 14 rodów hodowlanych owsa. Najwięcej DNA *F. langsethiae* odnotowano w ziarnie rodu hodowlanego owsa POB 739/11 (3338,75 ng/kg), znacznie mniej w ziarnie rodu POB 939/11 (446,5 ng/kg), STH 5.12 (246,75 ng/kg) i STH 5.11

(235,5 ng/kg). DNA *F. langsethiae* nie stwierdzono w ziarnie następujących rodów hodowlanych owsa: DC 06011-8, DC 07030a/11/2, DC 07129-4/4/2, DC 08114/3/2, DC 09055/4, DC 09124/2, DC 09130/2, DC 10007/1/2, DC 10056/8/2, DC 11138/1, DC 11138/2, POB 1428/11, POB 432/11, POB 961-1248/11, STH 5.13.

Badając występowanie *F. langsethiae* w ziarnie odmian uprawnych próby owsa pobierano z miejscowości Chrzastowo i Minikowo. Obecność grzyba stwierdzono tylko w próbach ziarna pochodzących z Chrzastowa. Wykorzystując technikę Real-Time PCR nie stwierdzono produktów specyficznych dla *F. langsethiae* w ziarnie odmian owsa pochodzących z Minikowa. W związku z tym nie można było jednoznacznie ustalić wrażliwości tych odmian na porażenie przez *F. langsethiae*. Spośród odmian owsa oplewionego najwięcej DNA grzyba *F. langsethiae* stwierdzono w ziarnie odmiany Komfort (46,2 ng/kg). Obecności *F. langsethiae* nie stwierdzono w ziarnie owsa nieoplewionego (Nagus).

W wyniku przeprowadzonej izolacji grzybów na pożywce PDA, z ziarna owsa o różnym genotypie, spośród 40 prób ziarna, z 4 prób uzyskano po jednym izolacie *F. langsethiae*. Znacznie więcej uzyskano innych gatunków grzybów, które nie były głównym przedmiotem badań, jednak ich występowanie mogło znacząco wpływać na liczbę uzyskanych izolatów *F. langsethiae*. Z tego względu zostały one również uwzględnione w analizie. Ziarno owsa najczęściej było zasiedlone przez grzyby saprotroficzne, zwłaszcza *Alternaria alternata*, rzadziej *Penicillium* spp. i *Epicoccum* spp. W próbach tych stwierdzono również różne gatunki grzybów rodzaju *Fusarium*, spośród których dominował *F. poae* (14,13%). Znacznie rzadziej izolowano takie gatunki tego rodzaju jak: *F. avenaceum*, *F. sporotrichoides*, *F. tricinctum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* oraz *F. equiseti*.

#### Wnioski

- A. Czułość analizy Real-Time PCR na obecność *F. langsethiae* w ziarnie owsa okazała się przydatna w określaniu podatności owsa na porażenie przez tego patogena,
- B. Stwierdzono istotne zróżnicowanie w zasiedleniu przez *F. langsethiae* ziarna rodów hodowlanych owsa. Największe stężenie DNA *F. langsethiae* odnotowano w ziarnie rodu POB 739/11,
- C. Spośród wszystkich przebadanych genotypów owsa największe stężenie DNA *F. langsethiae* stwierdzono w ziarnie owsa głuchego. Wstępne obserwacje wskazują, iż gatunek ten nie jest potencjalnym źródłem odporności na tego patogena.