

**SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE**

**z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego  
w produkcji roślinnej w 2017 roku**

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

Decyzja MRiRW:

**HOR.hn.802.18.2017 z dnia 30 maja 2017 r., zadanie nr 29**

Okres realizacji zadania:

**01.01.2017–31.12.2017**

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:

dr inż. Aleksander Łukanowski

dr inż. Anna Baturó-Cieśniewska

prof. dr hab. inż. Czesław Sadowski

## 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 wyodrębnienie genotypów owsa cechujących się najmniejszą wrażliwością na tego patogena.

## 3. Opis tematów badawczych

### 3. 1. Temat badawczy 1

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

#### Cel tematu badawczego 1

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

Cel ten został osiągnięty, jednak nie udało się wyodrębnić genotypów całkowicie odpornych. Wyróżniono jednakże genotypy mniej wrażliwe na porażenie. Do przetestowania pozostało jeszcze więcej genotypów owsa i być może wśród nich znalezione zostaną genotypy odporne.

#### 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 2 gatunki: owies zwyczajny (*Avena sativa*) – zarówno genotypy owsa o ziarnie oplewionym jak i ziarnie nieoplewionym i owies szorstki (*Avena strigosa*). Na przebadane genotypy owsa składało się 17 zarejestrowanych odmian uprawnych owsa, 1 próba owsa szorstkiego oraz 22 rodów hodowlanych. Materiał badawczy pozyskano od firm zajmujących się hodowlą materiału siewnego owsa, tj. Danko Hodowla Roślin Sp. z o.o., Małopolska Hodowla Roślin Spółka z o.o., Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR, oraz Porejestrowego Doświadczalnictwa Odmianowego COBORU Stacji Doświadczalnej Oceny Odmian w Chrząstowie. Do sztucznej inokulacji liści owsa wykorzystane zostały 3 izolaty *F. langsethiae* pozyskane z ziarna owsa w latach 2014 (FL 11H4) i 2015 (FL 292P5, FL 303P5). W sumie przetestowano 120 prób (40 genotypów owsa x 3 izolaty *F. langsethiae*).

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. 22-23°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<sup>-3</sup>.

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<sup>-1</sup>) 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 cieplarni w temp. 20°C przez 6 dni. Wrażliwość genotypów określano poprzez mierzenie długości strefy nekrozy tkanki liści.

### Wyniki

W przeprowadzonym teście liściowym wykazano zróżnicowaną wirulencję użytych w badaniach izolatów *F. langsethiae*. Najsilniejszą wirulencją odznaczał się izolat FL 303P5, a najsłabszą izolat FL 292P5. Średnio długość strefy z wyraźnymi zmianami chorobowymi na liściach owsa powodowanymi przez izolat FL 303P5 wynosiła 36,78 mm, dla izolatu FL 292P5 wynosiła ona 26,12 mm, a izolatu FL 11H4 – 32,84 mm.

Porażeniu przez *F. langsethiae* uległy genotypy owsa zwyczajnego jak i owsa szorstkiego. Średnia długość strefy z nekrozą na badanych liściach dla genotypów owsa zwyczajnego wynosiła 33,13 mm, a owsa szorstkiego – 21,7 mm.

Wszystkie przebadane genotypy owsa były porażane przez *F. langsethiae* i stwierdzono wyraźne zróżnicowanie w ich podatności na tego patogena. Wśród 22 przebadanych rodów hodowlanych odnotowano różnice w ich podatności na *F. langsethiae* zarówno dla wartości średnich, jak również dla wszystkich trzech zastosowanych izolatów *F. langsethiae*. Średnio dla trzech izolatów *F. langsethiae* najmniej wrażliwym był ród DC 17-1 (18,3 mm) i POB 5224/15 (18,9 mm), a najbardziej wrażliwym ród POB 6951/13 (32,4 mm) i POB 6951/13 (32,2 mm). Zaobserwowano jednak odmienną wrażliwość rodów na poszczególne izolaty *F. langsethiae*. Najmniej wrażliwym rodem owsa na porażenie przez izolat FL 11H4 był ród DC 17-2 (16,8 mm), na izolaty FL 292P5 i FL 303P5 - ród DC 17-1 (odpowiednio 12,6 mm i 18,3 mm). Najbardziej wrażliwym rodem owsa na porażenie przez izolat FL 11H4 był ród POB 6483/13 (39,3 mm), a na izolaty FL 292P5 i FL 303P5 ród POB 6951/13 (odpowiednio 30,2 mm i 32,4 mm). Ze względu na stosunkowo małą liczbę przebadanych genotypów nie można jeszcze jednoznacznie stwierdzić, iż nie istnieją genotypy odporne na porażenie przez tego patogena. Z tego względu wskazana jest kontynuacja badań dotyczących poszukiwań genotypów odpornych na *F. langsethiae*.

Średnio dla trzech użytych w badaniach izolatów *F. langsethiae* stwierdzono wyraźne zróżnicowanie pomiędzy wrażliwością 17 testowanymi odmianami owsa. Najmniej wrażliwą odmianą na porażenie była odmiana Krezus (16,4 mm), a najbardziej wrażliwymi były odmiany Siwek (34,7 mm) i Celer (34,3 mm). Badane odmiany cechowały się odmienną wrażliwością na poszczególne izolaty *F. langsethiae* zastosowane do inokulacji. Najmniej wrażliwą odmianą owsa na porażenie przez izolat FL 11H4 była odmiana Zuch (18,2 mm), na izolaty FL 292P5 i FL 303P5 – odmiana Krezus (odpowiednio 12,4 mm i 12,2 mm). Najbardziej wrażliwymi odmianami owsa na porażenie przez izolat FL 11H4 były odmiany Breton (35,6 mm) i Celer (35,4 mm), na izolaty FL 292P5 – odmiana Siwek (35,1 mm), a na izolat FL 303P5 – odmiany Breton (38,1 mm) i Zuch (38,0 mm).

### Wnioski

- A. Izolaty *F. langsethiae* uzyskane z owsa cechowały się zróżnicowaną wirulencją wobec badanych liści owsa. Najsilniejszą wirulencją odznaczał się izolat FL 303P5 a najsłabszą izolat FL 292P5.
- B. Odnotowano istotne zróżnicowanie w podatności analizowanych rodów hodowlanych owsa na porażenie przez *F. langsethiae*. Najmniejszą wrażliwością odznaczały się rody hodowlane DC 17-1 i POB 5224/15, a najbardziej wrażliwymi były rody POB 6951/13 i POB 6951/13.
- C. Spośród przebadanych odmian owsa najmniej wrażliwą na *F. langsethiae* okazała się odmiana Krezus, a najbardziej - Siwek i Celer,

- D. Do tej pory nie stwierdzono istnienia genotypów owsa odpornych na porażenie przez *F. langsethiae*, z tego względu wskazane jest dalsze poszukiwanie genotypów odpornych.
- E. Oba przebadane gatunki owsa były porażane przez *F. langsethiae*. Większą długość nekroz charakterystycznych dla porażenia *F. langsethiae* stwierdzono na badanych liściach owsa zwyczajnego w porównaniu z liśćmi owsa szorstkiego.

### 3. 3. Temat badawczy 2

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

#### Cel tematu badawczego 2

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, jednakże badania wymagają kontynuacji gdyż do przetestowania pozostało więcej genotypów owsa.

#### Materiały i metody

W ramach poszukiwania źródeł odporności przeprowadzono również analizę ilościową i jakościową zasiedlenia ziarna rodów hodowlanych, odmian uprawnych owsa, różnych gatunków owsa przez *F. langsethiae*. Badania te wykonano dla ziarna genotypów owsa pochodzących z doświadczeń prowadzonych w warunkach naturalnych, bez sztucznej inokulacji *F. langsethiae*, oraz z doświadczenia ze sztuczną inokulacją tym patogenem. W badaniach tych wykorzystano technikę Real-Time PCR, która pozwala na określenie ilości materiału genetycznego grzyba w ziarnie.

W pierwszym typie doświadczenia materiał badawczy pozyskano od firm zajmujących się hodowlą odmian owsa, tj. Danko Hodowla Roślin Sp. z o.o., Małopolska Hodowla Roślin Spółka z o.o., Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR. Ziarno genotypów owsa pochodzi ze ścisłych doświadczeniach poletkowych zlokalizowanych w Kopaszewie, Polanowicach i Strzelcach. Ponadto materiał badawczy pozyskano z doświadczeń prowadzonych przez Centralny Ośrodek Badania Odmian Roślin Uprawnych w ramach Porejestrowego Doświadczalnictwa Odmianowego z trzech Zakładów Doświadczalnych, tj. ZDOO Dukła (woj. podkarpackie), SDOO Wróćkowo (woj. warmińsko-mazurskie) i ZDOO Żabnica (woj. śląskie). Ponadto testowano wrażliwość genotypów owsa w warunkach prowokacyjnych, z zastosowaniem sztucznej inokulacji *F. langsethiae*. Ścisłe doświadczenie polowe, wykonane w trzech powtórzeniach, ze sztuczną inokulacją, prowadzono w Stacji Badawczej Mochełek należącej do Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy. W doświadczeniu tym badano podatność 15 genotypów owsa na porażenie przez *F. langsethiae* w wariacie ze sztuczną inokulacją i dla porównania bez sztucznej inokulacji (kombinacje kontrolne). Materiał badawczy, tj. materiał siewny owsa zwyczajnego, pozyskano od firm zajmujących się hodowlą odmian owsa, tj. Hodowli Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR, Danko Hodowla Roślin Sp. z o.o., Małopolskiej Hodowli Roślin Spółka z o.o., po 4 genotypy z każdej hodowli, oraz Centralnego Ośrodka Badania Odmian Roślin Uprawnych Stacji Doświadczalnej Oceny Odmian w Chrząstowie, z której wykorzystano odmianę wzorcową. Ponadto w badaniach tych uwzględniono po jednym genotypie owsa szorstkiego i owsa głuchego.

Inokulację zawiesiną zarodników grzyba wykonano w fazie kwitnienia owsa. Materiał inokulacyjny *F. langsethiae* stanowił izolat FL 303P5, pozyskany z ziarna owsa odmiany Amant uprawianej w Strzelcach, który w testach liściowych cechował się najwyższą wirulencją. Materiał inokulacyjny przygotowano na płytkach Petriego na pożywce SNA i PDA. Pozyskaną zawiesiną zarodników konidialnych, o zagęszczeniu  $5 \times 10^5$  zarodników  $\times \text{mL}^{-1}$ , inokulowano po 50 wiech z każdego poletka. Inokulację wiech przeprowadzono przy pomocy rozpylacza ogrodniczego, używając 5 mL materiału inokulacyjnego na 1 wiechę.

Po inokulacji wiechy okrywano osłonami foliowymi i tym sposobem przez 24 godziny materiał inokulacyjny chroniony był przed prądami powietrza i wysychaniem.

W powyższych doświadczeniach ocena odporności genotypów owsa na *F. langsethiae* przeprowadzona została na podstawie jego analizy ilościowej w zebranych ziarnie techniką Real-Time PCR, pozwalającą na określenie ilości materiału genetycznego grzyba w ziarnie.

Izolacja całkowitego DNA z ziarniaków owsa przeprowadzono zgodnie ze zmodyfikowanym protokołem wg Doyle i Doyle (1990). Dla każdej próbki z 20 g osuszonego w liofilizatorze (Scanvac, CoolSafe) i homogenizowanego przez 3 minuty w homogenizatorze Retsch MM 400 ziarna owsa do probówki typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml pobrano 100 mg i dodano 600 µl buforu ekstrakcyjnego. Kolejne etapy izolacji są zgodne z wyżej wymienionym protokołem izolacji DNA z wykorzystaniem CTAB, fenolu, chloroformu i alkoholu etylowego. Uzyskane DNA po izolacji doczyszczano przy użyciu zestawu Anty-linhibitor Kit. Zawartość całkowitego DNA uzyskanego z ziarna owsa zmierzono spektrofotometrycznie wykorzystując fluorometr Quantus (Promega), a do dalszych analiz Real-Time PCR wszystkie próbki rozcieńczono w dejonizowanej wodzie sterylnej. Reakcja Real-Time PCR przeprowadzona została w LightCycler 480 II z użyciem barwnika fluorescencyjnego LightCycler 480 SYBR Green I Master.

Warunki reakcji Real-Time PCR były takie same jak dla materiału do wykonania krzywej wzorcowej. Objętość pojedynczej reakcji wynosiła 20 µl. Wszystkie próby wykonywano w trzech powtórzeniach, a wynik końcowy jest średnią z tych replikacji. Kontrolę negatywną stanowiła mieszanina reakcyjna bez DNA uzupełniona wodą. Ostatnim etapem reakcji była analiza krzywej topnienia w zakresie temperatur 65–95°C. Otrzymane wyniki przemnożono przez miano rozcieńczenia danej próby, aby uzyskać informację o rzeczywistej ilości DNA grzyba w ziarnie owsa. W reakcji zastosowano specyficzne gatunkowo startery typu SCAR (Wilson i in. 2004), użyte wcześniej do przygotowania krzywej standardowej, generujące ampikon o długości 310 pz. Badania te przeprowadzono w Zakładzie Fitopatologii Molekularnej Katedry Entomologii i Fitopatologii Molekularnej UTP w Bydgoszczy.

W celu pozyskania izolatów *F. langsethiae* do dalszych badań, związanych z testowaniem wrażliwości genotypów owsa, przeprowadzono izolację grzybów na pożywce mikrobiologicznej. Izolacja grzybów na pożywce PDA przeprowadzona została z prób ziarna owsa pochodzących z doświadczeń poletkowych, wykorzystywanych również do testowania wrażliwości genotypów owsa. Ziarno odkażano w NaOCl, płukano w sterylnej wodzie destylowanej i wykładano na szalki Petriego z zestaloną pożywką PDA, 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 wstępnie zakwalifikowano je jako *F. langsethiae*. Następnie potwierdzano ich przynależność gatunkową metodą molekularną, przy użyciu techniki PCR (Wilson i in. 2004). Badania te przeprowadzono w Zakładzie Fitopatologii Molekularnej UTP w Bydgoszczy.

## Wyniki

Na podstawie przeprowadzonej analizy ilościowej *F. langsethiae* w ziarnie owsa techniką Real-Time PCR stwierdzono różnicowanie dotyczące wrażliwości pomiędzy przebadanymi genotypami owsa pozyskanymi od firm zajmujących się hodowlą odmian.

Średnio najniższe stężenie DNA *F. langsethiae* stwierdzono w próbach pochodzących ze Strzelc (0,189 pg DNA F.L. / 100 ng DNA owsa). Znacznie większe stężenie tego grzyba odnotowano w próbach pochodzących z Polanowic (1,029 pg DNA F.L. / 100 ng DNA owsa) i Choryni (1,584 pg DNA F.L. / 100 ng DNA owsa). Średnio z trzech miejscowości największe stężenie DNA *F. langsethiae* stwierdzono w ziarnie odmiany Kozak (2,922 pg DNA F.L. / 100 ng DNA owsa) i ziarnie rodu hodowlanego STH 7.14 (2,517 pg DNA F.L. / 100 ng DNA owsa). Obecności tego grzyba nie stwierdzono tylko w ziarnie rodu hodowlanego POB 6483/13.

Badając występowanie *F. langsethiae* w ziarnie odmian owsa pozyskanych z doświadczeń prowadzonych w ramach Porejestrowego Doświadczalnictwa Odmianowego COBORU obecność grzyba stwierdzono we wszystkich trzech badanych miejscowościach tj. ZDOO Dukla (średnio 5,353 pg DNA F.L. / 100 ng DNA owsa), SDOO Wróćkowo (0,112 pg DNA F.L. / 100 ng DNA owsa) i ZDOO Żabnica (5,085 pg DNA F.L. / 100 ng DNA owsa). Średnio z trzech miejscowości największe stężenie DNA *F. langsethiae* stwierdzono w ziarnie odmiany Harnaś (6,784 pg DNA F.L. / 100 ng DNA owsa) a najmniejsze w ziarnie odmiany Romulus (1,593 pg DNA F.L. / 100 ng DNA owsa).

W ziarnie owsa pochodzącego z doświadczenia założonego w Stacji Badawczej Mochełek, w której prowadzono sztuczną inokulację wiech owsa grzybem *F. langsethiae* średnie stężenie tego grzyba w kombinacji ze sztuczną inokulacją wynosiło 3,46 pg DNA F.L. / 100 ng DNA owsa, natomiast w kombinacji kontrolnej bez sztucznej inokulacji - 0,436 pg DNA F.L. / 100 ng DNA. W kombinacji ze sztuczną inokulacją najwyższe stężenie DNA *F. langsethiae* stwierdzono w ziarnie rodu hodowlanego DC 17-5 (18,563 pg DNA F.L. / 100 ng DNA owsa). DNA *F. langsethiae* nie stwierdzono jedynie w ziarnie owsa rodu hodowlanego DC 17-2 i POB 770/15, natomiast w ziarnie pozostałych rodów występował w zróżnicowanym stężeniu. W kombinacji kontrolnej obecność *F. langsethiae* odnotowano tylko w ziarnie rodu hodowlanego POB 5224/15 (6,54 pg DNA F.L. / 100 ng DNA).

W wyniku przeprowadzonej izolacji grzybów na pożywce mikrobiologicznej PDA, z ziarna owsa o różnym genotypie, uzyskane izolaty *F. langsethiae* stanowiły 0,07%. Znacznie więcej wyodrębniono izolatów innych gatunków grzybów, które to 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 przeprowadzonej analizie mykologicznej. Ziarno owsa najczęściej było zasiedlone przez gatunki grzybów uważane za saprotroficzne dla owsa, i były to przede wszystkim *Alternaria alternata*, rzadziej *Fusarium* spp., *Epicoccum nigrum* i *Gonatobotrys simplex*. W próbach tych stwierdzono również różne gatunki grzybów rodzaju *Fusarium*, spośród których dominował *F. poae*. Znacznie rzadziej izolowano inne gatunki tego rodzaju, tj. *F. avenaceum*, *F. graminearum*, *F. sporotrichoides*, *F. tricinctum*, *F. culmorum* i *F. equiseti*.

#### Wnioski

- A. Duża 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. Analizy Real-Time PCR potwierdziły istotne zróżnicowanie w zasiedleniu przez *F. langsethiae* ziarna rodów hodowlanych i odmian owsa. Obecności DNA grzyba nie stwierdzono w ziarnie rodu hodowlanego POB 6483/13. Największe stężenie tego patogena odnotowano w ziarnie odmiany Harnaś, Kozak i ziarnie rodu hodowlanego STH 7.14.
- C. Genotypy owsa, dla których w zebranych ziarnie nie stwierdzono obecności *F. langsethiae* mogą stanowić podstawę do uzyskania odmian o istotnie ulepszonej odporności.