

SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE
z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego
w produkcji roślinnej w 2018 roku

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

Decyzja MRiRW:

HOR.hn.802.10.2018 z dnia 29 marca 2018 r., zadanie nr 29

Okres realizacji zadania:

01.01.2018–31.12.2018

Podmiot realizujący zadanie:

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

Kierownik zadania:

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

Pracownia Fitopatologii i Mykologii Molekularnej Katedry Biologii i Ochrony Roślin

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 Baturo-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. Być może wśród nie przebadanych do tej pory znalezione zostaną genotypy odporne.

Materiały i metody

Ocena wrażliwości genotypów owsa na porażenie przez *F. langsethiae* przeprowadzona została w formie testu liściowego w laboratorium Pracowni Fitopatologii i Mykologii Molekularnej Katedry Biologii i Ochrony Roślin Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy. Badania te obejmowały 40 genotypów owsa, w tym 6 gatunków. Oprócz owsa zwyczajnego (*Avena sativa*), zarówno genotypy owsa o ziarnie oplewionym jak i ziarnie nieoplewionym, przebadano po dwa genotypy *Avena strigosa* (owies szorstki), *Avena fatua* (owies głuchy), *Avena magna*, *Avena insularis* i *Avena sterilis*. Na przebadane genotypy owsa składało się również 10 zarejestrowanych odmian uprawnych owsa, 18 rodów hodowlanych oraz 2 genotypy formy ozimej owsa zwyczajnego, w tym 1 o ziarnie żółtym i 1 o ziarnie ciemnym. 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 Chrzastowie. Do sztucznej inokulacji liści owsa wykorzystane zostały 3 izolaty *F. langsethiae*. Dwa izolaty pozyskano z ziarna owsa w latach 2014 (FL 11H4) i 2015 (FL 298P5), a jeden z ziarna pszenicy ozimej w 2017 roku (FL 9P1-7). 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 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 5×10^5 zarodników·mL⁻³.

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 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 9P1-7, a najsłabszą izolat FL 11H4. Średnio długość strefy z wyraźnymi zmianami chorobowymi na liściach owsa powodowanymi przez izolat FL 9P1-7 wynosiła 35,2 mm, dla izolatu FL 11H4 wynosiła ona 21,97 mm, a izolatu FL 298P5 – 31,02 mm.

Porażeniu przez *F. langsethiae* uległy wszystkie gatunki owsa. Najdłuższą średnią długość strefy z nekrozą na badanych liściach zanotowano dla formy nieoplewionej *A. sativa* (owies zwyczajny cv Nagus), która wynosiła 32,5 mm. Najkrótszą długość strefy z nekrozą stwierdzono dla *A. sterilis* – 24,5 mm. Długość nekrozy obserwowana dla poszczególnych gatunków była jednak zróżnicowana w zależności od genotypu gatunku owsa i izolatu *F. langsethiae* zastosowanego do testowania wrażliwości.

Wszystkie przebadane genotypy owsa były porażane przez *F. langsethiae* i stwierdzono wyraźne zróżnicowanie w ich podatności na tego patogena. Wśród 18 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 STH 8.25 (25,4 mm) i POB 3938/14 (25,5 mm), a najbardziej wrażliwym był ród DC10067/10/2/4 (33,1 mm). Zaobserwowano jednak odmienną wrażliwość rodów na poszczególne izolaty *F. langsethiae*. Najmniej wrażliwym rodem owsa na porażenie przez izolat FL 11H4 był ród DC 10054/8/1/1/1 (16,4 mm), na izolaty FL 298P5 – ród STH 8.30 (20,4 mm), a na FL 9P1-7 – ród STH 8.30 (37,8 mm). Najbardziej wrażliwym rodem owsa na porażenie przez izolat FL 11H4 był ród DC10061/1/1/2 (28,7 mm), na izolat FL 298P5 – POB 5710/16 (37,2 mm) a na FL 9P1-7 – ród POB 3938/14 (26,6 mm). Ze względu na małą liczbę przebadanych genotypów nie można jeszcze jednoznacznie stwierdzić, iż nie istnieją genotypy odporne na porażenie przez tego patogena.

Średnio dla trzech izolatów *F. langsethiae* stwierdzono wyraźne zróżnicowanie pomiędzy wrażliwością 10 testowanymi odmianami owsa. Najmniej wrażliwą odmianą na porażenie była odmiana Bingo (26,6 mm), a najbardziej wrażliwą była odmiana Amant (34,2 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 Bingo (17,8 mm) i Agent (17,9 mm), na izolat FL 298P5 odmiana Bingo (25,2 mm), a na FL 9P1-7 – odmiana Kozak (35,2 mm). Najbardziej wrażliwą odmianą owsa na porażenie przez izolat FL 11H4 była odmiana Nagus (35,7 mm), na izolat FL 298P5 – odmiana Armani (35,8 mm), a na izolat FL 9P1-7 – odmiana Amant (39,4 mm).

Wnioski

- A. Izolaty *F. langsethiae* uzyskane z owsa i pszenicy cechowały się zróżnicowaną wirulencją wobec badanych liści owsa. Najsilniejszą wirulencją odznaczał się izolat z pszenicy - FL 9P1-7 a najsłabszą izolat FL 11H4 (z owsa).
- B. Wszystkie przebadane gatunki owsa były porażane przez *F. langsethiae*. Większą długość nekroz charakterystycznych dla porażenia *F. langsethiae* stwierdzono na liściach owsa zwyczajnego nieoplewionego, a najmniejszą na liściach *Avena sterilis*.
- C. Odnotowano zróżnicowanie w podatności analizowanych rodów hodowlanych owsa na *F. langsethiae*. Najmniejszą wrażliwością odznaczały się rody hodowlane STH 8.25 i POB 3938/14, a najbardziej wrażliwym był ród DC10067/10/2/4.
- D. Spośród przebadanych odmian owsa najmniej wrażliwą na *F. langsethiae* okazała się

odmiana Bingo, a najbardziej – Amant.

- E. Do tej pory nie stwierdzono istnienia genotypów owsa całkowicie odpornych na porażenie przez *F. langsethiae*, z tego względu wskazane jest dalsze poszukiwanie genotypów odpornych.

3. 2. 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. Wytypowano odmiany o mniejszej wrażliwości na porażenie, jednakże nie wyodrębniono genotypów całkowicie odpornych.

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 punktów 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 zarodnikami *F. langsethiae*. Ścisłe doświadczenie polowe ze sztuczną inokulacją, wykonane w trzech powtórzeniach, 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 silną wirulencją. Materiał inokulacyjny przygotowano na płytkach Petriego na pożywce SNA i PDA. Pozyskaną zawiesiną zarodników konidialnych, o zagęszczeniu 5×10^5 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 wariancie bez sztucznej wiechy owsa opryskiwano samą wodą.

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.

Izolację 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 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 (Roche, Szwajcaria) z użyciem barwnika fluorescencyjnego LightCycler 480 SYBR Green I Master.

Warunki reakcji Real-Time PCR były takie same jak dla materiału który posłużył do do wykonania krzywej wzorcowej. Objętość pojedynczej reakcji wynosiła 20 µl (13 µl mastermiks + 7 µl badanej próbki DNA). 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 amplikon o długości 310 pz. Badania te przeprowadzono w Pracowni Fitopatologii i Mykologii Molekularnej Katedry Biologii i Ochrony Roślin Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego 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 przez 3 minuty w 1% 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 wstępnie zakwalifikowano je jako *F. langsethiae*. Następnie potwierdzano ich przynależność gatunkową metodą molekularną, przy użyciu techniki PCR. Badania te przeprowadzono w Pracowni Fitopatologii i Mykologii 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.

Obecność grzyba stwierdzono we wszystkich trzech badanych miejscowościach. Średnio najwyższe stężenie DNA *F. langsethiae* odnotowano w próbach pochodzących ze Strzelc (21767,1 pg DNA F.L. / kg ziarna owsa). Znacznie mniejsze stężenie tego grzyba odnotowano w próbach pochodzących z Kopaszewa (52,6 pg DNA F.L. / kg owsa) oraz z Polanowic (319,7 pg F.L. / kg owsa). Średnio z trzech miejscowości największe stężenie DNA *F. langsethiae* stwierdzono w ziarnie rodu hodowlanego POB 3938/14 (101493,3 pg

F.L. / kg owsa). Najmniej DNA tego grzyba zidentyfikowano w ziarnie rodu hodowlanego DC 18-4 (254,7 pg F.L. / kg owsa).

Badając występowanie *F. langsethiae* w ziarnie odmian owsa pozyskanych z doświadczeń prowadzonych w ramach Porejestrowanego Doświadczalnictwa Odmianowego COBORU obecność grzyba stwierdzono we wszystkich trzech badanych miejscowościach tj. ZDOO Dukla (średnio 985,28 pg DNA F.L. / kg ziarna), SDOO Wrócikowo (14,78 pg DNA F.L. / kg ziarna) i ZDOO Żabnica (0,45 pg DNA F.L. / kg ziarna). Średnio z trzech miejscowości największe stężenie DNA *F. langsethiae* odnotowano w ziarnie odmiany Romulus (1016,67 pg DNA F.L. / kg ziarna), a najmniejsze w ziarnie odmiany Monsun (13,96 pg DNA F.L. / kg ziarna).

W ziarnie owsa pochodzącego z doświadczenia założonego w Stacji Badawczej Mochełek, w której prowadzono sztuczną inokulację wiech owsa grzybem *F. langsethiae*, średnie stężenie tego patogena w kombinacji ze sztuczną inokulacją wynosiło 12872,94 pg DNA F.L. / kg ziarna owsa, natomiast w kombinacji kontrolnej bez sztucznej inokulacji - 1,44 pg DNA F.L. / kg. W kombinacji ze sztuczną inokulacją najwyższe stężenie DNA *F. langsethiae* stwierdzono w ziarnie odmiany Krezus (106000,00 pg DNA F.L. / kg). DNA *F. langsethiae* nie odnotowano w ziarnie owsa rodów hodowlanych DC10067/10/2/4, POB 5547/16, STH 11215 i STH 11315, natomiast w ziarnie pozostałych rodów patogen ten występował w zróżnicowanym stężeniu - od 8,9 do 34170 pg DNA F.L. / kg. W kombinacji kontrolnej obecność *F. langsethiae* odnotowano tylko w ziarnie rodu hodowlanego DC 10054/8/1/1/1 (6,54 pg DNA F.L. / kg), POB 3913/14 (1,30 pg DNA F.L. / kg), owsie głuchym (9,7 pg DNA F.L. / kg) i owsie szorstkim (4,00 pg DNA F.L. / kg).

W wyniku przeprowadzonej izolacji grzybów na pożywce PDA, z ziarna owsa o różnym genotypie, uzyskane izolaty *F. langsethiae* stanowiły 0,06%. 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 analizie mykologicznej. Ziarno owsa najczęściej było zasiedlone przez gatunki grzybów uważane za saprotroficzne dla owsa, i były to przede wszystkim *Alternaria alternata*, rzadziej inne gatunki *Fusarium*, *Epicoccum nigrum* i *Gonatotryps simplex*. W próbach tych stwierdzono również różne gatunki grzybów rodzaju *Fusarium*, spośród których dominował *F. poae* (17,73%). Znacznie rzadziej izolowano inne gatunki tego rodzaju, tj. *F. avenaceum*, *F. graminearum*, *F. sporotrichoides*, *F. tricinctum*, *F. culmorum*, *F. equiseti* i *F. crookwellense*.

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 zróżnicowanie w zasiedleniu przez *F. langsethiae* ziarna rodów hodowlanych i odmian owsa. Obecności DNA grzyba nie stwierdzono w ziarnie rodów hodowlanych: DC10067/10/2/4, POB 5547/16, STH 11315 i STH 11215. Z przebadanych odmian najmniej grzyba odnotowano w ziarnie odmiany Monsun i Siwek.
- C. Zarówno w teście liściowym jak i analizie z wykorzystaniem techniki Real-Time PCR nie stwierdzono istnienia genotypów owsa całkowicie odpornych na porażenie przez *F. langsethiae*.
- D. Genotypy owsa, dla których w zebranych ziarnie nie stwierdzono obecności *F. langsethiae* mogą stanowić podstawę do uzyskania odmian o istotnie ulepszonej odporności.