



Pole doświadczalne wiosną w Radzikowie

Fot. Gabriela Wodzyńska-Łapińska

BIULETYN
INSTYTUTU HODOWLI
I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
Nr 276/2015



Pole doświadczalne wiosną w Radzikowie. Fot. Gabriela Wodzyńska-Łapińska

RADZIKÓW 2015
INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY — RADZIKÓW
05–870 BŁONIE pod WARSZAWĄ

INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY
Dyrektor: Prof. dr hab. Edward Arseniuk

Komitet Redakcyjny:

Editorial Committee:

DANUTA BOROS (Przewodnicząca — Editor-in Chief)

HENRYK J. CZEMBOR, RENATA LEBECKA, ANNA LINKIEWICZ, WIESŁAW MĄDRY,

KATARZYNA MIKOŁAJCZYK, WOJCIECH NOWACKI, BARBARA ZAGDAŃSKA

GABRIELA WODZYŃSKA-ŁAPIŃSKA (Sekretarz Redakcji — Editorial Secretary)

Redaktor Statystyczny — WIESŁAW MĄDRY

CZASOPISMO UKAZUJE SIĘ OD 1951 ROKU

Redaktor techniczny i skład komputerowy

GABRIELA WODZYŃSKA-ŁAPIŃSKA

Druk: Biuro Wydawnictw i Reklamy „WiR”

ALEKSANDRA MAŁYSKA**TOMASZ TWARDOWSKI**

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu

Co nowego w agrobiotechnologii, A.D. 2015?*

What's new in Polish agrobiotechnology, A.D. 2015?

Biogospodarka i agrobiotechnologia są wzajemnie powiązane i nierozzerwalne. Liczne produkty dostępne dla konsumenta jednoznacznie potwierdzają znaczenie rynkowe agrobiotechnologii. Aktualny stan legislacji w Polsce (nowelizacja ustawy „O GMO” podpisana przez Prezydenta Bronisława Komorowskiego 6. 02. 2015 r.) w zasadniczym stopniu spowalnia rozwój możliwych komercjalizacji osiągnięć naukowych. Jednocześnie porozumienia na szczeblu międzynarodowym, jak „Protokół z Nagoi”, powodują dalsze utrudnienia i potencjalne komplikacje w kooperacji międzynarodowej.

Słowa kluczowe: biogospodarka, agrobiotechnologia, legislacja

Bioeconomy and agrobiotechnology are strictly connected. Many products available on the consumer's market support this observation. Recent status of legislation in Poland (President Bronisław Komorowski signed on 6th Feb. 2015 the amendment of Polish Statute “About GMO”) in significant degree slows down the development of commercial application of the scientific achievements. Simultaneously the international agreements, like “Nagoya Protocol”, make the international cooperation more difficult.

Key words: bioeconomy, agrobiotechnology, legislation

WPROWADZENIE

Podstawowe pytanie, na które musi odpowiedzieć nauka, jest następujące: czy wystarczy dla ciągle wzrastającej liczby ludności na świecie: żywności, energii, materiałów, farmaceutyków? Wielu ekonomistów uważa, że szansa na pozytywne rozwiązanie tych kwestii zawarte jest w biogospodarce, czyli oparciu dalszego rozwoju przemysłowego na odnawialnych surowcach, a zatem przede wszystkim na produkcji

* Artykuł ten powstał dzięki dofinansowaniu ERANET-CORNET # 2/15/2013 projektu badawczego: „Innowacyjne produkty białkowe z nasion roślin strączkowych, uprawianych w warunkach rolnictwa zrównoważonego do żywienia drobiu” współfinansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju.

Referat przedstawiony na konferencji IHAR PIB, Zakopane, 3 lutego 2015 r.

Redaktor prowadzący: Anna Linkiewicz

rolniczej wykorzystującej przeciw surowce odnawialne: wodę, energię słoneczną i ziemię (Cancun Declaration, 2002).

Nowoczesna agrobiotechnologia, nazywana często zieloną biotechnologią, opiera się w znacznym stopniu na metodach inżynierii genetycznej. Jej znaczenie ekonomiczne jest określone przez liczbę innowacyjnych produktów, usług i rozwiązań dostępnych na rynku. Polski konsument może aktualnie nabyć takie przykładowe artykuły, jak:

- żywność i pasze zawierające lub wytworzone z wykorzystaniem genetycznie zmodyfikowanych organizmów (GMO);
- biomateriały, np. bawełna genetycznie zmodyfikowana (GM);
- biofarmaceutyki (przede wszystkim leki białkowe) jako produkty mikroorganizmów GM;
- liczne produkty przemysłowe, jak np. sery i soki, w których wytworzeniu wykorzystano enzymy produkowane z zastosowaniem mikroorganizmów GM;
- wiele kosmetyków opisywanych jako „produkty nowoczesnych technologii DNA”;
- liczne produkty opisane jako „wolne od GMO”, głównie w ramach produktów „organicznych”, „bio” i „naturalnych”.

Oznakowanie tych produktów jest często nieadekwatne i jest używane raczej w celach marketingowych niż informacyjnych. Znaczenie ekonomiczne inżynierii genetycznej jest określone przez liczbę innowacyjnych produktów, usług i rozwiązań dostępnych na rynku.

CZY WYSTARCZY ŻYWNOŚCI?

Odpowiadając na tak postawione pytanie konieczne jest, niezależnie od stosunku do nowoczesnej biotechnologii, uwzględnienie kilku obiektywnych czynników: zapewne w 2050 r. będzie na świecie około 10 miliardów ludzi; natomiast będzie mniej ziemi uprawnej, mniej wody słodkiej, jak również będzie wyższy standard życia (objawiający się m.in. większą konsumpcją mięsa, do produkcji którego potrzeba więcej roślin). W dyskusjach naukowców i publicystów powraca zatem kwestia, czy będzie można wyżywić tak dużą liczbę mieszkańców naszej planety? Jak zwiększyć plony? Z pewnością poprawa nawożenia czy też nowoczesna agrotechnologia (zwalczanie chwastów, szkodników, patogenów), a zatem oparcie postępu rolniczego na osiągnięciach chemii stworzyło wspaniałe efekty. Jednakże podobnie jak w przypadku postępu biologicznego (doskonałą ilustracją są osiągnięcia laureata Nagrody Nobla Normana Borlauga) większość ekspertów ostrzega, że te możliwości są bliskie wyczerpania. W minionych latach triumfy święci hodowla oparta na mutacjach (chemicznych lub radiacyjnych). Obecnie agrobiotechnologia, czyli zmiana informacji genetycznej dokonana technikami inżynierii genetycznej, a prowadząca do genetycznie zmodyfikowanych organizmów jest postrzegana jako klucz do sukcesu. Inne innowacyjne technologie (New Breeding Techniques, NBT), jak np. cis/intragenetyka, epigenetyka, nukleazy z motywem palca cynkowego — to kolejne możliwości wspaniałej biologii molekularnej (European Parliament, 2013; Komisja Europejska, 2012; European Commission, 2014).

Z przyjemnością i z dumą możemy odnotować polskie osiągnięcia naukowe, jak przykładowo otrzymanie materiałów opatrunkowych (z mikroorganizmów i lnu),

pozyskanie jadalnych szczepionek w roślinach, czy też otrzymanie transgenicznych roślin: ogórek, sałata, ziemniak, łubin lub wysokoenergetycznych drzew GM (otrzymanie bioenergii). Niestety, z ubolewaniem należy odnotować brak przeniesienia tych sukcesów naukowych do praktyki gospodarczej.

Ogromny wzrost produkcji żywności w ostatnim półwieczu pozwolił znacząco obniżyć liczbę ludności głodującej na świecie, nawet mimo dwukrotnego wzrostu zaludnienia, który nastąpił w tym czasie. Jednak nadal co siódma osoba cierpi z powodu niedożywienia, a około miliarda ludzi ma nadwagę. Jednocześnie spodziewamy się dalszego wzrostu populacji i konieczności zapewnienia żywności dla 9 mld ludzi już w 2050 r. Należałoby zwiększyć produkcję żywności aż o 70%, co wymagałoby średniego wzrostu produkcji zbóż o 44 mln ton rocznie. Osiągnięcie trwałego wzrostu produkcji rolniczej na taką skalę będzie bezprecedensowe i wymaga wielu znaczących zmian zarówno w procesie produkcji, jak i postępie hodowlanym, a także w legislacji czy też odbiorze społecznym innowacyjnych technologii. Dokonanie zmian we wszystkich obszarach rolnictwa, które sprostałyby wzrostowi ludności jest ogromnym wyzwaniem, tym bardziej biorąc pod uwagę dodatkową presję związaną z globalnymi zmianami klimatycznymi i zanieczyszczeniem środowiska. Wykorzystanie NBT, czyli nowych technik hodowlanych, umożliwia przyspieszenie uzyskania postępu odmianowego, dzięki któremu można stworzyć linie i odmiany roślin uprawnych, zarówno dostosowane do lokalnych warunków geoklimatycznych, jak również spełniające wymogi legislacyjne (Małyska, 2011, 2013; Polacy ..., 2012).

LEGISLACJA

Niezwykle ważne dla rynku produktów agrobiotechnologii są obowiązujące normy prawne, obejmujące zarówno legislację krajową, jak też ustalenia międzynarodowe. Sejm uchwalił nowelizację ustawy o organizmach genetycznie zmodyfikowanych definiującą takie pojęcia jak: mikroorganizmy genetycznie zmodyfikowane, czy zakład inżynierii genetycznej; ta norma prawna została podpisana przez Prezydenta Bronisława Komorowskiego 6. 02. 2015 r. Niespełna dwa miesiące wcześniej wszedł w życie „Protokół z Nagoi” regulujący kwestię uczciwego i sprawiedliwego podziału korzyści płynących z wykorzystania zasobów genetycznych.

Nowelizacja ustawy „O GMO” została przyjęta przez Sejm 28 listopada 2014 r. Natomiast 15. 01. 2015 r. Sejm poparł sześć poprawek Senatu do nowelizacji ustawy „O GMO”, która zaostrza przepisy gwarantujące większe bezpieczeństwo związane z hodowlą i wykorzystaniem organizmów genetycznie zmodyfikowanych w laboratoriach. Nowelizacja ustawy „O GMO” dotyczy zamkniętego użycia zmodyfikowanych genetycznie organizmów (GMO) i mikroorganizmów (GMM). Wprowadza definicję „zakładu inżynierii genetycznej”. Zgodnie z nią, są to pomieszczenia, budynki, laboratoria lub ich zespoły, przystosowane i przeznaczone do dokonywania zamkniętego użycia GMM lub GMO. Minister środowiska wyda rozporządzenie zawierające wymagania dotyczące szczegółowych rodzajów środków bezpieczeństwa stosowanych w zakładach inżynierii genetycznej. Minister środowiska będzie wydawał zgody i zezwolenia na prowadzenie

zakładów inżynierii genetycznej, zamknięte użycie mikroorganizmów genetycznie zmodyfikowanych i organizmów genetycznie zmodyfikowanych, zamierzone uwolnienie organizmów genetycznie zmodyfikowanych do środowiska, wprowadzenie do obrotu produktów GMO (nie dotyczy żywności, pasz i produktów leczniczych) (Ustawa z dnia 22 czerwca 2001; Ustawa z dnia 15 stycznia 2015).

Stanowisko w sprawie legislacji bioekonomii w Polsce zawarte w opiniach i komentarzach (jak np. opinia Komitetu Biotechnologii PAN i Prezydium PAN) jednoznacznie wskazuje na ingerowanie polityków w sprawy nauki i hamowanie rozwoju biotechnologii w Polsce. (Stanowisko..., 2015). W szczególności krytycznie oceniono następujące kwestie:

- została opracowana przez Ministerstwo Środowiska a nie przez Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, Zdrowia, Gospodarki lub Rolnictwa;
- nie była konsultowana z właściwymi podmiotami;
- wprowadzenie jej musi spowodować powstanie niezwykle rozbudowanego aparatu biurokratycznego;
- jest jaskrawym przykładem braku zaufania do odpowiedzialności środowiska naukowego w Polsce.

Wprowadzenie ustawy „O GMO” w proponowanym kształcie umocni w społeczeństwie polskim irracjonalne obawy przed organizmami genetycznie zmodyfikowanymi. Parlament Europejski poparł nowe unijne przepisy, które ułatwią państwom UE wprowadzanie zakazu bądź ograniczanie upraw roślin genetycznie modyfikowanych na swym terytorium (styczeń 2015). Akty prawa międzynarodowego, jak np. „Protokół z Nagoi”, obowiązujący od 2014 r. także wprowadzają utrudnienia w zakresie wykorzystywania materiału biologicznego i mogą mieć znaczenie dla międzynarodowego wolnego handlu, do czego jesteśmy zobowiązani poprzez konwencje WTO (World Trade Organisation) (Nagoya Protocol, 2010).

KONKLUZJE

Aktualny stan prawny oraz otoczenie społeczne kształtują unikatowe środowisko dla rozwoju agrobiotechnologii w Polsce. Fakty można jednoznacznie i prosto sformułować następująco: Nie można „uciec” od inżynierii genetycznej, a produkty inżynierii genetycznej są i będą na rynku. W naszym interesie leży uczestnictwo w innowacyjnej bioekonomii. Natomiast w zgodnej opinii naukowej (ekspertów) analiza krok-po-kroku (case-by-case) i merytoryczny nadzór poprzez administrację są niezbędne.. Najważniejsze organizacje naukowe w Polsce, jak Prezydium PAN, Komitet Biotechnologii PAN i Konferencja Rektorów Akademickich Szkół Polskich postrzegają inżynierię genetyczną jako wielką szansę.

Polscy uczeni mają doskonałe i imponujące osiągnięcia naukowe, szczególnie wartościowe w kontekście małych nakładów finansowychłożonych na naukę. Jesteśmy zbyt biednym krajem aby te efekty zmarnować.

LITERATURA

- Cancun Declaration of Like-Minded Megadiversity Countries. 2002. http://www.weltvertrag.org/e375/e719/e1045/CancunDeclarationonLike-MindedMegadiversityCountries_2002_ger.pdf.
- European Parliament. 2013. DRAFT REPORT on the proposal for a regulation of the European Parliament and of the Council on Access to Genetic Resources and the Fair and Equitable Sharing of Benefits Arising from their Utilization in the Union (COM(2012)576–C7-0322/2012–2012/0278(COD)) Committee on the Environment, Public Health and Food Safety: 8.4.2013 Rapporteur: Sandrine Bélier.
- European Commission Joint Research Centre. 2014. Consequences, Opportunities and Challenges of Modern Biotechnology for Europe JRC Reference Reports: <http://ec.europa.eu/dgs/jrc/index.cfm>.
- Komisja Europejska. 2012. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie dostępu do zasobów genetycznych oraz sprawiedliwego i równego podziału korzyści wynikających z wykorzystania tych zasobów w Unii. Bruksela, dnia 4.10.2012 COM(2012) 576 final 2012/0278 (COD) <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2012:0576:FIN:PL:HTML>.
- Małyska A., Filipiak M., Twardowski T. 2013. Opinia ekspertów o agrobiotechnologii. Nauka 1: 149 — 160.
- Małyska A., Twardowski T. 2011. Opinia publiczna o biotechnologii w Polsce i innych krajach Unii Europejskiej. Nauka 1: 85 — 99.
- Nagoya Protocol, 2010. <http://www.cbd.int/abs/text/default.shtml> (EN).
- TNS PENTOR. 2012. Polacy wobec GMO.
- Ustawa z dnia 22 czerwca 2001 r. o organizmach genetycznie zmodyfikowanych Dz. U. 2001 nr 76 poz. 811.
- Ustawa z dnia 15 stycznia 2015. O zmianie ustawy o organizmach genetycznie zmodyfikowanych oraz niektórych innych ustaw. Dz. U. 2015 poz. 277.
- Komitet Biotechnologii. 2015. Stanowisko w sprawie legislacji biotechnologii w Polsce. Nauka 1: 183 — 185.

KINGA STUPER-SZABLEWSKA¹**ANNA OSTROWSKA¹****TOMASZ GÓRAL²****ANNA MATYSIAK¹****JULIUSZ PERKOWSKI¹**¹ Uniwersytet Przyrodniczy, Katedra Chemii, Poznań² Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Fitopatologii, Radzików

Porównanie aktywności przeciwutleniającej różnych odmian pszenicy ozimej naturalnie porażonej i inokulowanej grzybami z rodzaju *Fusarium**

Comparison of the antioxidant activity of different varieties of winter wheat naturally infected and inoculated with fungi of the genus *Fusarium*

Celem niniejszych badań było określenie aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów z ziarna 30 odmian pszenicy ozimej oraz zawartości w nich polifenoli ogółem. Niniejszy cel realizowano poprzez analizę prób naturalnie porażonych określanych, jako kontrolne wzrastających w warunkach bez ochrony chemicznej oraz prób inokulowanych grzybami z rodzaju *Fusarium*. Stwierdzono, iż ekstrakty otrzymane z 30 odmian pszenicy wykazują zróżnicowaną aktywność antyutleniającą. Analiza statystyczna wyników wykazała wyższą aktywność prób inokulowanych mierzoną za pomocą zdolności do wygaszania wolnego rodnika ABTS* w porównaniu do prób kontrolnych. Zawartość polifenoli ogółem natomiast nie różniła się istotnie między próbkami kontrolnymi i inokulowanymi. W czasie niniejszych badań nie stwierdzono istotnej zależności pomiędzy zawartością polifenoli w ekstraktach, a aktywnością przeciwutleniającą.

Słowa kluczowe: polifenole, pszenica, właściwości antyoksydacyjne

The aim of this study was to determine the antioxidant activity and total polyphenol content of the grain extracts of 30 varieties of winter wheat. This aim was achieved by analyzing samples naturally infected and non-treated with fungicides, described as control and samples inoculated with fungi of the genus *Fusarium*. It was found that the polyphenol extracts obtained from 30 wheat cultivars had an antioxidant activity. Statistical analysis of the results showed a higher activity in the inoculated samples

* Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego onr 2012/07/B/N29/02385 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki
Praca przedstawiona na konferencji IHAR — PIB, Zakopane, 3 lutego 2015 roku

Redaktor prowadzący: Danuta Boros

as measured by the ability to quench free radical ABTS* compared to the controls. In contrast the total polyphenol content in the control and inoculated samples was not significantly different. There was no significant correlation between the content of polyphenols in the extracts and antioxidant activity.

Key words: polyphenols, wheat, antioxidant capacity

WSTĘP

Wśród substancji wykazujących biologiczną aktywność istotną grupę stanowią substancje o działaniu antystresowym w stosunku do roślin. Jednym z czynników stresogennych jest infekcja grzybicza (Góral i Walentyn-Góral, 2014; Wiśniewska i in., 2014 a). W ostatnim czasie znacząco wzrasta zainteresowanie kompleksowym spojrzeniem na mechanizmy odpornościowe roślin, w których jak donosi przedmiotowa literatura coraz większe znaczenie przywiązuje się do procesów przeciwutleniających (Adom i in., 2003; Ciołek i Makarska, 2004).

Tabela 1

Zawartość związków fenolowych w ekstraktach z różnych roślin uprawnych (Hodziec i in., 2009)
The total phenolics content in various crop extracts (Hodziec et al., 2009)

Rodzaj rośliny uprawnej Type of crop	Związki fenolowe ogółem (mg GA/L) Total phenolics (mg GA/L)	FRAP ($\mu\text{molFe}^{\text{II}}/\text{L}$) FRAP ($\mu\text{molFe}^{\text{II}}/\text{L}$)
Gryka — Buckwheat	20,35	385,71
Ryż — Rice	18,00	338,12
Owies — Oat	17,10	329,59
Jęczmień — Barley	13,56	279,40
Kukurydza — Corn	11,29	233,35
Pszenica — Wheat	8,46	190,26

mgGA/L — miligramy kwasu galusowego na litr ekstraktu (jednostka wyrażająca zawartość związków fenolowych ogółem w przeliczeniu na kwas galusowy); milligrams of gallic acid per 1 liter of extract (a unit expressing total phenolics content as the amount of gallic acid)

FRAP — ferrum reducing antioxidant power

$\mu\text{molFe}^{\text{II}}/\text{L}$ — liczba określająca zdolność badanej próbki do redukcji mikromoli jonu żelaza II w jednym litrze ekstraktu; a number of micromoles of iron ions that are reduced by one liter of the tested extract

Ilość i aktywność związków o charakterze antyoksydacyjnym obecnych w ziarnie zbóż, zależy w istotny sposób od rodzaju zboża (tab. 1), odmiany oraz adaptacji rośliny do warunków środowiskowych podczas wzrostu i rozwoju. Wśród zbóż uprawianych w strefie klimatu środkowoeuropejskiego istotną rolę odgrywają infekcje grzybami z rodzaju *Fusarium*, takimi jak: *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. avenaceum* (Wiśniewska i in., 2014 b). Zaburzają one naturalną równowagę roślin uprawnych. Podczas infekcji grzybiczej dochodzi do stanu zaburzenia równowagi pomiędzy zachodzącymi w warunkach fizjologicznych procesami utleniania, będącymi podstawą procesów życiowych, a procesami przeciwutleniającymi. Dochodzi wówczas do dominacji reakcji wolnorodnikowych o charakterze utleniającym. Za taki stan w komórkach roślinnych, nazywany stresem oksydacyjnym, odpowiedzialne są reaktywne formy tlenu, których nadmiar powstaje na skutek ich wzmożonej produkcji z endogennych źródeł organizmu roślinnego oraz środowiskowych czynników zewnętrznych. Ilość i aktywność przeciwutleniaczy obecnych w tkankach roślinnych zależy od wielu czynników m.in.

od przystosowania roślin do warunków środowiskowych podczas wzrostu i rozwoju. W prawidłowych warunkach fizjologicznych w komórkach organizmu utrzymuje się względna równowaga pomiędzy poziomem wytworzonych rodników tlenowych, a aktywnością przeciwutleniaczy. W następstwie zachwiania homeostazy komórek zachodzącego w stanach stresu, stanach zapalnych czy zaburzeń fizjologicznych wzrasta produkcja wolnych rodników, prowadząc bezpośrednio do stresu oksydacyjnego. (Silverman i in., 2005), podczas którego rośliny wykształcają antyoksydacyjny mechanizm obronny: enzymatyczny i nieenzymatyczny (Khan i in., 2009). Drugi rodzaj obronności rośliny opiera się na zwiększonej syntezie niskocząsteczkowych przeciwutleniaczy, do których należą głównie związki fenolowe (Gumul i in., 2005).

Celem niniejszych badań było określenie aktywności antyoksydacyjnej oraz zawartości polifenoli ogółem w ekstraktach z ziarna 30 odmian pszenicy ozimej. Niniejszy cel realizowano poprzez analizę prób naturalnie porażonych określonych, jako kontrolne wzrastające w warunkach bez ochrony chemicznej oraz prób inokulowanych grzybami z rodzaju *Fusarium*.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenie infekcyjne

Do badań wybrano 30 odmian pszenicy zwyczajnej ozimej (*Triticum aestivum* L.) opisanych w pracy Góral i in. (2015). Odmiany te znajdują się w Krajowym Rejestrze Centralnego Ośrodka Badania Odmian Roślin Uprawnych (COBORU). Zostały one wprowadzone do rejestru w okresie od 1998 (Mewa) do 2009 (Belenus, Kampana). Odmiany pszenicy ozimej różniły się pod względem cech morfologicznych, odporności na choroby oraz pochodzenia.

Doświadczenia polowe zostały założone w układzie split-plot. Odmiany wysiano na poletkach o powierzchni 1 m² w trzech powtórzeniach w dwóch kombinacjach. Pierwsza stanowiła kontrolę, niechronioną fungicydami oraz nieinokulowaną. Druga kombinacja inokulowana była izolatami *Fusarium culmorum*. Dystans pomiędzy blokami wynosił 5 m. Bloki oddzielone zostały pasami szerokości 1 m obsianymi długosłomą odmianą pszenżyta ozimego.

Do produkcji inokulum zastosowano trzy izolaty *Fusarium culmorum* produkujące deoksyniwalenol (KF846 — chemotyp DON), niwalenol (KF350 — chemotyp NIV) i zearalenon (ZFR 16 — chemotyp DON). Izolaty należące do chemotypu DON pochodziły z Radzikowa i zostały wyizolowane z kłosów pszenicy (Wiśniewska i Kowalczyk, 2005; Ochodźki i Góral, 2006). Izolat o chemotypie NIV pochodził z Holandii (oznaczony, jako IPO348) i został wyizolowany z kłosa pszenicy (Snijders i Perkowski, 1990).

Izolaty były inkubowane na autoklawowanym ziarnie pszenicy w szklanych kolbach przez około 4 tygodni, a następnie naświetlane ciągłym światłem UV przez 4 do 7 dni w temperaturze 18°C. Ziarno skolonizowane przez *F. culmorum* było następnie suszone i przechowywane w lodówce w temperaturze 4°C do momentu użycia.

W dniu, kiedy wykonywana była inokulacja, ziarno z grzybnią i zarodnikami *F. culmorum* namaczano w wodzie przez około 2 godziny i następnie filtrowano w celu

uzyskania zawiesiny zarodników. Stężenie zawiesin zarodników poszczególnych izolatów ustalono na około 5×10^5 zar./ml za pomocą hematokrytu. Zawiesiny zostały zmieszane w równych proporcjach.

Kłosa pszenicy w fazie kwitnienia opryskiwano zawiesiną zarodników w ilości około 100 ml zawiesiny na 1 m². Inokulacja prowadzona była oddzielnie na każdym poletku na początku kwitnienia i powtarzana około 3 dni później w fazie pełni kwitnienia. W fazie tej pszenica jest najbardziej wrażliwa na infekcje kłosa przez *Fusarium*. Inokulacje prowadzone były w godzinach wieczornych, kiedy wzrastała względna wilgotność powietrza.

W czasie żniw zebrano ręcznie po 100 kłosów z każdego poletka. Kłosa młócone były młocarnią laboratoryjną o słabym nawiewnie w celu zapobieżenia utracie lekkich porażonych ziarniaków.

Przygotowanie ekstraktów

Do analizy polifenoli oraz aktywności przeciwutleniającej pobrane zostały próby ziarna o masie 50 g. Próby wysuszono do osiągnięcia suchej masy. Próby ziarna zmielono za pomocą młynka laboratoryjnego (WŻ-1). Masa ziarna do analizy wynosiła 10 g. Ekstrakcję wykonano w trzech powtórzeniach. Ekstrakcję prowadzono początkowo 40 cm³ 0,16 M HCl w 80% metanolu (v/v) przez 2 godz., z delikatnym mieszaniem w wytrząsarce z łaźnią wodną o temp. $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Następnie próbki wirowano ($4000 \times g$), supernatant zachowano, a osad ponownie ekstrahowano w podanych warunkach 40 cm³ 70% wodnego roztworu acetonu (v/v). Po odwirowaniu oba ekstrakty łączono i przechowywano w temperaturze -20°C . Przed przystąpieniem do analiz ekstrakty rozpuszczano w 100 ml MeOH (HPLC) i dzielono na 2 części.

Ogólna zawartość wolnych kwasów fenolowych (FPA — z ang. free phenolic acids)

Całkowitą zawartość związków fenolowych w ekstraktach oznaczono metodą z zastosowaniem odczynnika Folina-Ciocalteu (Singleton i Rossi, 1965).

Do 0,125 ml ekstraktu dodawano 0,5 ml dejonizowanej wody i 0,125 ml odczynnika Folina-Ciocalteu'a, a po 6 min 1,25 ml 7% wodnego roztworu Na₂CO₃ i 1 ml dejonizowanej wody. Po 90 min odczytywano absorbancję przy długości fali $\lambda = 760$ nm wobec wody. Wyniki wyrażano w mg/kg próbki. Próby wykonywano w trzech powtórzeniach, a przedstawione wyniki stanowią wartość średnią. Zastosowano standard w postaci kwasu galusowego.

Metoda ABTS^{•+}

Aktywność przeciwnadrodnikową badanych ekstraktów oznaczono metodą TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) z kationorodnikiem ABTS^{•+} (2,2-azynobis. (3etylobenzotiazolino-6-sulfonian) korzystając ze zmodyfikowanej metodyki Re i in. (1999) (Gliszczyńska-Świąło i in., 2006).

Zasada oznaczania aktywności antyoksydacyjnej polega na określeniu stopnia zmiatania rodników ABTS^{•+} wytworzonych uprzednio podczas reakcji chemicznych (np. z ditlenkiem manganu, związkiem ABAP oraz nadsiarczanem potasu). Wytworzone podczas reakcji rodniki mają barwę niebieskozieloną, antyoksydanty redukując kationorodnik powodują zanik barwy roztworu, przy czym spadek intensywności

zabarwienia zależy od zawartości przeciwutleniaczy w roztworze. Zmianę rodniaków śledzono spektrofotometrycznie, przy długości fali 734 nm. Zawartość przeciwutleniaczy wyrażono w μmol TROLOX/100g s.m. Wyniki przedstawiono w mg/kg próbki. Próby wykonywano w trzech powtórzeniach, a przedstawione wyniki stanowią wartość średnią.

Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki poddano dwuczynnikowej analizie wariancji (ANOVA). Ocena istotności różnic pomiędzy średnimi została przeprowadzona przy użyciu wielokrotnego testu Duncana dla poziomu istotności $P < 0,05$. Zależność pomiędzy zawartością polifenoli a aktywnością antyoksydacyjną wyrażono w postaci współczynnika korelacji. Dla średnich z wszystkich wyników podano także wartości odchylenia standardowego.

WYNIKI

Zawartość związków fenolowych w analizowanych próbach ekstraktów z ziarna pszenicy naturalnie porażonego oraz inokulowanego grzybami z rodzaju *Fusarium* przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2

Zawartość ogółem wolnych kwasów fenolowych (FPA) (mg/kg) w ekstraktach z ziarna pszenicy poddanej inokulacji grzybami z rodzaju *Fusarium* (inokulowane) oraz naturalnie porażonej (kontrola)
Content of free phenolic acids (FPA) (mg/kg) in extracts from grain of wheat inoculated with *Fusarium culmorum* (inoculated) and naturally infected (control)

Odmiana Variety	Zawartość fenoli ogółem (FPA) (mg/kg) Content of free phenolic acids (FPA) (mg/kg)		Pojemność przeciwutleniająca (μmol TROLOX/100g s.m.) Antioxidant activity (μmol TROLOX/100g s.m.)	
	kontrola control	inokulowane inoculated	kontrola control	inokulowane inoculated
1	2	3	4	5
Legenda	530	540	1362	1423
Kohelia	532	543	1024	1294
Markiza	522	546	1267	1308
Mewa	543	553	970	1024
Slade	551	556	929	1199
Dorota	530	561	970	1145
Ostroga	532	563	956	1172
Anthus	551	567	1267	1402
Ludwig	546	568	1429	1443
Batuta	543	575	1308	1808
Meteor	540	575	1105	1227
Turkis	557	576	1218	1240
Belenus	552	580	794	1348
Boomer	546	580	1213	1429
Sukces	564	580	848	1240
Akteur	553	585	1673	1849
Bogatka	561	585	1281	1740
Muszelka	585	585	1294	1822
Alcazar	569	588	1592	1781

c.d. Tabela 2

1	2	3	4	5
Smuga	546	588	1254	1321
Nateja	583	591	943	1159
Figura	572	596	1416	1632
Jenga	577	599	1159	1727
Kampana	580	614	1754	1835
Garantus	561	625	1456	1510
Ostka Strzelecka	564	628	1443	1619
Tonacja	572	636	1105	1362
Zyta	567	636	956	1375
Naridana	588	654	1267	1416
Mulan	569	665	1294	1362
Średnia±SD	557 ^a ±17,79	588 ^b ±32,15	1218 ^a ±240,78	1440 ^b ±158,37
Mean±SD				
NIR #	11,81		108,54	
LSD#				

±SD odchylenie standardowe

±SD standard deviation

Absorbancja — metoda ABTS+

* Absorbance, ABTS*+ method

a, b — takie same litery w liniach oznaczają brak istotnych różnic na poziomie ufności $p = 0,01$ a, b — identical letters in rows denote a lack of significant differences at a significance level $p = 0.01$

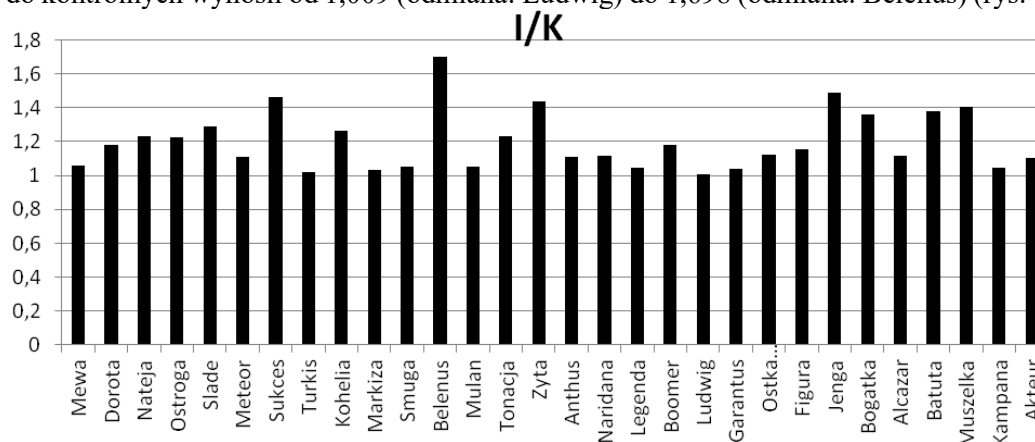
— Dla porównania średnich z dwóch wariantów (kontrola, inokulowane)

— For comparison of means of two variants (control, inoculated)

Stwierdzono, iż największa zawartość tych związków biologicznie czynnych znajduje się w próbach ziarna inokulowanego i wynosi od 540 do 665 (mg/kg). Niższe stężenie polifenoli ogółem wyznaczono w próbach naturalnie porażonych (kontrolnych) od 530 do 569 (mg/kg). Obliczony współczynnik korelacji między populacją prób kontrolnych i inokulowanych był wysoce istotny na poziomie ufności $P < 0,05$ i wynosił $r = 0,728$. Do odmian zawierających najwięcej polifenoli należały odpowiednio: Kampana, Garantus, Ostka Strzelecka, Tonacja, Zyta, Naridana oraz Mulan. Przeprowadzona analiza wariancji nie wykazała istotnych różnic między badanymi odmianami pod względem zawartości polifenoli ogółem. Porównując wyniki absorbancji i wynikające z nich zawartości polifenoli dla poszczególnych odmian stwierdzono, iż dla wszystkich zawartość bioaktywnych związków jest wyższa w próbach inokulowanych niż w próbach kontrolnych.

Przeprowadzono również badania aktywności antyoksydacyjnej pozyskanych ekstraktów. Uzyskane wyniki zdolności ekstraktów do eliminacji wolnych rodników ABTS*+ prób kontrolnych i inokulowanych 30 odmian pszenicy przedstawiono tabeli 2. Odmiany przedstawiono na wykresie w kolejności od odmian cechujących się najniższym potencjałem antyoksydacyjnym (Mewa, Dorota, Nateja, Ostroga, Slade) do odmian o najwyższym (Alcetar, Batuta, Muszelka, Kampana i Akteur). Obliczony współczynnik korelacji dla potencjału antyoksydacyjnego między populacją prób kontrolnych i inokulowanych był wysoce istotny na poziomie ufności $P < 0,05$ i wynosił $r = 0,751$. W przypadku aktywności przeciwutleniającej zaobserwowano podobną tendencję, jak w przypadku zawartości polifenoli ogółem stwierdzając, iż zdolność zmiatania wolnych

rodników ABTS jest wyższa w próbach inokulowanych niż w próbach kontrolnych. Obliczony stosunek aktywności przeciwutleniającej w próbach inokulowanych w stosunku do kontrolnych wynosił od 1,009 (odmiana: Ludwig) do 1,698 (odmiana: Belenus) (rys. 1).



Rys. 1. Wykres wartości współczynnika krotności dla zdolności antyoksydacyjnej ekstraktów z ziarna pszenicy poddanej inokulacji grzybami z rodzaju *Fusarium* oraz naturalnie porażonej (kontrola)
Fig. 1. A graph for multiplicity factor values for antioxidant activity of extract from grain of wheat inoculated with *Fusarium* fungi and naturally infected (control)

DYSKUSJA

Zboża uprawiane w warunkach naturalnych narażone są na wpływ niekorzystnych czynników określanych, jako stresy środowiskowe. Należą do nich infekcje zarówno bakteryjne, jak i grzybicze, ochrona chemiczna, stres wodny, mineralny oraz świetlny. W warunkach wymienionych stresów pojawiają się w roślinach mechanizmy obronne, dzięki którym wzrasta ich odporność na niekorzystne czynniki środowiskowe (Metraux, 2001). Przykładem tego typu działań jest m.in. wywołanie u roślin indukowanej odporności nabytej (SAR) (Bi i in., 1995; Clark i in., 2002). W naturalnych warunkach pojawia się ona u roślin w wyniku działania patogenów (Wiśniewska i Kowalczyk, 2005). Jednym z mechanizmów, który odgrywa istotną rolę w odpowiedzi rośliny na czynniki stresogenne jest mechanizm antyoksydacyjny. Bardzo istotną rolę pełnią w nim związki fenolowe. Wyniki licznych badań wykazują, że związki fenolowe mogą opóźniać fazę inicjacji lub przerywać łańcuch reakcji wolnorodnikowych (Ray Narayana i in., 2001; Dykes i Rooney, 2007). W ramach niniejszej pracy przedstawiono wyniki zawartości polifenoli ogółem w ekstraktach pochodzących z 30 odmian pszenicy ozimej. Niezbyt obszerna przedmiotowa literatura wskazuje, iż odporność odmiany na choroby grzybicze związana jest z większą zawartością związków fenolowych (Boutigny i in., 2008). Związki te mogą wpływać na ilość i jakość produkowanych toksyn fuzaryjnych (Bakan i in., 2003; Bily i in., 2003). Przedstawione badania wskazują także na niewielkie różnice w poziomie FPA między poszczególnymi odmianami. Zaobserwowano mianowicie, iż infekcja grzybami z rodzaju

Fusarium spowodowała podwyższenie zawartości polifenoli ogółem w przypadku wszystkich odmian, co do tej pory nie było przedstawiane w światowej literaturze. Jest to związane z uwalnianiem kwasów fenolowych z form związanych, co stanowi jeden z elementów odpowiedzi nieenzymatycznych mechanizmów odpornościowych roślin.

Uzyskane wyniki zawartości wolnych związków fenolowych zostały poszerzone o badanie aktywności przeciwutleniającej ekstraktów z ziarna pszenicy. Zaobserwowane tendencje wzrostu aktywności przeciwutleniającej w wyniku inokulacji dotyczące poszczególnych odmian są bardzo interesujące i nie były do tej pory opisywane. Przedstawiony na rysunku 1 współczynnik krotności zdolności do zmiatania rodnika ABTS^{•+} wykazał, iż odmiany (np.: Belenus) cechujące się niską odpornością na choroby grzybowe wykazują wyższą aktywność antyoksydacyjną podczas zmasowanej infekcji grzybami z rodzaju *Fusarium*, w stosunku do tych, które uważane są za bardziej odporne na infekcje grzybicze. Pomimo, iż nie stwierdzono istotnej korelacji między aktywnością antyoksydacyjną a zawartością polifenoli, zaobserwowane dla całej populacji prób tendencje są podobne i wskazują na aktywację mechanizmu antyoksydacyjnego podczas infekcji grzybami z rodzaju *Fusarium*. Jest to prawdopodobnie związane z faktem, iż na aktywność przeciwutleniającą rośliny składają się nie tylko wolne kwasy fenolowe, ale przede wszystkim kwasy związane, głównie ferulowy, p-kumarynowy oraz wanilina (Stuper-Szablewska i in., 2014). Postuluje się, iż w związku z powyższym przeprowadzenie dalszych prac nad zawartością i aktywnością związków o właściwościach przeciwutleniających w ziarnie pszenicy uprawianej w zróżnicowanych warunkach stresogennych (takich jak działanie środków ochrony roślin, czy jednoczesna inokulacja grzybami z rodzaju *Fusarium* i ochrona chemiczna), które pozwolą na bardziej efektywne wyjaśnienie zagadnienia stresu oksydacyjnego w kontekście odporności roślin.

WNIOSKI

1. Próby inokulowane ziarna pszenicy ozimej charakteryzowały się wyższą w stosunku do prób kontrolnych zawartością polifenoli oraz aktywnością przeciwutleniającą, co wskazuje na inicjację nieenzymatycznych mechanizmów odpornościowych roślin w wyniku infekcji grzybiczej.
2. Znaleziona istotna różnica w aktywności przeciwutleniającej między odmianami wskazuje na zróżnicowaną odpowiedź roślin na infekcję grzybiczą.
3. Zaobserwowano wysoce istotne korelacje między próbami kontrolnymi i inokulowanymi zarówno dla zawartości polifenoli i aktywności przeciwutleniającej.
4. Określone na podstawie analiz chemicznych tendencje dla całej populacji prób wskazują na wzmożoną aktywność procesów antyoksydacyjnych w ziarnie pszenicy podczas infekcji grzybami z rodzaju *Fusarium*.

LITERATURA

- Adom K. K., Sorrells M. E., Liu R. H. 2003. Phytochemical profiles and antioxidant activity of wheat varieties. J. Agric. Food Chem. 51: 7825 — 7834.
- Anonim. 2010. Lista opisowa odmian 2010. Rośliny rolnicze. Zbożowe. COBORU, Słupia Wielka.

- Bakan B., Bily A. C., Melcion D., Cahagnier B., Regnault-Roger C., Philogène B. J., Richard-Molard D. 2003. Possible role of plant phenolics in the production of trichothecenes by *Fusarium graminearum* strains on different fractions of maize kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2826 — 2831.
- Bily A. C., Reid L. M., Taylor J. H., Johnston D., Malouin C., Burt A. J., Bakan B., Regnault-Roger C., Pauls K. P., Arnason J. T., Philogène B. J. R. 2003. Dehydrodimers of ferulic acid in maize grain pericarp and aleurone: resistance factors to *Fusarium graminearum*. *Phytopathology* 93: 712 — 719.
- Bi Y. M., Kenton P., Mur L., Darby R., Draper J. 1995. Hydrogen peroxide does not function downstream of salicylic acid in the induction of PR protein expression. *Plant J.* 8: 235 — 245.
- Boutigny A. L., Richard-Forget F., Barreau C. 2008. Natural mechanisms for cereal resistance to the accumulation of *Fusarium* trichothecenes. *Eur J Plant Pathol.* 121: 411 — 423.
- Centralny Ośrodek Badania Odmian Roślin Uprawnych. Rejestracja odmian, weryfikacja: 2015 — <http://www.coboru.pl/>.
- Ciołek A., Makarska E. 2004. Wpływ chemicznej ochrony na aktywność antyoksydacyjną polefenoli i frakcji tokoferoli ziarniaków pszenicy twardej (*Triticum durum* Desf.) *Biul. IHAR* 231: 147 — 156.
- Clark S. F., Guy P. L., Burrit D. J., Jameson P. E. 2002. Changes in the activities of antioxidant enzymes in response to virus infection and hormone treatment. *Physiol. Plant.* 114: 157 — 164.
- Dykes L., Rooney W. 2007. Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits. *Cereal Foods World.* 52: 105 — 111.
- Gliszczynska-Świątło A., Ciska E., Pawlak-Lemańska K., Chmielewski J., Borkowski T., Tyrakowska B. 2006. The changes in the content of health-promoting compounds and antioxidant activity of broccoli upon domestic processing. *Food Addit. Contam.* 23: 1088 — 1098.
- Góral T., Walentyn-Góral D. 2014. Odporność odmian i linii pszenicy jarej na fuzariozę kłosów powodowaną przez grzyb *Fusarium culmorum*. *Biul. IHAR* 271: 3 — 16.
- Góral T., Stuper-Szablewska K., Buśko M., Boczkowska., Walentyn-Góral D., Wiśniewska H., Perkowski J. 2015. Relationships between genetic diversity and *Fusarium* toxins profiles of winter wheat cultivars. *J. Plant Pathol.* 31 (2): 1 — 19.
- Gumul D., Korus J., Achremowicz B. 2005. Wpływ procesów przetwórczych na aktywność przeciwutleniającą surowców pochodzenia roślinnego. *Żywn. Nauk. Technol. Jakość* 4 (45) Supl.: 41 — 48.
- Hodžić Z., Pasalic H., Memisevic A., Srabovic M., Saletovic M., Poljakovic M. 2009. The influence of total phenols content on antioxidant capacity in the whole grain extracts. *Eur. J. Sci. Res.* 3 (28): 471 — 477.
- Khan W., Rayirath U.P., Subramanian S., Jithesh M. N., Rayorath P., Hodges D. Mark, Critchley A.T., Craigie J. S., Norrie J., Prithiviraj B. 2009. Seaweed Extracts as Biostimulants of Plant Growth and Development. *J. Plant Growth Regul.* 28 (4): 386 — 399.
- Mettraux J. P. 2001. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. *Europ. J. Plant Pathol.* 13 — 18.
- Ochodzki P., Góral T. 2006. Production of mycotoxins by selected *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates cultured on rice and wheat. *Conference Papers of 28. Mykotoxin-Workshop, Bydgoszcz, 29–31 May 2006:* 73.
- Ray Narayana K., Sripal Reddy M., Chaluvadi M. R., Krishna D. R. 2001. Bioflavonoids Classification, Pharmacological, Biochemical Effects and Therapeutic Potential. *Indian Journal of Pharmacology*, 33: 2 — 16.
- Re R., Pellerini N., Proteggente A., Pannala A. S., Yang M., Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 1231 — 1231.
- Silverman F. P., Petracek P. D., Heiman D. F., Fledderman C. M., Warrior P. 2005. Salicylate activity. 3. Structure relationship to systemic acquired resistance. *J. Agric. Food Chem.* 53 (25): 9775 — 9780.
- Singleton V. L., Rossi J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 144 — 158.
- Snijders C. H. A., Perkowski J. 1990. Effects of head blight caused by *Fusarium culmorum* on toxin content and weight of wheat kernels. *Phytopathol.* 80: 566 — 570.
- Stuper-Szablewska K., Kurasiak-Popowska D., Nawracała J., Perkowski J. 2014. Comparison of phenolic acids contents in various wheat genotypes (Porównanie profile kwasów fenolowych w różnych genotypach pszenicy). *Przem. Chem.* 93/12: 2274 — 2278.

- Wiśniewska H., Góral T., Ochodzki P., Walentyn-Góral D., Kwiatek M., Majka M., Grzeszczak I., Belter J., Banaszak Z., Pojmaj M., Kurlito D., Konieczny M., Budzianowski G., Cicha A., Paizert K., Woś H. 2014 a. Odporność rodów hodowlanych pszenżyta ozimego na fuzariozę kłosów. Biul. IHAR 271: 29 — 43.
- Wiśniewska H., Kowalczyk K. 2005. Resistance of cultivars and breeding lines of spring wheat to *Fusarium culmorum* and powdery mildew. J. Appl. Genet. 46: 35 — 40.
- Wiśniewska H., Stępień Ł., Waśkiewicz A. Beszterda M. Góral T. Belter J. 2014 b. Toxigenic *Fusarium* species infecting wheat heads in Poland. Cent. Eur. J. Biol. 9: 163 — 172.

TOMASZ GÓRAL ¹
PIOTR OCHODZKI ¹
DOROTA WALENTYN-GÓRAL ¹
JOLANTA BELTER ²
MACIEJ MAJKA ²
MICHAŁ KWIATEK ²
HALINA WIŚNIEWSKA ²
JERZY BOGACKI ³
TADEUSZ DRZAZGA ⁴
BOGUSŁAWA ŁUGOWSKA ³
PRZEMYSŁAW MATYSIK ⁵
EDWARD WITKOWSKI ⁶
KRZYSZTOF RUBRYCKI ⁷
URSZULA WOŹNA-PAWLAK ⁷

¹ Zakład Fitopatologii, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — PIB, Radzików

² Zakład Genomiki, Instytut Genetyki Roślin PAN, Poznań

³ DANKO Hodowla Roślin, Choryń

⁴ Małopolska Hodowla Roślin HBP, Kraków

⁵ Hodowla Roślin Strzelce, Strzelce

⁶ Hodowla Roślin Smolice, Smolice

⁷ Poznańska Hodowla Roślin, Tulce

Odporność genotypów pszenicy ozimej na fuzariozę kłosów i akumulację toksyn fuzaryjnych w ziarnie scharakteryzowana za pomocą różnych typów odporności *

Resistance of winter wheat lines to *Fusarium* head blight and *Fusarium* toxins accumulation characterized using different types of resistance

W doświadczeniach infekcyjnych w warunkach polowych w Radzikowie i Poznaniu/Cerekwicy
badano odporność na fuzariozę kłosów 224 genotypów oraz 10 odmian/linii wzorcowych pszenicy

* Badania finansowano częściowo ze środków projektu MRiRW: Badania Podstawowe na rzecz Postępu
Biologicznego w Produkcji Roślinnej; decyzja HORh-801-12/14; lp. 6
Praca przedstawiona na konferencji IHAR — PIB, Zakopane, 3 lutego 2015 roku

Redaktor prowadzący: Barbara Zagdańska

ozimej. Genotypy te pochodziły z programów hodowlanych pszenicy ozimej oraz z kolekcji utworzonej w wyniku badań nad odpornością na fuzariozę kłosów w latach 2008–2013. Kłosa pszenicy inokulowane były izolatami *Fusarium culmorum*. Oceniano porażenie kłosa oraz stopień uszkodzenia ziarniaków. W ziarnie wybranych 61 genotypów analizowano zawartość ergosterolu, trichotecenów z grupy B oraz zearalenonu. Genotypy pszenicy były istotnie zróżnicowane pod względem odporności na fuzariozę kłosów. Średni indeks fuzariozy wyniósł 23,7%. Stwierdzono istotny wpływ wysokości roślin na wartość indeksu fuzariozy kłosów ($r = -0,528$). Badane genotypy wykazały zróżnicowaną odporność na uszkodzenie ziarniaków przez *Fusarium* (średnio 48,4%) oraz zróżnicowaną zawartość ergosterolu w ziarnie (średnio $30,9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Nasilenie fuzariozy kłosów istotnie korelowało z uszkodzeniem ziarniaków pszenicy ($r = 0,768$). Genotypy pszenicy wykazały zróżnicowaną odporność na akumulację toksyn fuzaryjnych. Średnia zawartość deoksyniwalenolu (+pochodne acetylowe) wyniosła $20,515 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, natomiast zearalenonu $932 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. Stopień porażenia kłosów, odporność typu II oraz uszkodzenie ziarniaków korelowały istotnie z zawartością ergosterolu, deoksyniwalenolu i zearalenonu w ziarnie. Zidentyfikowano genotypy łączące odporności różnych typów na fuzariozę kłosów.

Słowa kluczowe: *Fusarium culmorum*, fuzarioza kłosów, pszenica ozima, trichoteceny, zearalenon

The resistance to *Fusarium* head blight (FHB) of 224 lines and 10 check cultivars/lines of winter wheat was evaluated in the field experiments in Radzików and Poznań/Cerekwica. These lines originated from breeding programs of winter wheat and from the collection established based on the results of studies on the resistance to FHB in the years 2008-2013. Spikes of wheat were inoculated with *Fusarium culmorum*. Spike infection and *Fusarium* kernel damage were scored. In grain of selected 61 lines accumulation of ergosterol, trichothecenes of group B, and zearalenone was analyzed. Wheat genotypes varied significantly in resistance to FHB. The average FHB index amounted to 23.7%. A significant effect of plant height on the FHB index value ($r = -0.528$) was found. The tested lines showed varied resistance to *Fusarium* kernel damage (on average: 48.4%) and ergosterol content in grain (on average: $30.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). The severity of spike infection significantly correlated with *Fusarium* kernel damage ($r = 0.768$). Wheat genotypes showed varied resistance to accumulation of *Fusarium* toxins. Average contents of deoxynivalenol (+ acetyl derivatives) amounted to $20.515 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, while zearalenone to $932 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. The spike infection, resistance of type II and *Fusarium* kernel damage correlated significantly with the contents of ergosterol, deoxynivalenol and zearalenone in the grain. Genotypes integrating the various types of resistance to FHB were identified.

Key words: *Fusarium culmorum*, *Fusarium* head blight, trichothecenes, wheat, zearalenone

WSTĘP

Fuzarioza kłosów jest chorobą zbóż powodowaną przez kompleks grzybów z rodzaju *Fusarium* (głównie *F. culmorum* i *F. graminearum*) (Bottalico, 1998; Bottalico i Perrone, 2002). Grzyby te wytwarzają toksyczne metabolity — mikotoksyny. Porażenie kłosa przez *Fusarium* prowadzi do uszkodzenia ziarniaków i akumulacji toksyn fuzaryjnych w ziarnie (Snijders, 1990; Miller, 2008). W przypadku spożycia żywności lub paszy wytworzonej ze skażonego ziarna stanowią one zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. Ze względu na ilości stwierdzane w ziarnie zbóż najważniejszymi toksynami fuzaryjnymi są deoksyniwalenol (DON) i zearalenon (ZEA) (Bottalico i Perrone, 2002). Na odporność na fuzariozę kłosów pszenicy składa się kilka typów (mechanizmów): odporność na infekcję (typ I), odporność na rozprzestrzenianie się *Fusarium* w kłosie (typ II), odporność na uszkodzenie ziarniaków przez *Fusarium* (typ III), tolerancja na akumulowane toksyny (niskie porażenie ziarna lub mała redukcja plonu mimo silnego porażenia kłosa lub dużej

zawartości toksyn w ziarnie) (typ IV) oraz odporność na akumulację toksyn fuzaryjnych w ziarnie (typ V) poprzez ich chemiczną modyfikację (klasa 1) lub blokowanie syntezy (klasa 2) (Mesterhazy, 2002; Boutigny i in., 2007; Foroud i Eudes, 2009).

Celem badań było wstępne zidentyfikowanie genotypów pszenicy ozimej o zwiększonej odporności na fuzariozę kłosów powodowaną przez grzyb *Fusarium culmorum* i niskiej akumulacji toksyn fuzaryjnych w ziarnie. Badanie odporności różnych typów pozwoli na znalezienie genotypów łączących te odporności, a tym samym charakteryzujących się stabilną reakcją w różnych warunkach środowiska i uprawy.

MATERIAŁ I METODY

W roku 2014 w doświadczeniach infekcyjnych w Radzikowie i Cerekwicy badano odporność na fuzariozę kłosów 224 genotypów oraz 14 odmian/linii wzorcowych pszenicy ozimej. Genotypy te pochodziły z programów hodowlanych pszenicy ozimej (152 genotypy — DW 2014) oraz z kolekcji utworzonej w wyniku badań nad odpornością na fuzariozę kłosów w latach 2008–2013 (68 genotypy — „odporne”). Wzorce stanowiły odmiany wysoko plonujące — KWS Ozon, Patars oraz wzorzec o wysokiej jakości wypiekowej ziarna — odmiana Tonacja (www.coboru.pl/dr/Publ/Wynikow/PDO/WWPO_Zbozaozime_2014.pdf); linie/odmiany o wysokiej odporności na fuzariozę kłosów — A40-19-1-2 (R), UNG 136.6.1.1 (VR), Arina (R), 20828 (R) (Buerstmayr i in., 1999, 2008; Paillard i in., 2004); genotypy pszenicy o wysokiej podatności na porażenie kłosa w roku 2013 — SMH 8694 (S), SMH 8816 (S), NAD 10079 (S) oraz genotypy pszenicy akumulujące znaczne ilości trichotecenów w 2013 — DD 548/09 (Tox), DM 2728/09 (Tox), DM 3131/10 (Tox), STH 102 (Tox) (Góral T. i in., — wyniki niepublikowane).

Kłosa pszenicy w fazie kwitnienia zostały opryskane zawiesiną zarodników *Fusarium culmorum*. Do wytworzenia inokulum wybrano trzy izolaty *Fusarium culmorum* tworzące deoksyniwalenol (KF846, ZFR 16 — chemotyp DON) i zearalenon (ZFR 112 — chemotyp DON). Izolaty należące do chemotypu DON pochodziły z Radzikowa i zostały wyizolowane z kłosów pszenicy (Wiśniewska i Kowalczyk, 2005; Ochodzki i Góral, 2006).

Szczegółowa metodyka założenia doświadczenia, produkcji inokulum oraz inokulacji była zbliżona do opisanej w pracy Wiśniewskiej i in. (2014).

Ocenę porażenia rozpoczęto po pojawieniu się objawów fuzariozy kłosów. Obserwacje przeprowadzono 2-krotnie: po 14 i 21 dniach od inokulacji. Nasilenie fuzariozy kłosów (typ odporności I + II) zostało określone na podstawie proporcji porażonych kłosów w kłosie (tylko w kłosach z objawami choroby) oraz proporcji kłosów prażonych na poletku. Z tych wartości wyliczono indeks fuzariozy kłosów (IFK):

$$IFK = (\% \text{ porażenia kłosa } \times \% \text{ kłosów porażonych na poletku}) / 100.$$

Przeprowadzono zbiór ręczny 30 dojrzałych inokulowanych kłosów z każdego poletka. Kłosa wymłócono ręcznie, Proporcję ziarniaków uszkodzonych przez *Fusarium* (FDK) określano poprzez podział próby ziarniaków na zdrowe i ziarniaki z objawami porażenia

(typ odporności III) (Argyris i in., 2003). Do oceny FDK wybrano 126 genotypów o odporności na porażenie kłosa powyżej średniej.

Na podstawie wartości IFK oraz FDK wybrano 47 genotypów o najwyższej odporności typów I, II oraz III (32 z grupy „odporne” oraz 15 z grupy DW2104). W ziarnie tych genotypów oraz 14 odmian/linii wzorcowych analizowano zawartość ergosterolu (ERG) (typ odporności III), trichotecenów z grupy B (deoksyniwalenol [DON], 3-acetyldeoksyniwalenol, 15-acetyldeoksyniwalenol, niwalenol) (typ odporności V) oraz zearalenonu (ZEA) Zawartość trichotecenów z grupy B (DON, pochodne acetylowe DON — 3-AcDON, 15-AcDON, NIV) w ziarnie analizowano przy wykorzystaniu techniki chromatografii gazowej z detekcją wychwytu elektronów (GC-ECD) (Perkowski i in 2007, 2008). Mikotoksyny ekstrahowano z 5 g zmielonego ziarna za pomocą 25 ml wodnego roztworu acetonitrylu (acetonitryl:woda 84:16 v/v) wytrząsając na wytrząsarce przez 2 h. Próbkę odwirowano ($3000 \text{ obr} \times \text{min}^{-1}$, 5 min.), a uzyskany w ten sposób ekstrakt oczyszczono na kolumnie Trich 227+ (RomerLabs). Do 4 ml oczyszczonego ekstraktu dodano 1 μg wzorca wewnętrznego (chloraloza) i odparowano do sucha w strumieniu powietrza. Mikotoksyny przeprowadzono w pochodne (etry trimetylosilylowe) za pomocą mieszaniny silylującej Sylon BTZ (BSA+TMCS+TMSI, 3:2:3, Supelco). Upochodnione mikotoksyny rozpuszczono w izooktanie, a nadmiar czynnika silylującego rozłożyło i usunięto za pomocą wody. Warstwę organiczną przeniesiono do fiolki autosamplera i poddano analizie chromatograficznej przy użyciu chromatografu SRI 8610C, wyposażonego w kapilarną kolumnę BGB-5MS, o długości 30m i średnicy wewnętrznej 0,25 mm. Gazem nośnym był wodór. Chromatogram rozwijano w gradiencie temperatury od 170°C do 310°C, szybkość wzrostu temperatury $5^\circ\text{C} \times \text{min}^{-1}$. Detekcję mikotoksyn prowadzono za pomocą detektora wychwytu elektronów (ECD). Identyfikacji poszczególnych związków dokonano przez porównanie czasów wymywania z kolumny czystych wzorców mikotoksyn: DON, 3AcDON, 15AcDON, NIV (Sigma-Aldrich). Stężenie mikotoksyn określono na podstawie krzywej kalibracji, z zastosowaniem chloralozy, jako wzorca wewnętrznego.

Zawartość zearalenonu (ZEA) oznaczano za pomocą ilościowego testu immunoenzymatycznego AgraQuant® zearalenone zgodnie z procedurą podaną przez producenta (Wiśniewska i in., 2014).

Zawartość ergosterolu określono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (Perkowski i in., 2007, 2008). Ergosterol został wyekstrahowany roztworem metanolu w środowisku alkalicznym przy jednoczesnym zmydłaniu z użyciem promieniowania mikrofalowego. Po neutralizacji roztworu, ergosterol został wyekstrahowany do fazy organicznej za pomocą pentanu. Po wysuszeniu w strumieniu azotu ergosterol był rozpuszczany w metanolu i rozdzielany chromatograficznie techniką HPLC na kolumnie krzemionkowej za pomocą metanolu. Detekcja prowadzona była na detektorze UV przy długości fali $\lambda = 282 \text{ nm}$. Identyfikacji ergosterolu dokonano na podstawie czasu retencji. Ilość ergosterolu została określona na podstawie krzywej kalibracyjnej czystego wzorca (metoda wzorca zewnętrznego).

Dla 30 genotypów (z grupy „odporne”), które wykazały wysoką odporność na fuzariozę kłosów i akumulację toksyn w doświadczeniach polowych określono dodatkowo

odporności typu I oraz typu II. Do badań włączono również 12 odmian/linii wzorcowych. Badania przeprowadzono w dwóch niezależnych doświadczeniach w IHAR — PIB Radzików. Metodyka opisana została w pracy Górala i in. (2015).

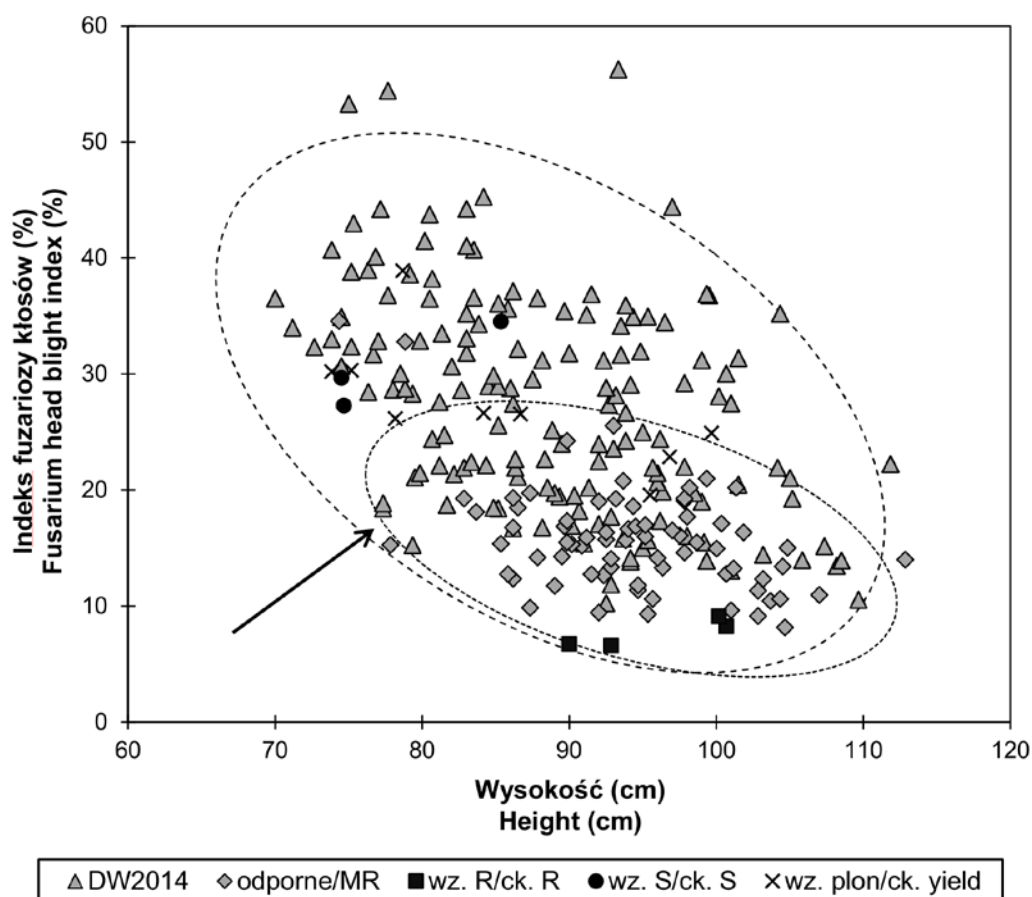
Analiza statystyczna została wykonana za pomocą pakietu Microsoft® Excel 2010/XLSTAT©-Pro (Version 2013.4.07, Addinsoft, Inc., Brooklyn, NY, USA). Przeprowadzono analizę wariancji dla IFK, FDK, ERG, DON i ZEA (XLSTAT: ANOVA). Obliczono współczynniki korelacji IFK, FDK, oraz zawartości poszczególnych metabolitów *Fusarium* (XLSTAT: *Correlation tests*). W celu zgrupowania rodów na podstawie różnych typów odporności w dwóch latach badań zastosowano metodę analizy składowych głównych (XLSTAT: *PCA*).

WYNIKI I DYSKUSJA

Średnie nasilenie fuzariozy kłosów dla 224 genotypów pszenicy ozimej wyniosło w Cerekwicy IFK = 23,9%, natomiast w Radzikowie IFK = 23,5%. Nie było istotnych statystycznie różnic pomiędzy indeksami fuzariozy kłosów w obu miejscowościach. Współczynnik korelacji pomiędzy IFK w Cerekwicy i IFK w Radzikowie był istotny i wynosił $r = 0,605$. Zakres IFK mieścił się w granicach: Cerekwica — 5,9% (STH 1144) — 72,5% (KBP 0938), Radzików — 0,5% (UNG 136.6.1.1) — 54,7% (KBP 1121). Dla genotypów z grupy DW2104 IFK wyniósł: 28,2% w Cerekwicy i 26,8% w Radzikowie, natomiast dla genotypów z grupy „odporne” było to: 15,1% w Cerekwicy i 16,4% w Radzikowie.

Wysokość roślin pszenicy w Cerekwicy była znacznie mniejsza niż w Radzikowie i wynosiła odpowiednio 75,0 cm (52,0–102,0 cm) i 105,4 cm (81,7–136,3 cm). Jedynie 3 genotypy w Cerekwicy miały powyżej 100 cm, natomiast w Radzikowie było to 2/3 genotypów. Genotypy z grupy „odporne” miały większą średnią wysokość roślin (94,2 cm) w porównaniu do genotypów z grupy DW2014 (88,5 cm) (rys. 1). W obu lokalizacjach zależności pomiędzy grupami były takie same. Wysokość roślin istotnie, lecz słabo korelowała z IFK w Cerekwicy ($r = -0,204$), natomiast w Radzikowie współczynnik korelacji był wysoko istotny ($r = -0,628$). Wysokość roślin miała istotny negatywny wpływ na nasilenie fuzariozy kłosów ($r = -0,528$).

Genotypy w grupie „odporne” były istotnie słabiej porażane fuzariozą kłosów. W grupie DW2014 również zidentyfikowano genotypy wykazujące odporność np. STH 1144, POB 0513, STH 2041, NAD 11017. Większość tych genotypów charakteryzowała się jednakże wysokością powyżej 90 cm. Niższe porażenie genotypów wysokich jest głównie wynikiem ich morfologii i różnic w mikroklimacie na poziomie kłosa (Mesterhazy, 1995, 2002; Yan i in., 2011). Genotypy niskie (poniżej 80 cm) miały indeksy FK w większości powyżej 25%. Wyjątek stanowiły genotypy DD 137/10-4, NAD 10041, STH 1124, DL 414/10, DL 414/10/6/3 z grupy DW2014 oraz CHD 6651/06 z grupy odpornych.



DW2014 — genotypy z programów hodowlanych pszenicy ozimej, odporne — genotypy o podwyższonej odporności na fuzariozę kłosów, wz. R — wzorce odporne, wz. S — wzorce podatne, wz. plon — wzorce wysokopłonujące.

Rys. 1. Zależność indeksu fuzariozy kłosów od wysokości roślin 224 genotypów pszenicy ozimej.

Strzałką oznaczono genotypy odporne o wysokości poniżej 80 cm

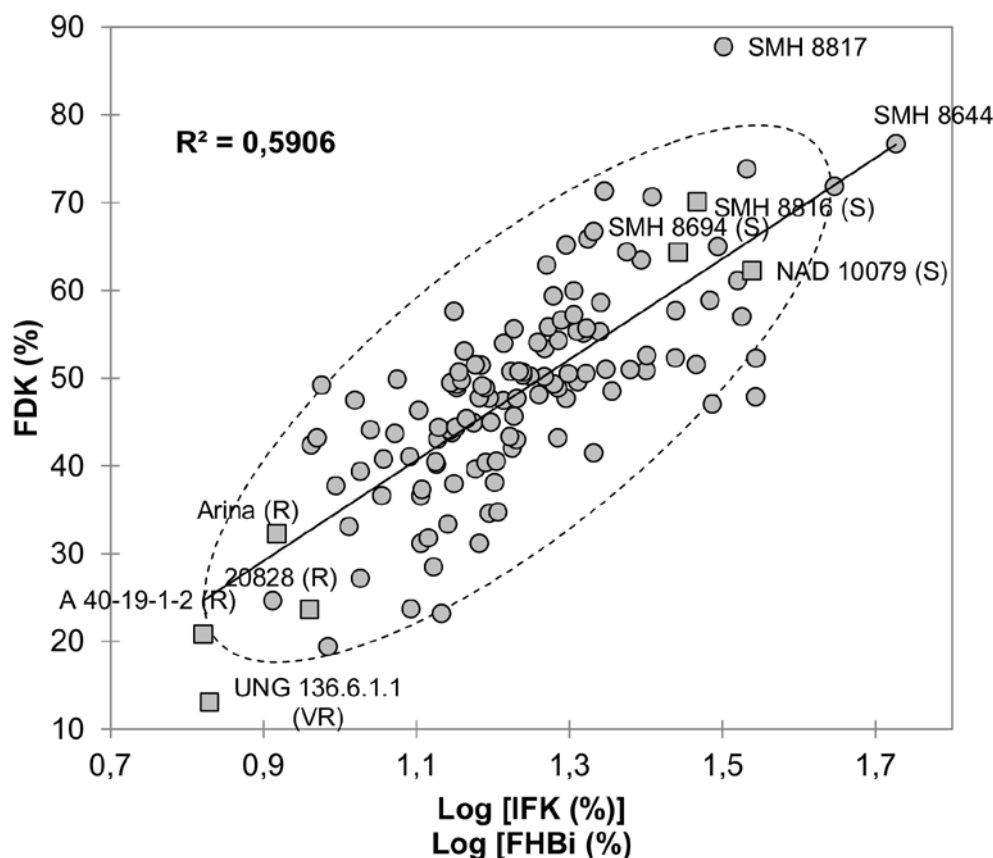
DW2014 — novel breeding lines, MR — medium resistant lines, ck. R — resistant checks, ck. S — susceptible checks, ck. yield — high-yielding checks

Fig. 1. Relationship between plant height and Fusarium head blight index for 224 lines of winter wheat. Resistant lines shorter than 80 cm are indicated with an arrow

Większa podatność genotypów niskich może również wynikać z obecności genu karłowatości *Rht-D1b* (Miedaner i Voss, 2008, Kollers i in., 2013). (Draeger i in., 2007) stwierdzili, że takie oddziaływanie genu *Rht-D1b* wynika ze sprzężenia z genami zwiększającymi podatność na fuzariozę kłosów lub fizjologicznego efektu pleiotropowego alleli karłowatości w locus *Rht-D1* zwiększającego podatność. Stwierdzono również, że gen *Rht-D1b* wpływał głównie na odporność typu I (odporność na infekcję) a nie typu II (odporność na rozprzestrzenianie się patogena) (Srinivasachary i in., 2008). Jednakże (Kollers i in., 2013) znaleźli istotny wpływ genu *Rht-D1* zarówno na występowanie

(związane z typem I odporności), jaki i nasilenie (związane z typem II odporności) fuzariozy kłosów.

Średnie uszkodzenie ziarniaków 126 genotypów pszenicy w Cerekwicy wyniosło 66,7%. Zakres reakcji mieścił się w granicach od 19,1% (UNG 136.6.1.1, C 3779/10) do 97,0% (SMH 8644). W Radzikowie wartość FDK wyniosła 30,0% i wahała się od 7,1% (UNG 136.6.1.1, C 3779/10) do 80,9% (SMH 8177). Średnie uszkodzenie ziarniaków korelowało istotnie z logarytmem ze średniego indeksu fuzariozy kłosów ($r = 0,768$) (rys. 2).



Rys. 2. Zależność pomiędzy zlogarytmowanym indeksem fuzariozy kłosów (IFK) a stopniem uszkodzenia ziarniaków przez *Fusarium* (FDK) dla 126 genotypów pszenicy ozimej. Średnie wartości z doświadczeń w Radzikowie i Cerekwicy. Oznaczono genotypy wzorcowe pszenicy (kwadraty)
 Fig. 2. Relationship between log-transformed Fusarium head blight index (FHBi) and proportion of *Fusarium* damaged kernels (FDK) for 126 lines of winter wheat. Mean values from experiments in Radzików and Cerekwica. Check lines/cultivars are marked with squares

Tabela 1

Odporność na fuzariozę kłosów 61 genotypów i odmian pszenicy ozimej inokulowanych izolatami *Fusarium culmorum* w doświadczeniach w Radzikowie i Cerekwicy. Genotypy uszeregowane wg wartości indeksu fuzariozy kłosów
Resistance to *Fusarium* head blight in 61 lines and cultivars of winter wheat inoculated with *Fusarium culmorum* in experiments in Radzików and Cerekwica. Lines ordered according to values of the *Fusarium* head blight index

L.p. No.	Genotyp Genotype	Odp. typu I (#PI) Type I res. (#IP)	Odp. typu II (#PK) Type II res. (#IS)	Średnia typ I+II Type I+II combined	IFK(%) ¹ FHBi (%) ¹	FDK (%) ¹
1	2	3	4	5	6	7
1	A 40-19-1-2 (R)	1,0	1,1	1,1	6,6	20,8
2	UNG 136.6.1.1 (VR)	2,0	1,1	1,6	6,8	13,1
3	KBP 1058	1,3	1,2	1,3	8,2	24,7
4	Arina (R)	2,0	1,7	1,9	8,3	32,3
5	20828 (R)	1,0	1,7	1,4	9,1	23,7
6	KBP 04.164	2,7	2,0	2,3	9,3	43,2
7	STH 9059	2,3	1,6	2,0	9,6	19,5
8	AND 1055/02	1,0	2,3	1,7	9,9	37,8
9	STH 1144	-	-	-	10,3	33,1
10	STH 008	1,3	3,3	2,3	10,6	27,2
11	POB 0111	1,0	2,0	1,5	10,6	39,4
12	DCh 4763/07	1,7	1,6	1,6	11,0	44,1
13	DED 389/-6	1,7	1,9	1,8	11,3	36,6
14	SMH 7983	1,0	2,1	1,6	11,8	43,7
15	LAD 463/05	1,0	2,6	1,8	12,4	23,7
16	MOB 5578/06	1,0	1,9	1,5	12,8	37,4
17	KBP 05.271	1,7	2,1	1,9	12,8	31,2
18	KBP 0820	3,0	2,2	2,6	12,8	36,6
19	NAD 11017	-	-	-	13,0	31,8
20	MOB ZB 301206	2,3	1,1	1,7	13,3	28,5
21	SMH 7974	1,7	2,3	2,0	13,4	43,1
22	POB 0211	1,0	1,6	1,3	13,4	40,2
23	KBP 1040	1,3	2,0	1,7	13,5	28,0
24	AND 143/10	-	-	-	13,5	44,4
25	C 3779/10	-	-	-	13,6	23,2
26	DM 2566/11	-	-	-	13,8	33,4
27	KBP 1013	-	-	-	13,9	44,0
28	DM 3131/10 (Tox)	1,7	2,8	2,2	14,1	57,6
29	DD 137/10-4	-	-	-	14,2	49,3
30	DC 332/09-3	2,7	2,3	2,5	14,2	48,9
31	DM 3873/10	3,0	2,0	2,5	14,5	53,1
32	POB 457/07	2,0	1,4	1,7	15,0	39,7
33	KOH 275	-	-	-	15,2	31,2
34	SMH 8553	1,0	1,9	1,5	15,2	47,8
35	STH 9007	2,0	1,3	1,7	15,5	40,4
36	POB 1013/10	-	-	-	15,7	36,0
37	STH 032	2,7	3,1	2,9	15,9	38,2
38	KBP 0936	-	-	-	16,0	40,6
39	POB 262/07	3,7	2,0	2,8	16,1	34,7

c.d. Tabela 1

1	2	3	4	5	6	7
40	STH 188	-	-	-	16,7	50,5
41	STH 087	1,7	2,6	2,1	16,8	42,1
42	STH 105	1,3	3,3	2,3	16,9	45,7
43	POB 0112	2,3	2,5	2,4	17,1	50,8
44	STH 102 (Tox)	1,7	3,2	2,4	17,3	50,3
45	C 4573/10	-	-	-	17,3	50,7
46	POB 0212	1,3	3,0	2,2	17,7	45,7
47	DM 2728/09 (Tox)	1,0	2,5	1,8	18,1	54,1
48	C 41/10	-	-	-	18,2	48,1
49	POB 0911	1,3	2,5	1,9	18,6	62,9
50	DD 548/09 (Tox)	2,0	1,6	1,8	19,3	52,3
51	Tonacja (wz)	1,7	2,9	2,3	20,4	55,4
52	POB 0713	-	-	-	20,5	49,6
53	KBP 1034	4,0	1,4	2,7	20,8	55,1
54	KBP 1017	-	-	-	21,0	55,7
55	NAD 11100	-	-	-	21,5	41,5
56	C 1/10	-	-	-	22,7	48,6
57	Patras (wz)	-	-	-	25,1	50,9
58	SMH 8816 (S)	3,0	3,1	3,1	27,3	70,1
59	SMH 8694 (S)	2,7	2,2	2,4	29,7	64,3
60	KWS Ozon (wz)	-	-	-	30,4	58,9
61	NAD 10079 (S)	3,3	3,3	3,3	34,5	62,3
Średnie Means		1,9	2,2	2,0	15,7	42,1

¹ — średnie wartości z doświadczeń w Radzikowie i Cerekwicy

¹ — mean values from experiments in Radzików and Cerekwica

#PI — liczba punktów infekcji, #PK — liczba porażonych kłosek, IFK — indeks fuzariozy kłosek, FDK — uszkodzenie ziarniaków

VR, R — wzorce odporne; S — wzorce podatne; Tox — wzorce o wysokiej akumulacji toksyn; wz — wzorce o wysokim plonie.

#IP — number of infection points, #IS - number of infected spikelets, FHBi — Fusarium head blight index, FDK — proportion of *Fusarium* damaged kernels

VR, R — resistant checks, S — susceptible checks, Tox — high toxin accumulation checks, wz — high yielding checks

Do analiz erosterolu i toksyn fuzaryjnych wybrano 61 genotypów (tab. 1). Najwyższą odporność na infekcję kłosa, z wyjątkiem wzorców odpornych, wykazały genotypy KBP 1058, KBP 04.164 oraz STH 9059. Podatne były, z wyjątkiem wzorców podatności, odmiany Patras i KWS Ozon. Najślabsze uszkodzenie ziarniaków, z wyjątkiem wzorców odpornych, wykazały genotypy STH 9059, C 3779/10, LAD 463/05, KBP 1058. Odmiana Arina (R) miała najwyższe uszkodzenie ziarniaków spośród wzorców odpornych.

Najwyższą odporność typu I miały dwa wzorce A 40-19-1-2 (R) i 20828 (R) oraz 8 innych genotypów pszenicy (Tab. 1). Najbardziej podatne były genotypy KBP 0820, DM 3873/10, POB 262/07, KBP 1034 oraz dwa wzorce podatne SMH 8816 (S) NAD 10079 (S). Najwyższą odporność typu II miały wzorce A 40-19-1-2 (R) i UNG 136.6.1.1 (VR) oraz genotypy pszenicy MOB ZB 301206, KBP 1058, STH 9007. Najbardziej podatne były genotypy STH 008 i STH 105 oraz dwa wzorce NAD 10079 (S) i STH 102 (Tox).

Summaryzna odporność obu typów była najwyższa u genotypów KBP 1058 i POB 0211 oraz wzorców A 40-19-1-2 (R) i 20828 (R), natomiast najniższa u dwóch wzorców podatnych NAD 10079 (S) i SMH 8816 (S).

Tabela 2

Akumulacja ergosterolu i toksyn fuzaryjnych w ziarnie 61 genotypów i odmian pszenicy ozimej inokulowanych izolatami *Fusarium culmorum* w doświadczeniach polowych w Radzikowie i Cerekwicy

Genotypy uszeregowane wg średniej ze standaryzowanych zawartości DON i ZEA

Accumulation of ergosterol and *Fusarium* toxins in grain of 61 winter wheat lines and cultivars inoculated with *Fusarium culmorum* in experiments in Radzików and Cerekwica. Lines ordered according to the average of standardised amounts of DON and ZEA

L.p. No.	Genotyp Genotype	ERG (mg·kg ⁻¹) ¹	DON (mg·kg ⁻¹) ¹	ZEA (μg·kg ⁻¹) ¹	ERG/DON
1	2	3	4	5	6
1	A 40-19-1-2 (R)	8,1	4,055	197	2,01
2	UNG 136.6.1.1 (VR)	13,9	7,888	196	1,76
3	STH 9059	15,9	8,189	193	1,94
4	NAD 11017	15,1	10,090	103	1,50
5	20828 (R)	14,6	8,510	351	1,71
6	KBP 1040	20,4	8,912	331	2,29
7	LAD 463/05	17,0	9,759	289	1,74
8	MOB 5578/06	20,0	10,710	360	1,87
9	C 3779/10	20,3	12,540	207	1,62
10	POB 0212	26,6	11,212	377	2,37
11	KBP 04.164	18,8	12,993	262	1,45
12	STH 1144	18,5	14,894	48	1,24
13	C 1/10	22,4	15,252	134	1,47
14	MOB ZB 301206	22,4	13,455	387	1,67
15	Arina (R)	17,2	15,859	126	1,09
16	KBP 05.271	22,5	14,523	359	1,55
17	KBP 1058	16,4	15,267	281	1,08
18	STH 008	19,6	16,775	186	1,17
19	KBP 1013	27,5	17,977	186	1,53
20	DED 389/-6	26,9	15,994	487	1,68
21	KBP 0820	29,1	17,062	370	1,71
22	POB 262/07	32,1	15,851	632	2,03
23	STH 9007	27,2	13,418	955	2,03
24	KOH 275	19,0	16,898	586	1,12
25	STH 105	30,1	19,243	319	1,57
26	POB 0713	37,7	19,637	300	1,92
27	SMH 7983	28,1	14,985	970	1,88
28	DM 3873/10	25,0	17,834	687	1,40
29	STH 032	35,6	15,232	1030	2,34
30	POB 0111	26,9	21,814	267	1,23
31	DM 2566/11	25,5	17,562	853	1,45
32	POB 1013/10	26,1	15,591	1168	1,68
33	STH 188	36,5	20,322	726	1,80
34	POB 457/07	33,2	20,783	684	1,60
35	C 41/10	28,2	24,399	242	1,15
36	STH 102 (Tox)	38,2	18,314	1065	2,09
37	DD 137/10-4	30,3	20,206	908	1,50
38	DC 332/09-3	34,5	22,664	597	1,52

c.d. Tabela 2

1	2	3	4	5	6
39	C 4573/10	36,2	26,876	93	1,35
40	SMH 7974	25,6	18,916	1213	1,35
41	AND 143/10	30,0	24,507	514	1,23
42	POB 0112	22,4	15,297	1727	1,47
43	KBP 1017	31,1	23,898	812	1,30
44	KBP 1034	30,5	27,092	488	1,12
45	DCh 4763/07	33,9	22,773	1120	1,49
46	POB 0211	33,2	27,686	617	1,20
47	KWS Ozon (wz)	58,0	25,315	1020	2,29
48	Tonacja	36,3	28,168	672	1,29
49	STH 087	38,1	21,104	1568	1,80
50	Patras (wz)	30,0	26,094	1011	1,15
51	SMH 8553	29,0	26,663	1084	1,09
52	DM 3131/10 (Tox)	51,6	32,520	856	1,59
53	DM 2728/09 (Tox)	47,9	28,156	1466	1,70
54	KBP 0936	35,3	26,448	1852	1,33
55	AND 1055/02	32,4	31,812	1362	1,02
56	POB 0911	59,0	36,043	1140	1,64
57	SMH 8816 (S)	79,5	45,779	1845	1,74
58	DD 548/09 (Tox)	55,5	26,525	4522	2,09
59	NAD 11100	34,7	58,654	1814	0,59
60	NAD 10079 (S)	59,9	34,474	6450	1,74
61	SMH 8694 (S)	67,8	39,956	6190	1,70
Średnie Means		30,9	20,515	932	1,51

¹ — średnie wartości z doświadczeń w Radzikowie i Cerekwicy

¹ — mean values from experiments in Radzików and Cerekwica

ERG — ergosterol, DON — deoksyniwalenol, ZEA — zearalenon, ERG/DON — współczynnik ilości ergosterolu na 1 mg deoksyniwalenolu w ziarnie

VR, R — wzorce odporne, S — wzorce podatne, Tox — wzorce o wysokiej akumulacji toksyn, wz — wzorce o wysokim plonie

ERG — ergosterol, DON — deoxynivalenol, ZEA — zearalenone, ERG/ DON — ergosterol/deoxynivalenol ratio

VR, R — resistant checks, S — susceptible checks, Tox — high toxin accumulation checks, wz — high yielding checks

Zawartość ergosterolu w ziarnie wybranych genotypów wyniosła średnio 30,9 mg·kg⁻¹ (tab. 2). Zakres zmienności cechy mieścił się w granicach 8,1–79,5 mg·kg⁻¹. W próbach ziarna z Cerekwicy zawartość ERG była 3-krotnie większa (47,3 mg·kg⁻¹) niż w próbach z Radzikowa (14,6 mg·kg⁻¹). W Cerekwicy zakres zmienności cechy mieścił się w granicach 12,8 mg·kg⁻¹ (A 40-19-1-2) — 138,7 mg·kg⁻¹ (SMH 8816), natomiast w Radzikowie w granicach 4,5 mg·kg⁻¹ (A 40-19-1-2) — 38,4 mg·kg⁻¹ (KWS Ozon).

Średnia zawartość DON (wraz z 15AcDON) w ziarnie pszenicy ozimej wynosiła 20,515 mg·kg⁻¹ (tab. 2). Zakres zawartości DON wynosił od 4,055 mg·kg⁻¹ (STH 9059) do 58,654 mg·kg⁻¹ (NAD 11100). W próbach ziarna z Cerekwicy zawartość DON była 20-krotnie większa (38,724 mg·kg⁻¹) niż w próbach z Radzikowa (2,306 mg·kg⁻¹). W ziarnie pszenicy nie stwierdzono obecności pochodnej DON — 3AcDON oraz śladowe ilości 15AcDON i niwaleolu. W Cerekwicy zakres zmienności cechy mieścił się w granicach 7,997 mg·kg⁻¹ (A 40-19-1-2) — 115,577 mg·kg⁻¹ (NAD 11100), natomiast w Radzikowie w granicach 0,113 mg·kg⁻¹ (40-19-1-2) — 4,629 mg·kg⁻¹ (POB 0713).

Średnia zawartość zearalenonu w ziarnie pszenicy ozimej wynosiła $932 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (tab. 2). W próbach z Radzikowa stwierdzono śladowe zawartości ZEA (poniżej limitu kwantyfikacji), dlatego też nie zostały one uwzględnione w tabeli. Zakres zawartości ZEA mieścił się w granicach od $48 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (STH 1144) do $6450 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (NAD 10079 S).

Indeks fuzariozy kłosów (IFK) oraz stopień uszkodzenia ziarniaków (FDK) korelowały istotnie z zawartością ERG oraz ilością toksyn fuzaryjnych (DON, ZEA) w ziarnie (tab. 3). Najwyższe wartości przyjmowały współczynniki korelacji FDK z zawartością ERG oraz zawartości ERG z akumulacją DON (rys. 3, 4) Niższy był współczynnik korelacji ERG z akumulacją ZEA w ziarnie.

Tabela 3

Współczynniki korelacji odporności typu I i II, indeksu fuzariozy kłosów, uszkodzenia ziarniaków oraz akumulacji ergosterolu i toksyn fuzaryjnych w ziarnie 61 genotypów pszenicy inokulowanych *F. culmorum* w doświadczeniach w Cerekwicy i Radzikowie
Coefficients of correlation between resistances of type I and II, *Fusarium* head blight index, *Fusarium* damaged kernels and accumulation of ergosterol and *Fusarium* toxins in grain of 61 lines of wheat inoculated with *F. culmorum* in experiments in Cerekwica and Radzików

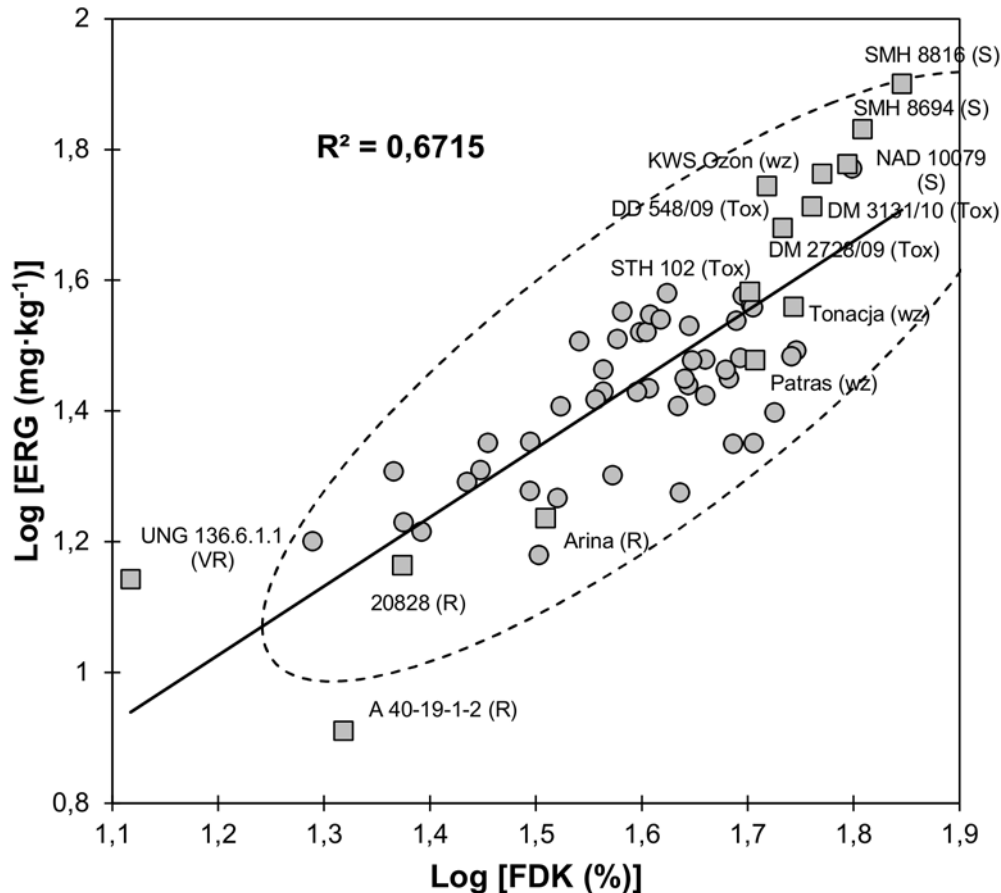
Zmienne Variables	Odp. typu I (#PI) ¹ Type I res. (#IP) ¹	Odp. typu II (#PK) ¹ Type II res. (#IS) ¹	Średn. typ I+II ¹ Type I+II combined ¹	IFK(%) FHBi (%)	FDK (%)	ERG ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	DON ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	ZEA ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
Odp. typu II (#KP) Type II res. (#IS)	0,012							
Średn. typ I+II Type I+II combined	0,763**	0,643**						
IFK (%) FHBi (%)	0,403**	0,537**	0,655**					
FDK (%)	0,256	0,532**	0,526**	0,773**				
ERG ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	0,295	0,511**	0,542**	0,771**	0,819**			
DON ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	0,218	0,428**	0,440**	0,657**	0,765**	0,848**		
ZEA ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	0,237	0,334*	0,364*	0,565**	0,541**	0,699**	0,585**	
DON+ ZEA std ²	0,279	0,344*	0,410**	0,667**	0,626**	0,784**	0,816**	0,792**

— współczynniki dla 42 genotypów; 2 — średnia ze standaryzowanych wartości DON i ZEA. Zmienne transformowane logarytmicznie. Współczynniki istotne na poziomie: * - $P<0,05$, ** - $P<0,01$

1 — coefficients for 42 lines; 2 — average from standardized concentrations of DON and ZEA. Variables log transformed. Coefficients significant at: * - $P<0,05$, ** - $P<0,01$

Odporność typu I (na infekcję) dla 42 genotypów korelowała jedynie z indeksem fuzariozy kłosów (tab. 3). Natomiast odporność typu II (na rozprzestrzenianie się *Fusarium* w kłosie) korelowała zarówno z IFK i FDK jak i zawartością ergosterolu oraz toksyn w ziarnie. Odporność typu II wiąże się z odpornością na DON, który jest czynnikiem niezbędnym dla rozprzestrzeniania się patogena w tkankach. Trichoteceny produkowane przez *Fusarium* powoduje nekrozę tkanki pszenicy, która następnie jest kolonizowana przez grzybnie *Fusarium* (Gunnaiah i in., 2012). Główny gen odporności na fuzariozę kłosów *Fhb1* który wyjaśnia do 60% zmienności odporności typu II jest odpowiedzialny

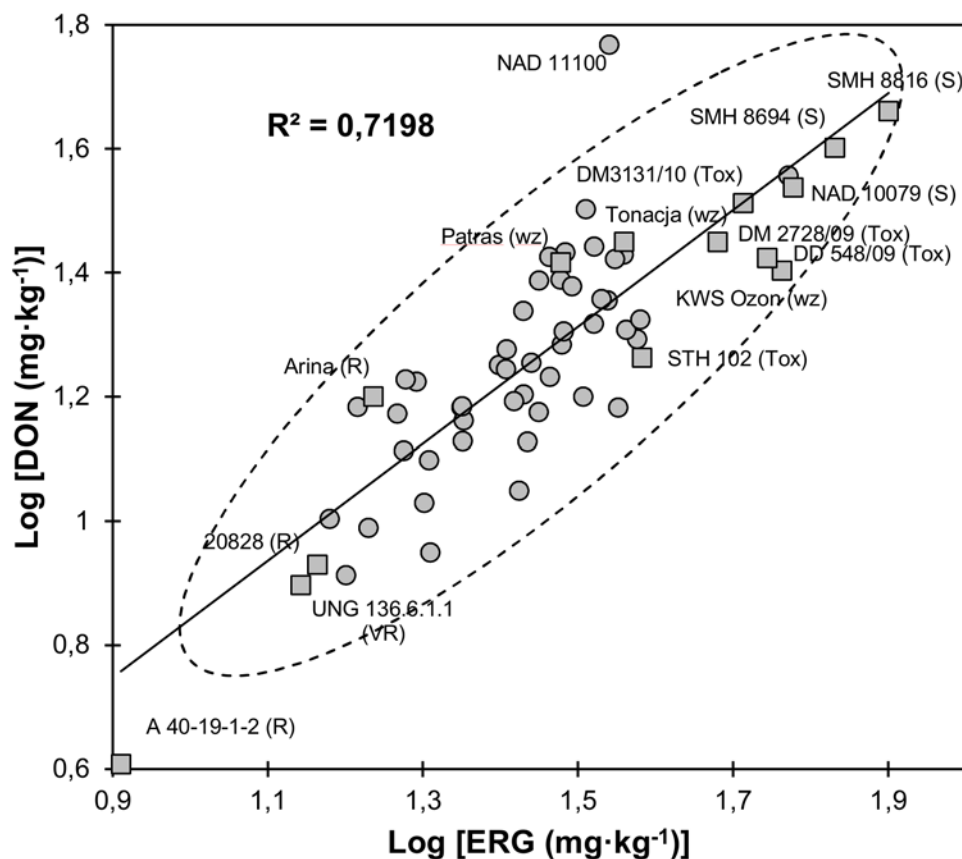
za obniżenie toksyczności DON (Lemmens i in. 2008, Buerstmayr i in l. 2009). Odbywa się to poprzez glikozylację DON i tworzenie słabo fitotoksycznego 3-glukozydo-deoksyniwalenolu (Berthiller i in., 2005; Boutigny i in., 2008). Zdolność do produkcji deoksyniwalenolu określa agresywność danego izolatu *Fusarium* (*F. culmorum*, *F. graminearum* i innych gatunków produkujących DON) (Mesterhazy, 2002).



Rys. 3. Zależność pomiędzy uszkodzeniem ziarniaków (FDK) a zawartością ERG w ziarnie 61 genotypów pszenicy ozimej. Oznaczono genotypy wzorcowe pszenicy (kwadraty)
Fig. 3. Relationship between *Fusarium* damaged kernels (FDK) and concentration of ergosterol (ERG) in grain of 61 winter wheat lines. Check lines/cultivars are marked with squares

Korelacja typów odporności I i II z akumulacją DON w ziarnie była obserwowana przez Zhu i in. (1999) u jęczmienia. Współczynniki dla typu I były nieistotne lub miały wartości od 0,37 do 0,67. Dla typu II było to 0,30 i 0,49. Nieistotne współczynniki dla typu I stwierdzono stosując metodykę podobną do opisanej w niniejszej pracy, czyli opryskiwanie kłosów zawieszoną rodnikową. Istotne były współczynniki w przypadku zastosowania

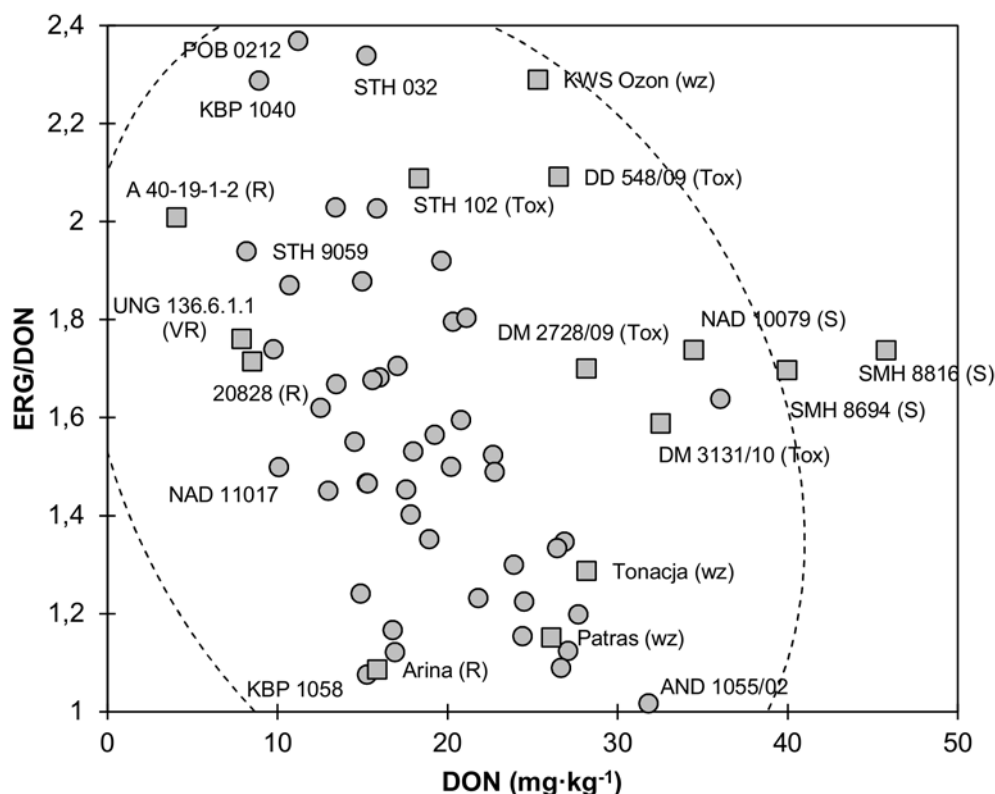
metody rozsypywania wysuszonego inokulatu na powierzchni gleby. Należy mieć jednakże na uwadze, że u jęczmienia typ odporności II ma mniejsze znaczenie, ponieważ zwykle patogen nie rozprzestrzenia się do sąsiadujących kłosek (Bai i Shaner, 2004).



Rys. 4. Zależność pomiędzy zawartością ergosterolu (ERG) a akumulacją deoksyniwalenolu (DON) w ziarnie 61 genotypów pszenicy ozimej. Oznaczono genotypy wzorcowe pszenicy (kwadraty)
Fig. 4. Relationship between concentrations of ergosterol (ERG) and deoxynivalenol (DON) in grain of 61 winter wheat lines. Check lines/cultivars are marked with squares

Wyliczono współczynnik ERG/DON wskazujący ilość ergosterolu (miernika zawartości grzybni) potrzebną do wytworzenia 1 mg deoksyniwalenolu (tab. 2). Średnia wartość współczynnika wynosiła 1,51 mg ERG/1 mg DON. Współczynnik zmieniał się w zakresie od 2,37 (POB 0212) do 0,59 (NAD 11100). Genotypy o niskiej zawartości DON w ziarnie (<15 mg/kg) miały zróżnicowane wartości ERG/DON np. >2,00: POB 0212, KBP 1040, STH 9007, A 40-19-1-2 (R) lub ≤1,50: NAD 11017, KBP 04.164, STH 1144 (rys. 5). Również wśród genotypów akumulujących większe ilości DON znaleziono obiekty o wartości ERG/DON >2,00: KWS Ozon (wz), DD 548/09 (Tox). Wysoka wartość

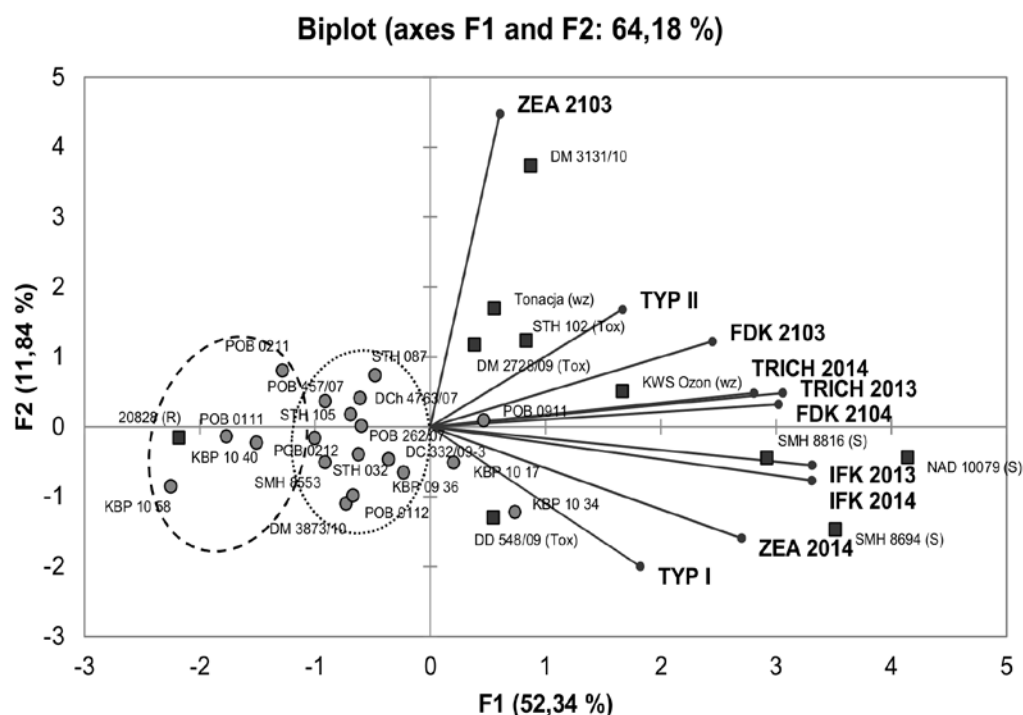
współczynnika wskazuje na wyższą odporność typu V, czyli na akumulację trichotecenów (Perkowski i in., 1995). Taką odporność wykazały wymienione powyżej genotypy o wartości ERG/DON powyżej 2 (rys. 5). Genotypy o wysokiej zawartości DON w ziarnie miały wartość współczynnika zbliżoną do średniej. Podobną wartość miały dwie linie odporne, w tym linia UNG 136.6.1.1 (VR) zawierająca gen *Fhb1* (Czembor P. — wyniki niepublikowane).



Rys. 5. Wykres rozrzutu zawartości deoksyniwaleolu (DON) w ziarnie 61 genotypów pszenicy ozimej oraz współczynnika ERG/DON. Oznaczono genotypy wzorcowe pszenicy (kwadraty)

Fig. 5. Scatterplot of deoxynivalenol (DON) content in grain of 61 winter wheat lines and DON/ERG ratio. Check lines/cultivars are marked with squares

W pracy Mesterhazy'ego (2002) stwierdzono, że współczynniki IFK/DON oraz FDK/DON były wysokie u genotypów odpornych. Autor wyjaśnia to zjawisko faktem, że mechanizmy odporności powodują zwiększoną produkcję DON-u przez *Fusarium* w celu zasiedlenia tkanek gospodarza. U genotypów podatnych reakcja na DON jest silniejsza, więc jego produkcja jest relatywnie mniejsza (w odniesieniu na jednostkę infekcji). W odniesieniu do współczynnika ERG/DON powinno to przekładać się na niską wartość np. KBP 1058, NAD 11017, Arina.



Rys. 6. Układ współrzędnych dwóch pierwszych składowych głównych dla 29 genotypów pszenicy ozimej. Dwie pierwsze składowe wyjaśniają 64,2% zmienności odporności na fuzariozę kłosów mierzonej indeksem fuzariozy kłosów (IFK), uszkodzeniem ziarniaków (FDK) oraz zawartością zearalenonu (ZEA) i trichotecenów B (TRICH) w ziarnie w Radzikowie i Cerekwicy latach 2013 i 2014 oraz odpornością typu I (TYP I) i typu II (TYP II). Linia przerywana — genotypy o najwyższej odporności, linia kropkowana — genotypy o średniej odporności

Fig. 6. Biplot of the principal component analysis for 29 winter wheat lines. Two first components explained 64.2% of variability of Fusarium head blight resistance characterized with FHB index (IFK), Fusarium damaged kernels (FDK) and concentration of zearalenone (ZEA) and trichothecenes B (TRICH) in grain in 2013 and 2014 in Radzików and Cerekwica as well as resistance of type I (TYP I) and type II (TYP II). Dashed line — the most resistant lines, dotted line — medium resistant lines

Wartość współczynnika była niska dla odpornej na infekcję kłosa odmiany Arina (1,09). Odmiana ta miała bardzo niskie porażenie kłosa, niską zawartość ergosterolu, jednakże średnie wartości FDK oraz zawartości DON w ziarnie. Badania genetyczne wskazują, że u odmiany Arina występuje przede wszystkim odporność typu I zlokalizowana w innych rejonach genomu pszenicy niż pozostałe *loci* odporności (Semagn i in., 2007; Buerstmayr i in., 2009).

Miedan i in. (2001) w swojej publikacji badali odporność pszenicy, żyta oraz pszenżyta na fuzariozę kłosów. Wyliczone współczynniki DON/ERG mieściły się w granicach od 0,42 do 0,71, średnio 0,55 oraz dla pszenicy 0,52. Wartości te były zbliżone do obserwowanych w niniejszej pracy (w przeliczeniu na DON/ERG średnio 0,66).

Współczynniki DON/ERG dla poszczególnych genotypów różniły się istotnie. Podobnie było w przypadku genotypów badanych w tej pracy (tab. 2). Wskazuje to istotny wpływ genotypu gospodarza na akumulację DON w ziarnie.

W badanej populacji pszenicy odporność 29 genotypów oceniano również w doświadczeniach infekcyjnych w roku 2013 w Radzikowie i Cerekwicy (Góral i in., 2014). Indeksy fuzariozy kłosów, stopień uszkodzenia ziarniaków oraz akumulacja trichotecenów B z obu lat korelowały istotnie (odpowiednio $r = 0,878$, $r = 0,448$, $r = 0,525$). Brak było korelacji z akumulacją zearalenonu w obu latach doświadczeń.

Najwyższą odporność wszystkich typów w czterech środowiskach (lata, lokalizacje) wykazała linia odporna 20828 (R) oraz genotypy KBP 1040, KBP 1058, POB 0111 i POB 0211. Pozostałe średnio odporne genotypy oznaczono na rysunku 6.

WNIOSKI

1. Genotypy pszenicy były istotnie zróżnicowane pod względem odporności na fuzariozę kłosów w warunkach polowych (typ odporności I+II).
2. Stwierdzono istotny wpływ wysokości roślin na wartość indeksu fuzariozy kłosów.
3. Badane genotypy wykazały zróżnicowaną odporność na uszkodzenie ziarniaków przez *Fusarium culmorum* oraz zróżnicowaną zawartość ergosterolu w ziarnie (typ odporności III).
4. Nasilenie fuzariozy kłosów istotnie korelowało z uszkodzeniem ziarniaków pszenicy.
5. Badane genotypy wykazały zróżnicowaną odporność na akumulację toksyn fuzaryjnych (typ odporności IV).
6. Stopień porażenia kłosów, odporność typu II oraz uszkodzenie ziarniaków korelowały istotnie z zawartością ergosterolu, deoksynivalenolu i zearalenonu w ziarnie.
7. Genotypy 20828 (R), KBP 1040, KBP 1058, POB 0111 i POB 0211 wykazały wysoką odporność na fuzariozę kłosów wszystkich badanych typów.

LITERATURA

- Argyris J., Sanford D., Van, TeKrony D. 2003. *Fusarium graminearum* infection during wheat seed development and its effect on seed quality. *Crop Sci.* 43: 1782 — 1788.
- Bai G., Shaner G. 2004. Management and resistance in wheat and barley to *Fusarium* head blight. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 135 — 161.
- Berthiller F., Dall'Asta C., Schuhmacher R., Lemmens M., Adam G., Krska R. 2005. Masked mycotoxins: determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 53: 3421 — 3425.
- Bottalico A. 1998. *Fusarium* diseases of cereals: Species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. *J. Plant Pathol.* 80: 85 — 103.
- Bottalico A., Perrone G. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 611 — 624.
- Boutigny A.-L.L., Richard-Forget F., Barreau C. 2008. Natural mechanisms for cereal resistance to the accumulation of *Fusarium* trichothecenes. *Eur. J. Plant Pathol.* 121: 411 — 423.
- Buerstmayr H., Ban T., Anderson J. A. 2009. QTL mapping and marker-assisted selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat: A review. *Plant Breed.* 128: 1 — 26.

- Buerstmayr H., Lemmens M., Berlakovich S., Ruckenbauer P. 1999. Combining ability of resistance to head blight caused by *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) in the F₁ of a seven parent diallel of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica* 110: 199 — 206.
- Buerstmayr H., Lemmens M., Schmolke M., Zimmermann G., Hartl L., Mascher F., Trottet M., Gosman N.E., Nicholson P. 2008. Multi-environment evaluation of level and stability of FHB resistance among parental lines and selected offspring derived from several European winter wheat mapping populations. *Plant Breed.* 127: 325 — 332.
- Draeger R., Gosman N., Steed A., Chandler E., Thomsett M., Srinivasachary, Schondelmaier J., Buerstmayr H., Lemmens M., Schmolke M., Mesterhazy A., Nicholson P. 2007. Identification of QTLs for resistance to Fusarium head blight, DON accumulation and associated traits in the winter wheat variety Arina. *Theor. Appl. Genet.* 115: 617 — 625.
- Foroud N. A., Eudes, F. 2009. Trichothecenes in cereal grains. *Int. J. Mol. Sci.* 10: 147 — 173.
- Góral T., Walentyn-Góral D., Wiśniewska H. 2015. Odporność pszenicy i pszenżyta na fuzariozę kłosów — odporność typu I oraz typu II. *Biul. IHAR (w druku)*.
- Góral T., Wiśniewska H., Ochodzki P., Walentyn-Góral, D., Bełtr J., Kwiatek M., Bogacki J., Drzazga T., Ługowska B., Matysik P., Witkowski E., Rubrycki K., Woźna-Pawlak U. 2014. Screening of winter wheat breeding lines for resistance to Fusarium head blight and accumulation of *Fusarium* toxins in grain. *Book of Abstracts. Cereals for Food, Feed and Fuel — Challenge for Global Improvement; Joint EUCARPIA Cereal Section & I•T•M•I Conference, 29.06 – 04.07, 2014; Wernigerode, Niemcy: 254 p.*
- Gunnaiah R., Kushalappa A.C., Duggavathi R., Fox S., Somers D. J. 2012. Integrated metabolo-proteomic approach to decipher the mechanisms by which wheat QTL (*Fhb1*) contributes to resistance against *Fusarium graminearum*. *PLoS One.* 7: e40695.
- Kollers S., Rodemann B., Ling J., Korzun V., Ebmeyer E., Argillier O., Hinze M., Plieske J., Kulosa D., Ganai M. W., Röder M. S. 2013. Whole genome association mapping of Fusarium head blight resistance in European winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLoS One.* 8: e57500.
- Lemmens M., Koutnik A., Steiner B., Buerstmayr H., Berthiller F., Schuhmacher R., Maier F., Schäfer W. 2008. Investigations on the ability of *Fhb1* to protect wheat against nivalenol and deoxynivalenol. *Cereal Res. Commun.* 36: 429 — 435.
- Mesterházy Á. 2002. Role of deoxynivalenol in aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* and in resistance to Fusarium head blight. *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 675 — 684.
- Mesterházy Á. 1995. Types and components of resistance to Fusarium head blight of wheat. *Plant Breed.* 114: 377 — 386.
- Miedaner T., Reinbrecht C., Lauber U., Schollenberger M., Geiger H. H. 2001. Effects of genotype and genotype-environment interaction on deoxynivalenol accumulation and resistance to Fusarium head blight in rye, triticale, and wheat. *Plant Breed.* 120:97 — 105.
- Miedaner T., Voss, H.-H. 2008. Effect of dwarfing genes on Fusarium head blight resistance in two sets of near-isogenic lines of wheat and check cultivars. *Crop Sci.* 48: 2115.
- Miller J. D. 2008. Mycotoxins in small grains and maize: old problems, new challenges. *Food Addit Contam.* 25: 219 — 30.
- Ochodzki P., Góral T. 2006. Production of mycotoxins by selected *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates cultured on rice and wheat. *Conference Papers of 28. Mykotoxin-Workshop, Bydgoszcz, Poland, 29-31 May 2006: p. 73.*
- Paillard S., Schnurbusch T., Tiwari R., Messmer M., Winzeler M., Keller B., Schachermayr G. 2004. QTL analysis of resistance to Fusarium head blight in Swiss winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 109: 323 — 332.
- Perkowski J., Buśko M., Stuper K., Kostecki M., Matysiak A., Szwajkowska-Michałek L. 2008. Concentration of ergosterol in small-grained naturally contaminated and inoculated cereals. *Biologia* 63: 542 — 547.
- Perkowski J., Miedaner T., Geiger H. H., Muller H. M., Chelkowski J. 1995. Occurrence of deoxynivalenol (DON), 3-acetyl-DON, zearalenone, and ergosterol in winter rye inoculated with *Fusarium culmorum*. *Cereal Chem.* 72: 205 — 209.

- Perkowski J., Wiwart M., Busko M., Laskowska M., Berthiller F., Kandler W., Krska R. 2007. Fusarium toxins and total fungal biomass indicators in naturally contaminated wheat samples from north-eastern Poland in 2003. *Food Addit Contam.* 24: 1292 — 1298.
- Semagn K., Skinnes H., Bjørnstad Å., Marøy A.G., Tarkegne Y. 2007. Quantitative trait loci controlling Fusarium head blight resistance and low deoxynivalenol content in hexaploid wheat population from 'Arina' and NK93604. *Crop Sci.* 47: 294.
- Snijders C. H. A. 1990. Fusarium head blight and mycotoxin contamination of wheat, a review. *Netherlands J Plant Pathol.* 96: 187 — 198.
- Srinivasachary, Gosman N., Steed A., Simmonds J., Leverington-Waite M., Wang Y., Snape J., Nicholson P. 2008. Susceptibility to Fusarium head blight is associated with the Rht-D1b semi-dwarfing allele in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 116: 1145 — 1153.
- Wiśniewska H., Góral T., Ochodzki P., Walentyn-Góral D., Kwiatek M., Majka M., Grzeszczak I., Bełetr J., Banaszak Z., Pojmał M., Kurlito D., Konieczny M., Budzianowski G., Cicha A., Paizert K., Woś H. 2014. Odporność rodów hodowlanych pszenżyta ozimego na fuzariozę kłosów. *Biul. IHAR* 271: 29 — 43.
- Wiśniewska H., Kowalczyk, K. 2005. Resistance of cultivars and breeding lines of spring wheat to *Fusarium culmorum* and powdery mildew. *J. Appl. Genet.* 46: 35 — 40.
- Yan W., Li, H. B., Cai S.B., Ma H.X., Rebetzke, G.J., Liu C. J. 2011. Effects of plant height on type I and type II resistance to Fusarium head blight in wheat. *Plant Pathol.* 60: 506 — 512.
- Zhu H., Gilchrist L., Hayes P., Kleinhofs A., Kudrna D., Liu Z., Prom L., Steffenson B., Toojinda T., Vivar H. 1999. Does function follow form? Principal QTLs for Fusarium head blight (FHB) resistance are coincident with QTLs for inflorescence traits and plant height in a doubled-haploid population of barley. *Theor. Appl. Genet.* 99: 1221 — 1232.

HALINA WIŚNIEWSKA ¹
 TOMASZ GÓRAL ^{#2}
 PIOTR OCHODZKI ²
 DOROTA WALENTYN-GÓRAL ²
 MICHAŁ KWIATEK ¹
 MACIEJ MAJKA ¹
 JOLANTA BELTER ¹
 ZOFIA BANASZAK ³
 MIROSLAW POJMAJ ³
 DANUTA KURLETO ³
 MARCIN KONIECZNY ³
 GRZEGORZ BUDZIANOWSKI ⁴
 ALICJA CICHA ⁴
 KAZIMIERZ PAIZERT ⁴
 HENRYK WOŚ ⁴

¹ Instytut Genetyki Roślin PAN, ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań

² Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — PIB, Radzików, 05-870 Błonie

³ Danko Hodowla Roślin Sp. z o.o., Choryń 27,64-000 Kościan

⁴ Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR, ul. Główna 20, 99-307 Strzelce

Odporność rodów hodowlanych pszenżyta ozimego na infekcję kłosa grzybem *Fusarium culmorum* *

Resistance of winter triticale breeding lines to infection of spike with *Fusarium culmorum*

Badano 35 rodów pszenżyta ozimego o zróżnicowanym podłożu genetycznym oraz trzy odmiany pod względem odporności na fuzariozę kłosów powodowaną przez *Fusarium culmorum* oraz akumulacji toksyn fuzaryjnych w ziarnie. Genotypy wysiano w dwóch lokalizacjach: Cerekwica k. Poznania i Radzików k. Warszawy. W okresie pełni kwitnienia kłosa badanych genotypów inokulowano zawiesiną zarodników trzech szczepów *F. culmorum*. Określano indeks fuzariozy kłosów,

[#] Autor do korespondencji

* Badania finansowano ze środków projektu MRiRW: Badania Podstawowe na rzecz Postępu Biologicznego w Produkcji Roślinnej; decyzja HORhn-801-12/14; lp.14

Praca przedstawiona na konferencji IHAR — PIB, Zakopane, 3 lutego 2015 roku

Redaktor prowadzący: Danuta Boros

procent ziarniaków uszkodzonych przez *Fusarium* oraz poziom toksyn fuzaryjnych w ziarniakach. Indeks fuzariozy kłosów w Cerekwicy (19,2%) był wyższy niż w Radzikowie (11,0%). Współczynnik korelacji porażenia kłosów w obu lokalizacjach wynosił $r = 0,429$. Porażenie ziarniaków było zróżnicowane w obu lokalizacjach. W Cerekwicy porażenie ziarna było wyższe (średnio 38,7%) niż w Radzikowie (średnio 23,3%). Zawartość trichotecenów z grupy B w ziarnie była bardzo wysoka i średnio dla obu lokalizacji wynosiła 23,541mg/kg. Podobnie stwierdzono bardzo duże ilości zearalenonu — średnio 1179 µg/kg. Zawartość ergosterolu (średnio 41,0 mg/kg) istotnie korelowała z porażeniem ziarna i zawartością toksyn fuzaryjnych. Badane genotypy pszenżyta ozimego zostały pogrupowane na podstawie odporności na porażenie kłosa i porażenie ziarniaków oraz zawartości ergosterolu i toksyn fuzaryjnych w ziarnie. W wyniku statystycznej analizy składowych głównych wytypowano 5 najlepszych genotypów pszenżyta łączących wysoki poziom odporności różnych typów.

Słowa kluczowe: deoksyniwalenol, ergosterol, *Fusarium culmorum*, *xTriticosecale*, zearalenon

Thirty five lines of winter triticale with different genetic background and three cultivars were studied for resistance to the *Fusarium* head blight caused by *Fusarium culmorum* and for the accumulation of toxins in the grain. Genotypes were sown in two locations: Cerekwica near Poznań and Radzików near Warsaw. At the time of full anthesis triticale heads were inoculated with the spore suspension of three strains of *F. culmorum*. *Fusarium* head blight index (FHBi), the percentage of kernels with visible symptoms of *Fusarium* damage and the levels of *Fusarium* toxins were evaluated. FHBi in Cerekwica (19.2 %) was higher than that in Radzików (11.0%). The correlation coefficient of head infection in both locations was $r = 0.429$. *Fusarium* kernel damage varied in both locations. In Cerekwica it was higher (38.7%) than in Radzików (23.3%). The content of the trichothecenes of group B in the grain was very high and average for both locations was 23.541mg/kg. Similarly, a very large amount of zearalenone was found and on average amounted to 1179 µg/kg. The contents of ergosterol (on average 41.0 mg/kg) significantly correlated with kernel damage and *Fusarium* toxins concentrations. The tested genotypes of winter triticale were grouped on the basis of resistance to head and kernel infection and ergosterol and toxins concentrations in the grain. As a result of the principal component analysis, five triticale genotypes combining high levels of resistance of different types were identified.

Key words: deoxynivalenol, ergosterol, *Fusarium culmorum*, *xTriticosecale*, zearalenone

WSTĘP

Fuzarioza kłosów jest chorobą zbóż powodowaną przez grzyby patogeniczne z rodzaju *Fusarium*. Patogeny mogą rozwijać się na kłosie w korzystnych warunkach w każdym okresie rozwoju, jednak najbardziej podatne na atak *Fusarium* są zboża w fazie kwitnienia (Parry i in., 1995; Siou i in., 2014). Grzyby rozwijają się w zainfekowanym kwiatku i następnie przerastają do kolejnych kwiatków w kłosie i przez osadkę kłosową rozprzestrzeniają się wzdłuż kłosa. Grzyby kolonizują plewy i ziarniaki w kłosie, uszkadzając je z różnym nasileniem. Powoduje to zarówno obniżkę plonu ziarna oraz jakości ziarna poprzez skażenie ziarna toksynami fuzaryjnymi, takimi jak deoksyniwalenol (DON), niwalenol (NIV) oraz zearalenon (ZEA), które są związkami niezwykle stabilnymi, nie ulegają metabolizowaniu i są szkodliwe dla człowieka oraz zwierząt (Kalih i in., 2015). Skażenie ziarna mikotoksynami stwierdza się nawet wtedy, kiedy nie obserwuje się obniżki plonu (Cowger i Arrellano, 2010). W porażonych ziarniakach dochodzi do zniszczenia ziaren skrobi, a także białek zapasowych (Kang i Buchenauer, 2000), co wpływa, na jakość wypiekową mąki.

Patogeneza fuzariozy kłosów jest złożona i wyróżnia się kilka typów odporności: typ 1 — na infekcję pierwotną, typ 2 — na rozprzestrzenianie się patogena wzdłuż osadki kłosowej, typ 3 — odporność na uszkodzenie ziarniaków, typ 4 — odporność na kumulację i degradację toksyn fuzaryjnych w ziarniakach, typ 5 — tolerancja, czyli odporność na obniżkę plonu (Mesterhazy, 1995; Foroud i Eudes, 2009).

Odporność na fuzariozę kłosa ma charakter złożony i jest cechą wielogenową. Występuje ilościowy charakter dziedziczenia tej cechy. Kilka lub kilkanaście QTLs (*loci* cech ilościowych) zapewnia roślinom zadawalającą odporność polową (Faris i in., 1999; Keller i in., 2000; Feuillet i Keller, 2004; Kalih i in., 2015). Każdy z genów determinuje stosunkowo mały tzw. efekt ilościowy, a efekty poszczególnych genów sumują się. W związku z tym ekspresja cech warunkowana takimi genami podlega dużemu wpływowi środowiska. Nasilenie fuzariozy zależy od warunków pogodowych panujących w okresie kwitnienia pszenicy, kiedy następuje infekcja. Czynniki sprzyjającymi są wysoka wilgotność powietrza, wiatr i opady deszczu.

Według wielu autorów odporność na fuzariozę kłosa charakteryzuje się dużą odziedziczalnością, wystarczającą do prowadzenia skutecznej selekcji (Buerstmayer i in., 2003, Paillard i in., 2003). Największe szkody fuzarioza powoduje u pszenicy twardej (*Triticum durum*) — jest ona najbardziej podatna na tę chorobę. Wielu badaczy w ubiegłych latach stwierdzało, że mniejszą podatnością na porażenie kłosa (wiech) charakteryzują się kolejno pszenżyto, żyto, jęczmień i owies (Langevin i in., 2004; Góral, 2007; Miedaner i in., 2001, 2004). W związku z tym pszenżyto było uważane za zboże w mniejszym stopniu zagrożone skażeniem mikotoksynami niż pszenica. Jednakże liczne nowe odmiany pszenżyta okazują się w ostatnich latach podatne na fuzariozę kłosów na poziomie zbliżonym do pszenicy (Góral i Ochodzki, 2006). Ostatnie lata badań pokazują, że pszenżyto podobnie jak pszenica jest również w znacznym stopniu zagrożone tą chorobą i obserwuje się znaczną kumulację toksyn fuzaryjnych w ziarnie podobną jak u pszenicy, a nawet wyższą mimo stwierdzanego mniejszego nasilenia objawów fuzariozy na kłosach i ziarniakach (Comeau i in., 2008). Do tej pory zjawisko to jest niewyjaśnione. Badacze kanadyjscy sugerują, że być może znaczna kumulacja toksyn fuzaryjnych w ziarnie pszenżyta może być spowodowana większą podatnością okrywy owocowo- nasiennej na uszkodzenie przez grzyby z rodzaju *Fusarium* (Comeau i in., 2008; Veitch i in., 2008; Randhawa i in., 2013). Przyczyny dużej podatności pszenżyta na fuzariozę kłosów upatruje się również w tym, że niektóre pierwotne pszenżyta uzyskano z krzyżowań żyta z pszenicą twardą *Triticum durum*, która wykazuje dużą podatność na fuzariozę kłosów.

Celem badań było wstępne zidentyfikowanie genotypów pszenżyta ozimego o zwiększonej odporności na fuzariozę kłosów powodowaną przez grzyby rodzaju *Fusarium* spp. i niskiej akumulacji mikotoksyn fuzaryjnych w ziarnie, które można wykorzystać do badań nad typami odporności na fuzariozę kłosów u pszenżyta oraz jako źródła odporności w programach hodowlanych pszenżyta.

MATERIAŁ I METODY

Materiał roślinny

Badania obejmowały rody pszenżyta ozimego o zróżnicowanym podłożu genetycznym, pochodzące z programów hodowlanych pszenżyta ozimego realizowanych w dwóch firmach hodowlanych: Hodowla Roślin Strzelce oraz Danko Hodowla Roślin. Przebadano odporność na fuzariozę kłosów i kumulację toksyn fuzaryjnych 35 rodów pszenżyta ozimego i 3 odmiany kontrolne: Fredro, Borwo i Tomko z wykorzystaniem markerów fenotypowych i metabolicznych.

Doświadczenia polowe

Doświadczenia polowe infekcyjne i kontrolne z genotypami pszenżyta ozimego zostały założone jesienią 2013 roku w układzie losowych bloków w dwóch lokalizacjach położonych w różnych rejonach Polski: w Instytucie Genetyki Roślin PAN w Poznaniu (pole w Cerekwicy) oraz w IHAR PIB w Radzikowie, co pozwoliło na większe zróżnicowanie warunków glebowych i klimatycznych (rozkład temperatury i opadów) wpływających w istotny sposób na fuzariozę kłosów. Pozwoliło to na wytypowanie form o podwyższonej odporności na fuzariozę kłosów. Rody pszenżyta ozimego wysiano na poletkach o powierzchni 1 m² w 3 powtórzeniach. Gęstość siewu wynosiła około 300 ziarniaków na m².

Przygotowanie inokulum

Do wytworzenia inokulum wybrano trzy izolaty *Fusarium culmorum* tworzące deoksyniwalenol (KF846 — chemotyp DON), niwalenol (KF350 — chemotyp NIV) i zearalenon (ZFR 16 — chemotyp DON). Izolaty należące do chemotypu DON pochodziły z Radzikowa i zostały wyizolowane z kłosów pszenicy (Wiśniewska i Kowalczyk, 2005; Ochodźki i Góral, 2006). Izolat o chemotypie NIV pochodził z Holandii (oznaczony, jako IPO348) i został wyizolowany z kłosa pszenicy (Snijders i Perkowski, 1990). Izolaty były przechowywane długoterminowo w postaci zliofilizowanej grzybni w temperaturze -78°C. Krótkoterminowo izolaty przechowywano na ubogiej pożywce SNA w temperaturze 4°C (Nirenberg, 1976).

Zarodniki *Fusarium* wytworzono na sterylnych ziarnach pszenicy zaszczipionych krążkami pożywki PDA przerośniętej grzybnią *F. culmorum* (Wiśniewska i in., 2014). Po 5–6 tygodniach powstawały liczne sporodochia wypełnione zarodnikami. Tak wytworzone zarodniki były odpowiednim materiałem do wykorzystania do inokulacji. Zawiesiny uzyskane ze wszystkich izolatów miały stężenie około 100 000 zarodników w 1 mililitrze. Do inokulacji stosowano mieszaninę zawiesin trzech izolatów w równych proporcjach (Wiśniewska i in., 2014).

Inokulacja oraz ocena porażenia kłosów i ziarniaków

W obu lokalizacjach inokulację wykonano metodą opryskiwania zawiesiną zarodników z dodatkiem preparatu powierzchniowo czynnego Tween 20 (Sigma-Aldrich). Metoda ta wykazuje podobieństwo do naturalnych warunków infekcji kłosa przez *Fusarium* spp. i umożliwia określenie łącznie odporności na infekcję (Typ I) i odporności na rozprzestrzenianie się patogena wzdłuż osadki kłosowej (Typ II) (Buerstmayer i in., 2003). Stosowano około 100 ml zawiesiny na 1 m². Każdy genotyp był inokulowany oddzielnie

w pełni kwitnienia. Na polu doświadczalnym IGR PAN w Cerekwicy w celu uzyskania wysokiej wilgotności powietrza sprzyjającej infekcji kłosów, zastosowano mikrozaszaczę przez kolejne trzy dni po inokulacji. W drugiej lokalizacji w Radzikowie doświadczenie prowadzono bez mikrozaszaczę, jednak pole doświadczalne umiejscowione jest w pobliżu rzeki i obszar ten charakteryzuje się dużą wilgotnością względną powietrza. Obserwacje porażenia kłosa przeprowadzono 3-krotnie: po 12, 14 i 16 dniach od inokulacji. Nasilenie fuzariozy kłosów (typ odporności I + II) zostało określone na podstawie proporcji porażonych kłosków w kłosie (tylko w kłosach z objawami choroby) oraz proporcji kłosów prażonych na poletku. Z uzyskanych danych obliczono indeks fuzariozy kłosów według wzoru:

$$IFK = (\% \text{ porażenia kłosa} \times \% \text{ kłosów porażonych na poletku})/100.$$

W czasie żniw zbierano ręcznie po 20 kłosów dla każdego z 35 genotypów i 3 form wzorcowych (Fredro, Borwo i Tomko) wysianych w trzech powtórzeniach z połowych doświadczeń inokulacyjnych w Cerekwicy i Radzikowie oraz z poletek kontrolnych nieinokulowanych. Kłosa młócone były ręcznie lub laboratoryjną młocarnią o słabym nawiewie dla zapobieżenia utracie lekkich porażonych ziarniaków. Proporcja ziarniaków uszkodzonych przez *Fusarium* (typ odporności III) była określana wizualnie poprzez podział próby ziarniaków na ziarniaki zdrowe (HLK — healthy looking kernels) i ziarniaki z objawami uszkodzenia przez *Fusarium* (FDK — *Fusarium* damaged kernels) (Argyris i in., 2003). Określana była redukcja masy ziarna z kłosa (RMZK) w odniesieniu do prób kontrolnych.

Analizy toksyn fuzaryjnych

Stężenie toksyn fuzaryjnych (DON, NIV i ZEA) oznaczono dla każdego genotypu w zmieszanych frakcjach ziarna (FDK+HLK).

Zawartość trichotecenów z grupy B (DON, pochodne acetylowe DON - 3-AcDON, 15-AcDON, NIV) w ziarnie analizowano przy wykorzystaniu techniki chromatografii gazowej z detekcją wychwyty elektronów (GC-ECD). Mikotoksyny ekstrahowano z 5 g zmielonego ziarna za pomocą 25 ml wodnego roztworu acetonitrylu (acetonitryl:woda 84:16 v/v) wytrząsając na wytrząsarce przez 2 h. Probę odwirowano (3000 obr $\times$ min⁻¹, 5 min.), a uzyskany w ten sposób ekstrakt oczyszczono na kolumnie Trich 227+ (RomerLabs). Do 4 ml oczyszczonego ekstraktu dodano 1 μ g wzorca wewnętrznego (chloraloza) i odparowano do sucha w strumieniu powietrza. Mikotoksyny przeprowadzono w pochodne (etry trimetylosilylowe) za pomocą mieszaniny silylującej Sylon BTZ (BSA+TMCS+TMSI, 3:2:3, Supelco). Upochodnione mikotoksyny rozpuszczono w izooktanie, a nadmiar czynnika silylującego rozłożono i usunięto za pomocą wody. Warstwę organiczną przeniesiono do fiolki autosamplera i poddano analizie chromatograficznej przy użyciu chromatografu SRI 8610C, wyposażonego w kapilarną kolumnę BGB-5MS, o długości 30 m i średnicy wewnętrznej 0,25 mm. Gazem nośnym był wodór. Chromatogram rozwijano w gradiencie temperatury od 170°C do 310°C, szybkość wzrostu temperatury 5°C $\times$ min⁻¹. Detekcję mikotoksyn prowadzono za pomocą detektora wychwyty elektronów (ECD). Identyfikacji poszczególnych związków dokonano przez porównanie czasów wymywania z kolumny czystych wzorców mikotoksyn: DON, 3AcDON,

15AcDON, NIV (Sigma-Aldrich). Stężenie mikotoksyn określono na podstawie krzywej kalibracji, z zastosowaniem chloralozy, jako wzorca wewnętrznego.

Zawartość zearalenonu (ZEA) oznaczano za pomocą ilościowego testu immunoenzymatycznego AgraQuant® zearalenone zgodnie z procedurą podaną przez producenta (Wiśniewska i in., 2014).

Zawartość ergosterolu określono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (Perkowski i in., 2007, 2008). Ergosterol został wyekstrahowany roztworem metanolu w środowisku alkalicznym przy jednoczesnym zmydłaniu z użyciem promieniowania mikrofalowego. Po neutralizacji roztworu, ergosterol został wyekstrahowany do fazy organicznej za pomocą pentanu. Po wysuszeniu w strumieniu azotu ergosterol był rozpuszczany w metanolu i rozdzielany chromatograficznie techniką HPLC na kolumnie krzemionkowej za pomocą metanolu. Detekcja prowadzona była na detektorze UV przy długości fali $\lambda=282$ nm. Identyfikacji ergosterolu dokonano na podstawie czasu retencji. Ilość ergosterolu została określona na podstawie krzywej kalibracyjnej czystego wzorca (metoda wzorca zewnętrznego).

Obliczenia statystyczne

Analiza statystyczna została wykonana za pomocą pakietu Microsoft® Excel 2010/XLSTAT®-Pro (Version 2013.4.07, Addinsoft, Inc., Brooklyn, NY, USA). Przeprowadzono analizę wariancji IFK oraz FDK oraz porównanie średnich testem Tukeya (XLSTAT: ANOVA). Obliczono współczynniki korelacji IFK, FDK, redukcji komponentów plonu oraz zawartości poszczególnych mikotoksyn (XLSTAT: Correlation tests). W celu zgrupowania rodów na podstawie różnych typów odporności w dwóch lokalizacjach zastosowano metodę analizy składowych głównych (XLSTAT: PCA).

WYNIKI I DYSKUSJA

Badania obejmowały 35 genotypów pszenżyta ozimego o zróżnicowanym podłożu genetycznym, pochodzące z różnych kombinacji krzyżowań odmian i genotypów o poznanej podwyższonej odporności oraz 3 formy kontrolne Tomko, Borwo i Fredro. Pierwszy komponent odporności — porażenie kłosa wyrażone indeksem fuzariozy (% FK) — wynosiło w Cerekwicy średnio IFK = 19,2% i kształtowało się w zakresie od 7,8 do 55,8%, i było wyższe niż w drugiej lokalizacji — Radzikowie, gdzie średnio odnotowano IFK = 11,0% (zakres od 4,3 do 21,3%) (tab. 1). Niskie porażenie kłosa w obu lokalizacjach (około 10%) odnotowano dla genotypów MAH 34359-1, DS.9, BOHD 1352-2, DANKO 2, DANKO 17 i BOH 537-2. Średnie porażenie kłosów pszenżyta z obu lokalizacji wyniosło 15,1% (zakres od 7,6 do 30,7%) (tab. 1).

Współczynnik korelacji porażenia kłosa (%IFK) w lokalizacjach Cerekwica i Radzików dla badanych genotypów wynosił $r = 0,429$. Warunki pogodowe w obu lokalizacjach były zróżnicowane, co wpłynęło na duże różnice w porażeniu kłosa. Odnotowano podobną temperaturę w Cerekwicy i Radzikowie w ostatniej dekadzie maja, w czasie kwitnienia genotypów pszenżyta (około 18°C), natomiast stwierdzono znacznie wyższe w tym czasie opady w Cerekwicy, 62 mm w porównaniu z opadami w Radzikowie, gdzie odnotowano tylko 42 mm (tab. 2).

Tabela 1

Indeks fuzariozy kłosów (IFK), uszkodzenie ziarniaków przez *Fusarium* (FDK) oraz redukcja masy ziarna z kłosa (MZK) u genotypów pszenżyta ozimego inokulowanych *F. culmorum* w Cerekwicy (C) i Radzikowie (R)

***Fusarium* hed blight index (FHBi), *Fusarium* damaged kernels (FDK) and reduction of grain yield per spike (Yield reduction) for winter triticale lines inoculated with *F. culmorum* in Cerekwica (C) and Radzikow (R)**

Lp. No	Genotyp ^{&} Genotype ^{&}	IFK (%) C FHBi (%) C	IFK (%) R FHBi (%) R	IFK (%) śr. [#] FHBi (%) avg. [#]	FDK (%) C FDK (%) C	FDK (%) R FDK (%) R	FDK (%) śr. [#] FDK (%) avg. [#]	Redukcja MZK (%) C Yield reduction (%) C	Redukcja MZK (%) R Yield reduction (%) R	Redukcja MZK (%) śr. [#] Yield reduction (%) avg. [#]
1	MAH 34359-1	9,3	5,9	7,6	30,6	34,2	32,4	57,8	15,9	36,8
2	DS. 9	7,9	8,1	8,0	16,1	5,0	10,5	42,7	16,4	29,6
3	BOHD 1352-2	5,5	12,8	9,2	32,9	23,7	28,3	64,1	19,3	41,7
4	DANKO 2	9,5	10,3	9,9	31,6	30,0	30,8	65,5	47,8	56,6
5	DANKO 17	12,4	7,8	10,1	29,1	5,3	29,3	43,9	22,3	52,1
6	BOH 537-2	9,5	10,7	10,1	20,3	38,2	17,2	70,8	33,3	33,1
7	DS 1238	9,3	11,8	10,5	28,2	9,3	18,8	70,0	46,8	58,4
8	MAH 33544-4	12,8	8,6	10,7	33,6	29,9	31,7	61,8	57,9	59,9
9	BOHD 1049-1	11,8	10,1	10,9	33,8	17,6	25,7	79,5	24,5	52,0
10	MAH 32247-1	13,0	8,9	11,0	40,4	26,1	33,2	81,6	37,8	59,7
11	DL 446/08	12,5	9,8	11,2	33,0	3,2	18,1	78,7	38,0	58,3
12	DANKO 4	10,8	11,8	11,3	38,9	35,0	37,0	88,0	13,3	50,6
13	DANKO 9 (Tox)	16,7	6,2	11,4	53,6	8,4	31,0	43,6	14,1	28,8
14	BOH 1062-2	14,3	9,0	11,6	29,3	17,1	23,2	56,1	8,0	32,0
15	DANKO 13	15,8	8,3	12,0	54,2	45,3	49,8	80,9	26,6	53,8
16	BOH 835-4 (Tox)	14,8	9,6	12,2	65,3	23,9	44,6	73,7	22,8	48,3
17	DC 06080-56	17,0	7,4	12,2	45,8	5,0	25,4	65,7	24,9	45,3
18	DANKO 6	12,4	12,2	12,3	29,1	29,8	29,5	63,9	34,2	49,0
19	BOHD 898-1	13,5	11,9	12,7	35,5	48,4	41,9	56,4	19,6	38,0
20	MAH 33544-3/1	18,0	7,5	12,8	45,5	20,5	27,5	85,1	38,5	35,4
21	BOHD 1186-1	13,5	12,0	12,8	82,3	49,6	33,0	81,8	33,8	61,8
22	DANKO 1 (S)	13,8	11,9	12,8	28,3	26,7	66,0	54,8	16,0	57,8
23	BOH 534-4	13,1	12,6	12,9	33,8	33,5	33,7	70,6	43,0	56,8
24	LD 121/08	21,8	4,3	13,0	45,1	32,2	38,7	68,1	12,9	40,5
25	BOHD 1025-2	18,5	8,3	13,4	44,1	19,7	31,9	73,4	33,0	53,2
26	DC 03326/06/2	13,8	14,4	14,1	31,4	28,8	30,1	78,6	15,5	47,0
27	DL 593/07	20,8	7,4	14,1	44,0	30,4	37,2	64,6	33,3	49,0
28	DANKO 8	24,0	6,6	15,3	47,4	4,4	25,9	67,1	1,2	34,1
29	MAH 31011-2	21,8	9,8	15,8	54,2	23,5	38,8	63,8	25,3	44,6
30	MAH 32726-1/1	16,3	15,8	16,0	34,8	27,4	31,1	46,0	20,1	33,1
31	MAH 33881-7	20,0	12,9	16,5	32,5	11,9	22,2	49,4	28,3	38,9
32	DAST 15/11 (Tox)	33,3	19,5	26,4	28,6	16,9	22,7	60,3	44,1	52,2
33	MAH 34068-5 (Tox)	31,9	21,3	26,6	35,7	8,4	22,0	59,7	12,3	36,0
34	Fredro	42,4	12,5	27,4	19,3	15,4	17,3	68,2	57,0	62,6
35	MAH 33116-7/1 (S)	39,3	16,8	28,0	64,4	35,1	49,7	89,2	56,6	72,9
36	Borwo	48,6	11,6	30,1	38,4	18,8	28,6	69,3	25,1	47,2
37	Tomko	48,6	11,8	30,2	37,5	14,8	26,1	54,6	42,8	48,7
38	BOH 1273-1 (S)	41,5	19,8	30,7	42,1	29,6	35,8	86,9	10,6	48,7
Średnie — Means		19,2	11,0	15,1	38,7	23,2	31,0	66,7	28,2	47,5

[&] — genotypy uszeregowane wg średniego IFK; [#] — średnie dla Cerekwicy i Radzikowa; S — linie podatne na infekcję kłosa w roku 2013; Tox — linie o wysokiej akumulacji toksyn w ziarnie w roku 2013

[&] — genotypes ordered according to the average FHBi; [#] — average values for Cerekwica and Radzików; S- lines susceptible in 2013; Tox — lines accumulating high amounts of toxins in 2013

Wysoka wilgotność podczas kwitnienia pszenżyta i po kwitnieniu wpłynęła na skuteczniejszą infekcję i znaczne porażenie kłosa w doświadczeniu inokulacyjnym w Cerekwicy.

Tabela 2

Temperatura i opady w dwóch lokalizacjach Poznań-Cerekwica i Radzików
Air temperature and precipitation in two experimental locations Poznań-Cerekwica and Radzików

Miesiąc Month	Średnia temperatura (°C) Average temperature (°C)		Suma opadów (mm) Precipitation (mm)	
	Cerekwica	Radzików	Cerekwica	Radzików
20–31 V	18,1	18,2	62,0	46,0
VI	16,9	16,3	28,2	61,0
VII	22,2	21,6	61,4	78,4
VIII	18,0	18,1	58,6	87,4

Ocena porażenia kłosa w sezonie 2014 była bardzo skomplikowana, ponieważ obserwowano duże nasilenie rdzy żółtej na terenie całej Polski. Grzyb *Puccinia striiformis* porażał nie tylko liście, ale również kłosa pszenżyta (do 100% kłosów porażonych dla niektórych genotypów). Utrudniało to w znacznym stopniu prawidłową ocenę porażenia przez *Fusarium culmorum*. Mogło to być powodem uzyskania niskiej korelacji wyników porażenia kłosów z dwóch lokalizacji. Wiarygodna ocena porażenia kłosów pszenżyta przez *Fusarium* jest uważana za trudniejszą niż u pszenicy ze względu na morfologię kłosa pszenżyta (Miedaner i in., 2004).

Uszkodzenie ziarniaków (typ III odporności) wynosiło w lokalizacji Cerekwica średnio %FDK = 38,7% i wahało się od 16,0% (genotyp DS.9) do 82,3% (genotyp DANKO 1) (tab. 1). U 3 genotypów pszenżyta ozimego (DS.9, DANKO 17, Fredro) stwierdzono niewielki procent ziarna z wyraźnymi objawami fuzariozy (do 20% FDK). Natomiast znaczne uszkodzenie ziarna powyżej 40% FDK odnotowano u 6 genotypów (DANKO 9, MAH 31011-2, DANKO 13, MAH 33116-7/1, BOH 835-4, DANKO 1), z których u trzech genotypów stwierdzono duże uszkodzenie ziarna, ale niewielkie porażenie kłosa do 16% IFK, co bardzo często obserwowane jest u pszenżyta. W Radzikowie uszkodzenie ziarniaków było niższe i wyniosło 23,3%. Zakres zmienności mieścił się w granicach od 3,2% (DL 446/08) do 49,6% (DANKO 1). Niewielkie uszkodzenie (poniżej 6%) stwierdzono u 5 genotypów (DL 446/08, DANKO 8, DS. 9, DC 06080-56, BOH 537-2). Silne uszkodzenie (powyżej 40%) wystąpiło u 3 genotypów (DANKO 13, BOHD 898-1, DANKO 1). Średnie uszkodzenie ziarniaków pszenżyta z obu lokalizacji wyniosło 31,0% (zakres od 10,5 do 66,0%) (tab. 1).

Współczynnik korelacji uszkodzenia ziarniaków w obu lokalizacjach wyniósł $r = 0,318$ i nie był istotny statystycznie. Brak było korelacji pomiędzy indeksem fuzariozy kłosów a uszkodzeniem ziarniaków, zarówno w Cerekwicy jak i w Radzikowie.

Średnia masa ziarna z kłosa po inokulacji genotypów pszenżyta ozimego była niższa w porównaniu z kontrolą. Dla genotypów wysianych w doświadczeniu w Cerekwicy redukcja masy ziarna z kłosa (RMZK) wyniosła średnio 66,7% i wahała się od 42,7% u genotypu DS.9 do 89,2% u genotypu MAH 33116-7/1 (tab. 1). W drugiej lokalizacji Radzików średnia RMZK wyniosła 28,2% i wahała się od 1,2% (DANKO 8) do 57,9% u genotypu

MAH 33544-4. Średnia redukcja masy ziarna z kłosa pszenżyta z obu lokalizacji wyniosła 47,5% (zakres od 28,8 do 72,9%) (tab. 1).

Genotyp DS.9 mimo niskiego porażenia kłosa w dwóch lokalizacjach—średnio IFK = 8,0% i niewielkiego procentu ziarna z wyraźnymi objawami fuzariozy FDK = 10,5% reagował znaczną obniżką masy ziarna z kłosa po inokulacji RMZK = 29,6%. Najniższy ubytek masy ziarna po inokulacji w dwóch lokalizacjach stwierdzono u genotypu DANKO 9 Tox (28,8%), wspomnianego DS.9 oraz BOH 1062-2 (32,0%) (tab. 1).

Współczynnik korelacji redukcji MZK w obu lokalizacjach wyniósł $r = 0,228$ i nie był istotny statystycznie. Obniżkę masy ziarna z kłosa u genotypów pszenżyta po inokulacji stwierdzali również Oettler i Wahle (2001). Obserwowali oni również dużą interakcję genotypowo-środowiskową (lata i lokalizacje).

Uzyskanie genotypów pszenżyta z większą odpornością na fuzariozę kłosów w procesie hodowli jest trudne, ponieważ odporność na tę chorobę jest cechą ilościową, modyfikowaną przez czynniki genetyczne i przez warunki środowiskowe, szczególnie temperaturę i opady, od kwitnienia do stadium dojrzałości woskowej miękkiej (Mesterházy, 1995; Mesterházy i in., 2002; Miedaner, 1997; Chełkowski i in., 2000; Snijders, 2004; Cowger i in., 2009). Skutkuje to istnieniem znacznej interakcji genotypowo-środowiskowej (GE) (Miedaner i in., 2001; Buerstmayr i in., 2009; Warzecha i in., 2010). Ze względu na tę interakcję GE potrzebne są co najmniej dwa niezależne doświadczenia do fenotypowego oszacowania poziomu odporności. Selekcja materiału hodowlanego pod kątem odporności na fuzariozę kłosów jest więc czasochłonna i kosztowna (Hollins i in., 2003). W programach hodowlanych i badaniach nad fuzariozą kłosów nasilenie choroby jest określane poprzez wizualną ocenę objawów na kłosie (typ I i II) i wizualną ocenę uszkodzenia ziarniaków (FDK — odporność typu III) w zebranych próbach (Yang i in., 2004; Buerstmayr i in., 2009).

Zawartość trichotecenów z grupy B w badanych próbach ziarna była znaczna i średnio dla dwóch lokalizacji wynosiła 23,541 mg/kg i wahała się od 8,806 u genotypu DS.9 do 91,342 mg/kg u genotypu DANKO 1 (tab. 3). Podobnie stwierdzono bardzo duże ilości zearalenonu (ZEA) od 129 µg/kg u genotypu DS.9 do 3307 µg/kg u genotypu MAH 33116-7/1. Genotyp DS.9, u którego stwierdzono najniższą zawartość ZEA wykazywał najniższe porażenie kłosa (Typ II i I odporności) i redukcje masy ziarna po inokulacji (Typ V odporności) (tab. 1).

W doświadczeniu inokulacyjnym w Cerekwicy średnia zawartość trichotecenów B wynosiła 43,183 mg/kg (tab. 3). Zakres zmienności mieścił się w granicach 13,814 mg/kg (MAH 33116-7/1) — 172,567 mg/kg (DANKO 1). Akumulacja trichotecenów B w ziarnie w Radzikowie była ponad 10-krotnie niższa i wyniosła 3,898 mg/kg, w zakresie od 0,620 mg/kg (DS.9) do 10,136 mg/kg (MAH 33116-7/1). Podobne zależności obserwowano dla zearalenonu (tab. 3). Zawartość ZEA wynosiła 2272 µg/kg i wahała się od 248 µg/kg u genotypu DS.9 do 6251 µg/kg u genotypu MAH 33116-7/1. Była ona znacznie wyższa niż w Radzikowie, gdzie średnia zawartość ZEA wynosiła 126 µg/kg, w zakresie od 10 µg/kg (DS.9) do 363 µg/kg (MAH 33116-7/1). Zawartości trichotecenów B i ZEA w ziarnie w Radzikowie i Cerekwicy korelowały istotnie. Współczynniki wynosiły odpowiednio $r = 0,424$ i $r = 0,356$.

Tabela 3

Akumulacja ergosterolu (ERG), trichotecenów z grupy B (TCT B) (DON i pochodne, NIV) oraz zearalenonu (ZEA) w ziarnie genotypów pszenżyta ozimego inokulowanych *F. culmorum* w Cerekwicy (C) i Radzikowie (R)

Accumulation of ergosterol (ERG), trichothecenes of group B (TCT B) (DON and derivatives, NIV) and zearalenone (ZEA) in grain of winter triticale lines inoculated with *F. culmorum* in Cerekwica (C) and Radzików (R)

Lp. No.	Genotyp ^{&} Genotype ^{&}	ERG (mg/kg) C	ERG (mg/kg) R	ERG (mg/kg) śr. ^{\$} ERG (mg/kg) avg. ^{\$}	TCT B (mg/kg) C	TCT B (mg/kg) R	TCT B (mg/kg) śr. ^{\$} TCT B (mg/kg) avg. ^{\$}	ZEA (μg/kg) C	ZEA (μg/kg) R	ZEA (μg/kg) śr. ^{\$} ZEA (μg/kg) avg. ^{\$}	ERG+T CT +ZEA stnd [#]
1	DS. 9	19,1	7,4	13,2	16,991	0,620	8,806	248	10	129	-1,366
2	DANKO 17	36,6	25,2	30,9	22,704	4,809	13,757	562	96	329	-0,850
3	DS 1238	40,9	12,1	26,5	23,145	3,185	13,165	1048	253	650	-0,770
4	BOHD 1352-2	36,5	8,8	22,6	28,729	1,335	15,032	1457	43	750	-0,734
5	BOH 537-2	44,1	18,1	31,1	26,042	3,015	14,529	1289	103	696	-0,637
6	Fredro	54,5	29,1	41,8	23,000	2,947	12,973	958	87	523	-0,591
7	BOH 534-4	30,5	12,6	21,6	27,115	3,350	15,233	2278	58	1168	-0,529
8	DAST 15/11 (Tox)	57,3	22,6	39,9	30,774	4,937	17,856	794	258	526	-0,499
9	MAH 34359-1	47,4	7,3	27,3	39,277	4,312	21,795	1810	29	919	-0,401
10	MAH 34068-5 (Tox)	61,1	8,6	34,9	35,716	2,981	19,348	1586	50	818	-0,392
11	DC 03326/06/2	53,0	10,7	31,9	25,881	5,263	15,572	2178	71	1125	-0,375
12	BOHD 898-1	52,2	8,9	30,5	44,628	0,713	22,670	1625	48	836	-0,370
13	DANKO 8	57,8	13,3	35,5	37,359	2,731	20,045	1432	244	838	-0,353
14	DANKO 2	50,8	23,2	37,0	48,042	3,714	25,878	892	145	518	-0,350
15	BOH 1062-2	43,7	12,4	28,0	33,772	2,838	18,305	2407	87	1247	-0,306
16	MAH 33544-3/1	59,6	12,7	36,2	32,278	1,754	17,016	2110	43	1076	-0,295
17	Tomko	59,7	14,7	37,2	43,779	4,246	24,013	1436	55	745	-0,275
18	MAH 33881-7	59,3	12,8	36,1	40,566	1,486	21,026	1794	152	973	-0,250
19	BOHD 1025-2	54,2	7,9	31,0	39,301	2,928	21,114	2266	32	1149	-0,238
20	MAH 32726-1/1	56,7	9,5	33,1	37,305	1,141	19,223	2349	46	1198	-0,226
21	BOHD 1049-1	48,7	17,4	33,0	33,554	5,723	19,638	2296	149	1222	-0,204
22	DANKO 6	49,2	30,8	40,0	33,596	6,927	20,262	1813	158	985	-0,198
23	DANKO 4	62,5	11,1	36,8	37,672	3,148	20,410	2382	84	1233	-0,118
24	BOHD 1186-1	63,7	12,6	38,1	55,178	2,508	28,843	1496	150	823	-0,099
25	DL 446/08	65,3	9,5	37,4	46,623	1,734	24,179	2141	39	1090	-0,088
26	MAH 33544-4	59,3	14,3	36,8	39,519	3,653	21,586	2449	72	1260	-0,074
27	DANKO 13	67,0	21,7	44,3	42,831	6,951	24,891	2040	161	1101	0,048
28	BOH 1273-1 (S)	49,6	11,8	30,7	35,694	1,807	18,750	3594	110	1852	0,064
29	LD 121/08	87,3	17,4	52,4	50,255	5,047	27,651	2022	70	1046	0,219
30	DL 593/07	84,7	15,2	50,0	51,766	4,633	28,200	2382	82	1232	0,291
31	DANKO 9 (Tox)	91,3	19,4	55,3	69,099	4,236	36,668	2410	79	1244	0,596
32	Borwo	82,7	10,0	46,4	71,819	6,790	39,304	2650	221	1435	0,615
33	MAH 31011-2	75,4	12,2	43,8	56,144	4,509	30,326	4299	18	2158	0,725
34	MAH 32247-1	69,0	11,0	40,0	43,322	3,422	23,372	5230	124	2677	0,760
35	BOH 835-4 (Tox)	101,6	10,3	56,0	73,297	3,907	38,602	3010	91	1550	0,814
36	DC 06080-56	97,7	12,7	55,2	57,812	4,566	31,189	3783	241	2012	0,857
37	MAH 33116-7/1 (S)	176,8	45,3	111,1	13,814	10,136	11,975	6251	363	3307	1,961
38	DANKO 1 (S)	212,1	33,6	122,9	172,567	10,116	91,342	4349	359	2354	3,638
Średnie — Means		66,3	15,6	41,0	43,183	3,898	23,541	2240	118	1179	-

[&] — genotypy uszeregowane wg wartości ERG+TCT+ZEA stnd; ^{\$} — średnie dla Cerekwicy i Radzikowa; [#] — średnia ze standaryzowanych zawartości ERG, TCT B i ZEA; S — linie podatne na infekcję kłosa w roku 2013; Tox — linie o wysokiej akumulacji toksyn w ziarnie w roku 2013; [&] — genotypes ordered according to the ERG+TCT+ZEA stnd value; ^{\$} — average values for Cerekwica and Radzików; [#] — mean of standardized values of ERG, TCT B and ZEA; S- lines susceptible in 2013; Tox — lines accumulating high amounts of toxins in 2013

Badano również zawartość ergosterolu — miernika ilości grzybni w tkance (Seitz i in., 1979). Najmniejsze ilości ERG (13,2 mg/kg) stwierdzono u genotypu DS.9 wykazującego najniższe porażenie kłosa (8% IFK), ziarna (10,0% FDK) i najmniejsze wartości toksyn z grupy B i zearalenonu (tab. 1, 3). Wysoką średnią zawartość ergosterolu stwierdzono u genotypu pszenżyta DANKO 1 (122,0 mg/kg) oraz MAH 33116-7/1 (S) (111,1 mg/kg). Zawartość ERG w ziarnie z doświadczenia w Cerekwicy (66,3 mg/kg) była czterokrotnie wyższa niż w Radzikowie (15,6 mg/kg). Współczynnik korelacji ERG w obu lokalizacjach wyniósł $r = 0,569$ i był istotny statystycznie.

Podsumowując, najniższe zawartości metabolitów fuzaryjnych stwierdzono w ziarnie takich genotypów jak: DS. 9, DANKO 17, DS 1238, BOHD 1352-2, BOH 537-2, natomiast najwyższe w ziarnie genotypów BOH 835-4 (Tox), DC 06080-56, MAH 33116-7/1 (S), DANKO 1 (S) (tab. 3; ERG+TCT+ZEA std).

Tabela 4 obrazuje współczynniki korelacji pomiędzy % IFK, % FDK oraz zawartością ergosterolu i toksyn fuzaryjnych. Odnotowano niski współczynnik korelacji stopnia porażenia kłosów (% FK) a uszkodzeniem ziarniaków i zawartością toksyn. Istotny był jedynie współczynnik korelacji z zawartością ergosterolu w ziarnie.

Tabela 4

Współczynniki korelacji pomiędzy indeksem fuzariozy kłosów (IFK), uszkodzeniem ziarniaków przez *Fusarium* (FDK), redukcją plonu (RMZK) oraz zawartością ergosterolu (ERG), trichotecenów B (TCT B) oraz zearalenonu (ZEA) w ziarnie 38 genotypów pszenżyta. Średnie z doświadczeń w Cerekwicy i Radzikowie

Coefficients of correlation between *Fusarium* head blight index (FHBi), *Fusarium* damaged kernels (FDK), grain yield reduction (Yield red.) and accumulation of ergosterol (ERG), trichothecenes B (TCT B) and zearalenone (ZEA) in grain of 38 winter triticale lines. Averages from experiments in Cerekwica and Radzików

Zmienne Variables	IFK FHBi	FDK FDK	RMZK Yield red.	ERG ERG	TCT B TCT B
FDK — FDK	0,067				
RMZK — Yield red.	0,204	0,336			
ERG — ERG	0,334	0,635	0,374		
TCT B — TCT B	0,024	0,594	0,090	0,642	
ZEA — ZEA	0,231	0,675	0,287	0,657	0,520

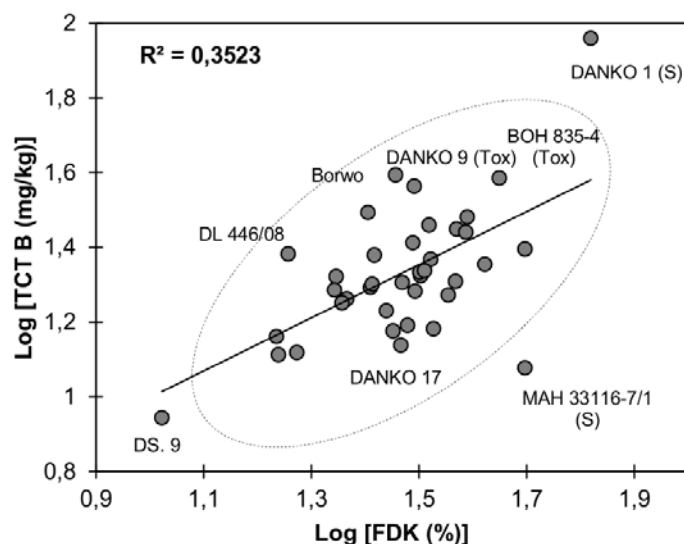
Wyróżnione współczynniki istotne na poziomie alfa < 0,05

Bolded coefficients significant at $P < 0.05$ level

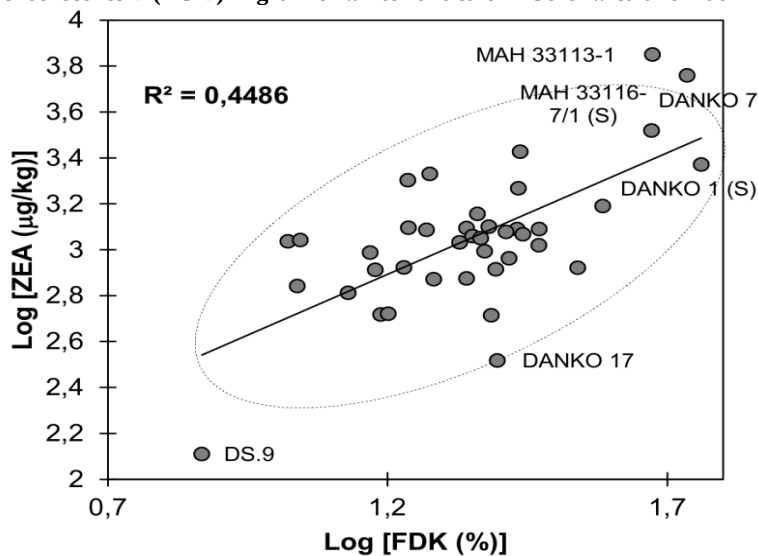
Redukcja masy ziarna z kłosa w istotny sposób korelowała z uszkodzeniem ziarniaków przez *Fusarium* (tab. 4). Podobnie RMZK korelowała z zawartością ergosterolu w ziarnie. Brak było natomiast istotnej korelacji RMZK z zawartością zearalenonu i trichotecenów B w ziarnie, pomimo istnienia wpływu wielkości FDK na zawartość tych toksyn.

Stwierdzono wysoki współczynnik determinacji pomiędzy średnim uszkodzeniem ziarna (FDK) i średnią zawartością zearalenonu, który wynosił $R^2 = 0,449$ (rys. 2). Niższy współczynnik determinacji wyliczono między średnim uszkodzeniem ziarna (FDK) i średnią zawartością trichotecenów B i wynosił $R^2 = 0,352$ (rys. 1).

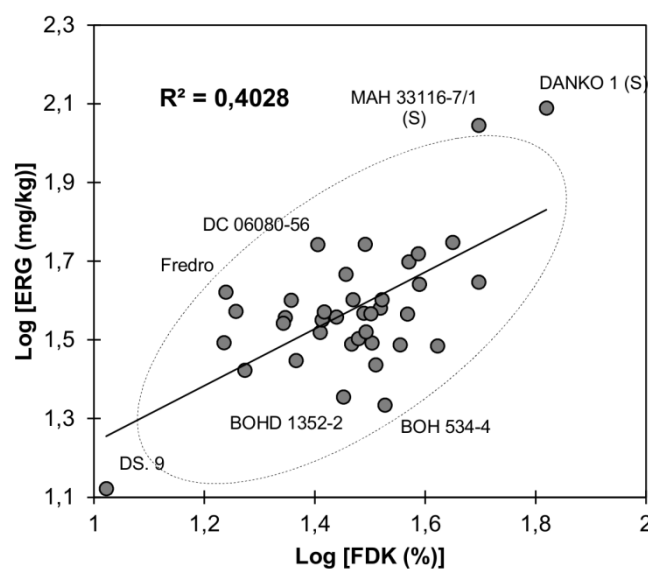
Zawartość ergosterolu w ziarnie korelowała istotnie z procentem uszkodzenia ziarniaków ($R^2 = 0,403$) oraz zawartością zearalenonu ($R^2 = 0,432$) i trichotecenów B ($R^2 = 0,412$) (rys. 3–5).



Rys. 1. Zależność pomiędzy średnim uszkodzeniem ziarniaków (FDK) oraz średnią zawartością trichotecenów B (TCT B) w ziarnie pszenżyta ozimego w Cerekwicy i Radzikowie
Fig.1. Relationship between proportion of *Fusarium* damaged kernels (FDK) and concentration of trichothecenes B (TC B) in grain of winter triticale in Cerekwica and Radzików

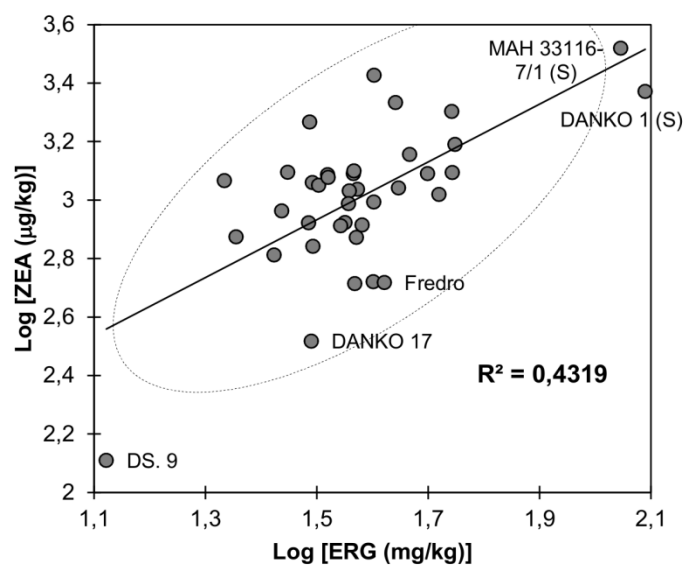


Rys. 2. Zależność pomiędzy średnim uszkodzeniem ziarniaków (FDK) oraz średnią zawartością zearalenonu (ZEA) w ziarnie pszenżyta ozimego w Cerekwicy i Radzikowie
Fig. 2. Relationship between proportions of *Fusarium* damaged kernels (FDK) and concentration of zearalenone (ZEA) in grain of winter triticale in Cerekwica and Radzików



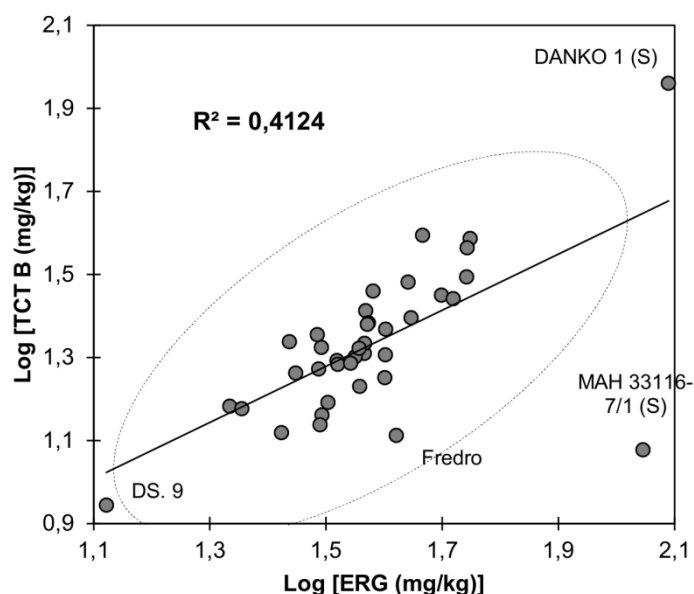
Rys. 3. Zależność pomiędzy średnim uszkodzeniem ziarniaków (FDK) oraz średnią zawartością ergosterolu (ERG) w ziarnie pszenżyta ozimego w Cerekwicy i Radzikowie.

Fig. 3. Relationship between proportions of *Fusarium* damaged kernels (FDK) and concentration of ergosterol (ERG) in grain of winter triticale in Cerekwica and Radzików



Rys. 4. Zależność między zawartością ergosterolu (ERG) a akumulacją zearalenonu (ZEA) w ziarnie pszenżyta ozimego

Fig. 4. Relationship between concentration of ergosterol (ERG) and zearalenone (ZEA) in grain of winter triticale

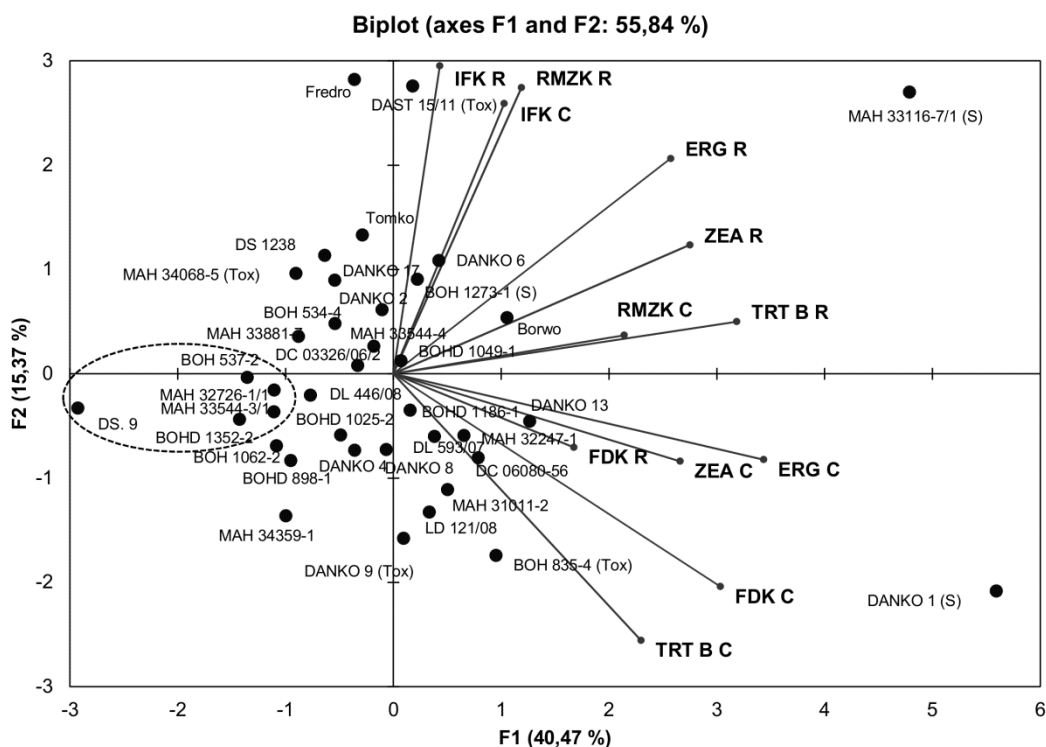


Rys. 5. Zależność między zawartością ergosterolu (ERG) a akumulacją trichotecenów B (TCT B) w ziarnie pszenżyta ozimego

Fig. 4. Relationship between concentration of ergosterol (ERG) and trichothecenes B (TCT B) in grain of winter triticale

Ze względu na złożoność odporności na fuzariozę kłosów oraz różne jednostki miar poszczególnych cech uzyskane wyniki poddano statystycznej analizie składowych głównych. Genotypy pszenżyta (38) zostały pogrupowane na podstawie odporności na porażenie kłosa i uszkodzenia ziarniaków w Cerekwicy i w Radzikowie oraz zawartości ergosterolu i toksyn fuzaryjnych w ziarnie (rys. 6). Genotypy o najwyższej odporności to te, które lokują się po przeciwnej stronie wektorów, czyli mają niskie wartości dla wszystkich zmiennych (DS. 9, MAH 32726-1/1, MAH 33544-4, BOH 537-2, BOHD 1352-2).

Część genotypów badanych w bieżącej pracy znalazła się w doświadczeniach infekcyjnych, których wyniki opublikowano w pracy Wiśniewskiej i in. (2014). Porównanie wyników dla 24 genotypów wykazało wysoką zgodność indeksów fuzariozy kłosów ($r = 0,780$) oraz zawartości trichotecenów B ($r = 0,732$). Współczynniki dla stopnia uszkodzenia ziarniaków oraz zawartości zearalenonu był nieistotne i wynosiły odpowiednio $r = 0,375$ i $r = 0,246$. Najwyższą odpornością wszystkich typów wykazały się genotypy DS.9 i DS. 1328. Niską akumulacją toksyn charakteryzowały się odmiana Fredro i genotyp BOHD 1352-2. Najbardziej podatne były odmiana Borwo i genotyp BOH 835-4 (Tox).



Rys. 6. Układ współrzędnych dwóch składowych głównych dla 38 genotypów pszenżyta ozimego. Składowe wyjaśniają 55,8% zmienności odporności na fuzariozę kłosów mierzoną indeksem fuzariozy kłosów (IFK), uszkodzeniem ziarniaków (FDK), redukcją masy ziarna z kłosa (RMZK) oraz zawartością ergosterolu (ERG), zearalenonu (ZEA) i trichotecenów B w ziarnie w Radzikowie (R) i Cerekwicy (C)

Fig.6. Biplot of the principal component analysis for 38 winter triticale lines. Two first components explained 55.8% of variability of Fusarium head blight resistance characterized with FHB index (IFK), Fusarium damaged kernels (FDK), grain yield reduction (RMZK) and concentration of ergosterol (ERG), zearalenone (ZEA) and trichothecenes B (TCT B) in grain in Radzików (R) and Cerekwica (C)

WNIOSKI

1. Genotypy pszenżyta ozimego charakteryzowały się zróżnicowaną odpornością na porażenie kłosów i ziarniaków przez *Fusarium culmorum*.
2. Stwierdzono brak korelacji pomiędzy indeksem fuzariozy kłosów a uszkodzeniem ziarna w obu lokalizacjach.
3. Redukcja masy ziarna z kłosa w istotny sposób korelowała z uszkodzeniem ziarniaków przez *Fusarium culmorum*.
4. Uszkodzenie ziarniaków oraz zawartość ergosterolu korelowały istotnie z zawartością trichotecenów B i zearalenonu w ziarnie.

5. Zidentyfikowano 5 genotypów (DS. 9, MAH 32726-1/1, MAH 33544-4, BOH 537-2, BOHD 1352-2) o niskim porażeniu kłosa i uszkodzeniu ziarniaków przez *Fusarium clumorum* oraz niskiej akumulacji toksyn fuzaryjnych w ziarnie.

LITERATURA

- Argyris J., Van Sanford D., TeKrony D. 2003. *Fusarium graminearum* infection during wheat seed development and its effect on seed quality. *Crop Sci* 43: 1782 — 1788.
- Audenaert K., Troch V., Landschoot S., Haesaert G. 2014. Biotic stresses in the anthropogenic hybrid triticales (*×Triticosecale* Wittmack): current knowledge and breeding challenges. *Eur. J. Plant Pathol.* 140: 615 — 630.
- Buerstmayr H., Steiner B., Hartl L., Griesser M., Angerer N., Lengauer D., Miedaner T., Schneider B., Lemmens M. 2003. Molecular mapping of QTLs for *Fusarium* head blight resistance in spring wheat. II. Resistance to fungal penetration and spread. *Theor. Appl. Genet.* 107: 503 — 508.
- Buerstmayr H., Ban T., Anderson J. A. 2009. QTL mapping and marker-assisted selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat: A review. *Plant Breed.* 128: 1 — 26.
- Chełkowski J., Kapturek P., Tomkowiak M., Kostecki M., Goliński P., Ponitka A., Jarzina-Slusarkiewicz A., Bocianowski J. 2000. Moniliformin accumulation in kernels of triticales accessions inoculated with *Fusarium avenaceum* in Poland. *J. Phytopathology* 148: 433 — 449.
- Comeau A., Langevin F., Savard M. E., Gilbert J., Dion Y., Rioux S., Martin S.A., Haber S., Voldeng H., Fedak G., Somers D., Eudes F. 2008. Improving *Fusarium* head blight resistance in bread wheat and triticales for Canadian needs. *Cereal Res. Commun.* 36 (6): 91 — 92.
- Cowger C., Arrellano C. 2010. Plump kernels with high deoxynivalenol linked to late *Gibberella zeae* infection and marginal disease conditions in winter wheat. *Phytopathology*. 100: 719 — 28.
- Cowger C., Patton-Ozkurt J., Brown-Guedira G., Perugini L. 2009. Post-anthesis moisture increased *Fusarium* head blight and deoxynivalenol levels in North Carolina winter wheat. *Phytopathology* 99: 320 — 7.
- Faris T. D., Li W. L., Liu D. J., Chen P. D., Gill B. S. 1999. Candidate gene analysis of quantitative disease resistance in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 98: 219 — 225.
- Feuillet C., Keller B. 2004. Molecular markers for disease resistance: the example wheat. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. vol.55, *Molecular Marker Systems*. H. Loerz, G. Wenzel (eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 353 — 370.
- Foroud N.A., Eudes F. 2009. Trichothecenes in cereal grains. *Int. J. Mol. Sci.* 10: 147 — 173.
- Góral T. 2007. Ocena odporności rodów pszenicy i pszenżyta na fuzariozę kłosów, pleśń śniegową i rdzę brunatną w Radzikowie w 2006 roku. *Komunikat. Biul. IHAR* 246: 31 — 44.
- Góral T., Ochodzki P. 2006. Resistance of Polish winter triticales cultivars to *Fusarium* head blight and accumulation of *Fusarium*-mycotoxins in grain. *Proc. of 16th International Triticales Symposium*, September 3–7 2006, Stellenbosch, South Africa: 140 — 143.
- Hollins T. W., Ruckebauer P., De Jong H. 2003. Progress towards wheat varieties with resistance to *Fusarium* head blight. *Food Control* 14: 239 — 244.
- Kalih R., Maurer H. P., Miedaner T. 2015. Genetic architecture of *Fusarium* head blight resistance in four winter triticales populations. *Phytopathology* 105: 334 — 341.
- Kang Z., Buchenauer H. 2000. Ultrastructural and cytochemical studies on cellulose, xylan and pectin degradation in wheat spikes infected by *Fusarium culmorum*. *J. Phytopath.* 148: 263 — 275.
- Langevin F., Eudes F., Comeau A. 2004. Effect of trichothecenes produced by *Fusarium graminearum* during *Fusarium* head blight development in six cereal species. *Eur. J. Plant Path.* 110: 735 — 746.
- Keller B., Feuillet C., Messmer M. 2000. Genetics of disease resistance. In: *Mechanisms of resistance to plant diseases*. Slusarenko, Fraser, van Loon (eds.), Kluwer Academic Publishers: 101 — 160.
- Mesterházy, Á. 1995. Types and components of resistance to *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Breed.* 114: 377 — 386.

- Mesterhazy A., Logrieco A., Bailey J. A., Corazza L., Cooke B. M. 2002. Role of deoxynivalenol in aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* and in resistance to *Fusarium* head blight. *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 675 — 684.
- Miedaner T. 1997. Breeding wheat and rye for resistance to *Fusarium* diseases. *Plant Breeding* 116: 201 — 220.
- Miedaner T., Reinbrecht C., Lauber U., Schollenberger M., Geiger H. H. 2001. Effects of genotype and genotype x environment interaction on deoxynivalenol accumulation and resistance to *Fusarium* head blight in rye, triticale, and wheat. *Plant Breed.* 120: 97 — 105.
- Miedaner T., Heinrich N., Schneider B., Oettler G., Rohde S., Rabenstein F. 2004. Estimation of deoxynivalenol (DON) content by symptom rating and exoantigen content for resistance selection in wheat and triticale. *Euphytica* 139: 129 — 132.
- Nirenberg H. I. 1976. Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium*-Section Liseola. Berlin-Dahlem: Mitt Biol Bundesanst für Land- und Forstwirt. 169: 1 — 117.
- Oettler G., Wahle G. 2001. Genotypic and environmental variation of resistance to head blight in triticale inoculated with *Fusarium culmorum*. *Plant Breeding* 123: 297 — 300.
- Paillard S., Schnurbush T., Tiwari R., Winzeler M., Keller B., Schachermayer G. 2003. QTL analysis of resistance to *Fusarium* head blight in Swiss winter wheat. *Proceedings of the Tenth International Wheat Genetics Symposium*, 1–6 September 2003, Pastum Italy VI: 400 — 403.
- Perkowski J., Buśko, M., Stuper K., KostECKI M., Matysiak, A., Szwajkowska-Michałek, L. 2008. Concentration of ergosterol in small-grained naturally contaminated and inoculated cereals. *Biologia* 63 (4): 542 — 547.
- Perkowski J., Wiwart M., Busko M., Laskowska M., Berthiller F., Kandler W., Krska R. 2007. *Fusarium* toxins and total fungal biomass indicators in naturally contaminated wheat samples from north-eastern Poland in 2003. *Food Additives and Contaminants* 24: 1292 — 1298.
- Parry D. W., Jenkinson P., Mc Leod L. 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in grain cereals-a review. *Plant Path.* 44: 207 — 238.
- Randhawa H., Eudes F., Beres B., Graf R., Fedak G., Comeau A., Langevin F., Dion Y., Pozniak C. 2013. Integrated approaches for triticale breeding. *Abstract Book of the 8th International Triticale Symposium*, June 10th–14th 2013, Ghent, Belgium: 29.
- Seitz L. M., Sauer D. B., Burroughs R., Mohr H. E., Hubbard J. D. 1979. Ergosterol as a measure of fungal growth. *Phytopathology* 69: 1202 — 1203.
- Siou D., Gélisse S., Laval V., Repinçay C., Canalès R., Suffert F., Lannou C. 2014. Effect of wheat spike infection timing on *Fusarium* head blight development and mycotoxin accumulation. *Plant Pathol.* 63: 390 — 399.
- Snijders C. H. A., Perkowski J. 1990. Effects of head blight caused by *Fusarium culmorum* on toxin content and weight of wheat kernels. *Phytopathology* 80 (6): 566 — 570.
- Snijders C. H. D. 2004. Resistance in wheat to *Fusarium* infection and trichothecene formation. *Toxicology Letters* 153: 37 — 46.
- Wiśniewska H., Kowalczyk K. 2005. Resistance of cultivars and breeding lines of spring wheat to *Fusarium culmorum* and powdery mildew. *J. Appl. Genet.* 46 (1): 35 — 40.
- Veitch R. S., Caldwell C. D., Martin R. A., Lada R., Salmon D., Anderson, D. M., MacDonald D. 2008. Susceptibility of winter and spring triticales to *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation. *Can. J. Plant Sci.* 88: 783 — 788.
- Warzecha T., Adamski T., Kaczmarek Z., Surma M., Goliński P., Perkowski J., Chełkowski J., Wiśniewska H., Krystkowiak K., Kuczyńska A. 2010. Susceptibility of hulled and hulless barley doubled haploids to *Fusarium culmorum* head blight. *Cereal Research. Commun.* 38 (2): 220 — 232.
- Wiśniewska H., Góral T., Ochodzki P., Walentyn-Góral D., Kwiatek M., Majka M., Grzeszczak I., Bełetr J., Banaszak Z., Pojmaj M., Kurlito D., Konieczny M., Budzianowski G., Cicha A., Paizert K., Woś H. 2014. Odporność rodów hodowlanych pszenżyta ozimego na fuzariozę kłosów. *Biul. IHAR* 271: 29 — 43.

AURELIA ŚLUSARKIEWICZ-JARZINA**ALEKSANDRA PONITKA**

Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu

Otrzymywanie podwojonych haploidów z mieszańców ozimych i jarych pszenżyta z zastosowaniem kolchicyny w kulturach pylnikowych *

Doubled haploid production of winter and spring tritcale hybrids using colchicine in anther cultures

Celem pracy było podwyższenie efektywności otrzymywania podwojonych haploidów w kulturach pylnikowych 6 form mieszańcowych pszenżyta ozimego i 6 form jarych poprzez zastosowanie kolchicyny w pożywce indukującej androgenezę. Modyfikowano stężenie kolchicyny i czas traktowania (0,1 mg/l lub 1,0 mg/l kolchicyny odpowiednio przez 24, 48 i 72 godziny) w płynnej pożywce C17. Stwierdzono, że optymalnymi parametrami zastosowania kolchicyny były stężenia 1,0 mg/l przez 24 godziny oraz 0,1 mg/l przez 48 godzin. Na podstawie analiz cytometrycznych, w tych warunkach stwierdzono zwiększenie liczby roślin o podwojonej liczbie chromosomów. Wynik ten obserwowano u 6 form ozimych (średnio 66,2%) oraz u 2 form jarych (średnio 52,7%), w porównaniu z warunkami kontrolnymi na pożywce bez kolchicyny, w których uzyskano około 30% podwojonych haploidów.

Słowa kluczowe: kolchicyna, kultury pylnikowe, podwojone haploidy, pszenżyto ozime i jare

The aim of this work was to increase the efficiency of doubled haploids production in anther cultures of 6 winter and 6 spring tritcale hybrids. The colchicine concentration and the time of its use (0.1 mg/l or 1.0 mg/l colchicine, for 24, 48 and 72 h, respectively) in androgenesis inducing C17 liquid medium were modified. It was found that the optimal parameters of colchicine treatment were 1.0 mg/l for 24 hours, and 0.1 mg/l for 48 hours. Based on flow cytometry analysis, in those conditions an increase in a number of doubled haploids was observed. The increase was observed in 6 forms of winter (average 66.2%) and 2 forms of spring tritcale (average of 52.7%), as compared to control conditions (the C17 medium without colchicine), producing of about 30.0% of doubled haploids

Key words: colchicine, anther culture, doubled haploids, winter and spring tritcale

* Praca wykonana w ramach projektu MRiRW: HORhn-801-8/14, zadanie 18

WSTĘP

Zadaniem hodowli roślin jest tworzenie nowych odmian, bardziej plennych i o polepszonych cechach użytkowych. Jest to proces długotrwały i wynosi u pszenżyta od 10 do 12 lat. W hodowli konwencjonalnej zarejestrowanie nowych odmian jest poprzedzone kilkuletnim procesem homozygotyzacji, w celu otrzymania wyrównanych materiałów. Często rejestracja wyprowadzonych materiałów jako nowych odmian, pomimo korzystnych wartości gospodarczych nie zawsze jest możliwa ze względu na niedostateczne wyrównanie. Zmienność rekombinacyjną na poziomie gametycznym można utrwalić w krótkim czasie, wykorzystując haploidalne stadium rośliny dla uzyskiwania całkowicie homozygotycznych linii z heterozygotycznego materiału. Zastosowanie metody kultur pylnikowych stwarza możliwość regeneracji haploidalnych roślin w procesie indukowanej androgenezy. U pszenżyta haploidy oraz podwojone haploidy uzyskuje się najczęściej poprzez androgenezę z wykorzystaniem kultur pylnikowych (Gonzales i in., 1997; Ponitka i in., 1999; Tuveson i in., 2000; Arzani i Darvey, 2002; Ślusarkiewicz-Jarzina i Ponitka, 2003; Wędzony, 2003; Lantos i in., 2014). Androgeniza jest procesem, podczas którego w pylnikach hodowanych na pożywkę następuje zmiana kierunku rozwoju mikrospor wykazujących zdolność do regeneracji roślin. Dotychczas dla podniesienia efektywności indukcji procesu androgenezy i regeneracji zielonych roślin w kulturach pylnikowych pszenżyta stosowano między innymi stresy termiczne przed wyłożeniem pylników na pożywkę, modyfikacje składu pożywek indukujących i regeneracyjnych dotyczące głównie zawartości cukrów, substancji wzrostowych oraz witamin (Sharma i in., 1982; Hassawi i Liang, 1990; Hassawi i in., 1990; Karsai i in., 1994; Ślusarkiewicz-Jarzina i Ponitka, 1997; Ponitka i in., 1999; Immonen i Robinson, 2000; Tuveson i in., 2000; González i Jouve, 2000, 2005; Arzani i Darvey, 2002; Lantos i in., 2014; Ślusarkiewicz-Jarzina i Ponitka, 2014). Androgeniczne rośliny uzyskane metodą kultur pylnikowych najczęściej są haploidami, ale występują również spontanicznie podwojone haploidy lub aneuploidy (Muranty i in., 2002; Warzecha i in., 2005; Oleszczuk i in., 2011; Ponitka i Ślusarkiewicz-Jarzina, 2011). Liczbę chromosomów roślin haploidalnych można podwoić stosując różne związki indukujące, jak kolchicina (Redha i in., 1998; Arzani i Darvey, 2001; Ślusarkiewicz-Jarzina i Ponitka, 2003; Oleszczuk i in., 2004), oryzalina, trifluralin (Wan i in., 1991), czy kofeina (Thomas i in., 1997), przy czym najczęściej stosowana jest kolchicina. W procesie podwajania liczby chromosomów roślin haploidalnych pszenżyta najczęściej prowadzi się kolchicynowanie w warunkach *in vivo*, poprzez zanurzenie haploidalnych roślin zielonych, uzyskanych w wyniku regeneracji struktur androgenicznych otrzymanych bądź z zastosowaniem kultur pylnikowych czy też kultur izolowanych mikrospor, w roztworze kolchicyny o stężeniu 1000 mg/l (Ślusarkiewicz-Jarzina i Ponitka, 2003; Würschum i in., 2012). Z uwagi na toksyczny charakter odczynnika, jego wysokie stężenie oraz stosowane stosunkowo duże objętości, w różnych ośrodkach na świecie podejmowano próby zmian procedury kolchicynowania, polegające na dodawaniu induktora w pierwszych etapach androgenezy i w mniejszym stężeniu; szczególną uwagę zwracano na efektywność otrzymywania roślin zielonych w odniesieniu do liczby wyłożonych pylników lub izolowanych mikrospor, porównując do warunków

kontrolnych, bez stosowania kolchicyny w pierwszych etapach androgenезы. Arzani i Darvey (2001), prowadząc androgenезę metodą kultur pylnikowych, do pożywki MC17 indukującej powstawanie struktur androgenicznych, dodawali kolchicynę w stężeniu 400 mg/l, a także dimetylosulfotlenek (DMSO) w stężeniu 1,5%, przy inkubacji przez 72 godziny; w tych warunkach nie uzyskano zwiększonej liczby roślin DH, ani roślin zielonych, w porównaniu do warunków kontrolnych. Natomiast Würschum i in. (2012), stosując metodę izolowanych mikrospor testowali dodawanie kolchicyny do pożywki indukującej NBP99 w trzech stężeniach, 0,1 mg/l, 0,4 mg/l oraz 2,0 mg/l, odpowiednio przez 24, 48 i 72 godziny. W prowadzonych od lat badaniach własnych, dla otrzymania roślin DH pszenżyta stosowano z dobrymi rezultatami metodą kultur pylnikowych, prowadząc indukcję struktur androgenicznych w pożywce C17, oraz indukcję podwajania liczby chromosomów *in vivo* (Ponitka i Śluskarkiewicz-Jarzina, 2007).

Dla zwiększenia efektywności, obniżenia kosztów, a także ograniczenia ekspozycji badacza na działanie toksycznego związku w roztworze o wysokim stężeniu kolchicyny (1000 mg/l) rozpoczęto prace mające na celu modyfikację stosowanej dotąd metody poprzez dodanie kolchicyny w pierwszym etapie procesu androgenезы do pożywki C17.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem doświadczalnym było 6 ozimych form mieszańcowych pszenżyta (CT 13001, CT 13073, CT 13139, Bo 2526, Bo 2544, Bo 2626) oraz 6 form jarych (M 417, M 437, M 443, TJ 14071, TJ 14074, TJ 14088) pochodzących ze Spółek Hodowli Roślin: DANKO-Choryń i Strzelce.

Rośliny hodowano w szklarni stosując doświetlanie przez 8 godzin/ dobę w temperaturze 22°C w dzień i 17°C w nocy. Ścinano pędy z kłosami zawierającymi pylniki z mikrosporami w stadium jednojądrowym z dużą wakuolą i umieszczano w roztworze mikro- i makroelementów według pożywki N6 (Chu i in., 1975) z dodatkiem auksyny 2,4-D (kwas 2,4 dichlorofenoksyoctowy) w stężeniu 2,0 mg/l, w temperaturze 4°C, przez 6 dni, w ciemności. Pylniki izolowano w sterylnych warunkach i umieszczano w płynnej pożywce C17, indukującej androgenезę (Wang i Chen, 1983), z dodatkiem kolchicyny w stężeniu 0,1 mg/l lub 1,0 mg/l, odpowiednio przez 24, 48 i 72 godziny. Wykładano po około 1500 pylników z każdej formy mieszańcowej (200 pylników na szalki o średnicy 6 cm). Pylniki z pożywki zawierającej kolchicynę przenoszono na pożywkę bez kolchicyny i inkubowano w temperaturze 28°C, w ciemności. Androgeniczne struktury hodowano na pożywce regeneracyjnej 190-2 (Zhuang i Xu, 1983) z dodatkiem kinetyny w stężeniu 1,0 mg/l, w temperaturze 22°C, przy oświetleniu 80–100 $\mu\text{moli fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$ przez 12 godzin. W celu regeneracji roślin wszystkie uzyskane struktury androgeniczne (o średnicy około 2 mm) przekładano po 6 tygodniach kultury na szalki o średnicy 9 cm (po 30 sztuk na szalkę). Poziom ploidalności zielonych roślin pszenżyta ozimego i jarego określano z wykorzystaniem cytometru przepływowego firmy PARTEC. Do badań pobierano fragmenty liści z roślin o wysokości około 15 cm, rosnących w ziemi w kontrolowanych warunkach, w temperaturze 22/17°C, dzień/noc, przy oświetleniu 200 $\mu\text{moli fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$ przez 12 godzin. Poziom indukcji androgenicznych struktur i regeneracji zielonych roślin

określano w stosunku do liczby wyłożonych pylników, w przeliczeniu na 100. Efektywność uzyskiwania roślin o podwojonej liczbie chromosomów oceniano na podstawie badania poziomu ploidalności zregenerowanych roślin z pożywki C17 z kolchicyną, w odniesieniu do pożywki kontrolnej, bez kolchicyny.

WYNIKI

Wpływ zastosowania kolchicyny na indukcję androgenezy i regenerację zielonych roślin

Wykazano niezależnie od genotypu pszenżyta ozimego (tab. 1) oraz jarego (tab. 2) zmniejszenie efektywności indukcji androgenezy oraz regeneracji zielonych roślin wraz ze zwiększeniem stężenia kolchicyny w pożywce C17 (tab. 1 i 2). Na przykład, dla form ozimych traktowanych kolchicyną w stężeniu 0,1 mg/l otrzymano łącznie 3708 struktur i 118 roślin zielonych, natomiast przy zastosowaniu dziesięciokrotnie wyższego stężenia, 1,0 mg/l łącznie otrzymano 2866 androgenicznych struktur i 87 roślin zielonych. Zaobserwowano również, niezależnie od genotypu, spadek efektywności indukcji struktur androgenicznych i regeneracji roślin zielonych ze wzrostem czasu inkubacji pylników w pożywce z kolchicyną, przy czym największy spadek notowano po 72 godzinach (tab. 1).

Tabela 1

Efektywność uzyskiwania androgenicznych struktur, zielonych roślin oraz podwojonych haploidów z 6 mieszańców pszenżyta ozimego na pożywce C17 z dodatkiem kolchicyny
Frequencies of embryo-like structures, green plants and doubled haploids from 6 winter triticales hybrids on C17 medium supplemented with colchicine

Genotyp Genotype	Czas i stężenie kolchicyny Time and concentration colchicine	Liczba pylników No. of anthers	Struktury androgeniczne Androgenic structures		Zielone rośliny — Green plants									
					wszystkie otrzymane total obtained		badane-cytometr — analyzed-cytometer							
			Σ	haploidy haploids			podwojone haploidy doubled haploids		aneuploidy aneuploids					
			L. No.	/100 anthers	L. No.	%	L. No.	L. No.	%	L. No.	%	L. No.	%	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
CT 13001	kontrola — control	200	460	230,0	10	5,0	6	4	66,6	1	16,7	1	16,7	
	24h-0,1mg/l	200	403	201,5	7	3,5	3	2	66,7	1	33,3	-	-	
	24h-1,0mg/l	200	340	170,0	9	4,5	3	2	66,7	1	33,3	-	-	
	48h-0,1mg/l	200	305	152,5	7	3,5	3	1	33,3	2	66,7	-	-	
	48h-1,0mg/l	200	280	140,0	5	2,5	3	1	33,3	2	66,7	-	-	
	72h-0,1mg/l	200	185	92,5	4	2,0	3	1	33,3	2	66,7	-	-	
	72h-1,0mg/l	200	157	78,5	1	0,5	1	0	0	1	100,0	-	-	
	bez kontroli without control	1200	1670	139,2	33	2,8	16	7	43,8	9	56,3	-	-	

c.d. Tabela 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
CT 13073	kontrola — control	210	49	21,0	5	2,4	5	4	80,0	1	20,0	-	-
	24h-0,1mg/l	210	30	14,3	4	1,9	4	2	50,0	2	50,0	-	-
	24h-1,0mg/l	210	52	24,8	4	1,9	4	1	25,0	3	75,0	-	-
	48h-0,1mg/l	210	31	14,8	5	2,4	5	2	40,0	3	60,0	-	-
	48h-1,0mg/l	210	38	18,1	0	0	0	0	0	0	0	-	-
	72h-0,1mg/l	210	17	8,1	0	0	0	0	0	0	0	-	-
	72h-1,0mg/l	210	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
	bez kontroli without control	1260	168	13,3	13	1,0	13	5	38,5	8	61,5	-	-
CT 13139	kontrola — control	220	512	232,7	18	8,1	4	2	50,0	2	50,0	-	-
	24h-0,1mg/l	220	540	245,5	16	7,3	4	2	50,0	2	50,0	-	-
	24h-1,0mg/l	220	265	120,5	9	4,1	4	1	25,0	3	75,0	-	-
	48h-0,1mg/l	220	287	130,5	6	2,7	3	0	0	3	100,0	-	-
	48h-1,0mg/l	220	189	85,9	5	2,3	3	1	33,3	2	66,7	-	-
	72h-0,1mg/l	220	20	9,1	2	0,9	2	0	0	2	100,0	-	-
	72h-1,0mg/l	220	9	4,1	2	0,9	2	0	0	2	100,0	-	-
	bez kontroli without control	1320	1310	99,2	40	3,0	18	4	22,2	14	77,8	-	-
Bo 2526	kontrola — control	200	198	99,0	10	5,0	7	4	57,1	2	28,6	1	14,3
	24h-0,1mg/l	200	203	101,5	11	5,5	7	3	42,9	4	57,1	-	-
	24h-1,0mg/l	200	187	93,5	8	4,0	8	3	37,5	5	62,5	-	-
	48h-0,1mg/l	200	170	85,0	7	3,5	7	3	42,9	4	57,1	-	-
	48h-1,0mg/l	200	100	50,0	5	2,5	5	2	40,0	3	60,0	-	-
	72h-0,1mg/l	200	54	27,0	2	1,0	2	0	0	2	100,0	-	-
	72h-1,0mg/l	200	52	26,0	2	1,0	2	0	0	2	100,0	-	-
	bez kontroli without control	1200	766	63,8	35	2,9	31	11	35,5	20	64,5	-	-
Bo 2544	kontrola — control	220	349	158,6	17	7,7	6	2	33,3	2	33,3	2	33,4
	24h-0,1mg/l	220	408	185,5	15	6,8	6	2	33,3	3	50,0	1	16,7
	24h-1,0mg/l	220	317	144,1	10	4,5	6	1	16,7	4	66,7	1	16,6
	48h-0,1mg/l	220	260	118,2	10	4,5	6	3	50,0	3	50,0	-	-
	48h-1,0mg/l	220	179	81,4	8	3,6	6	2	50,0	4	66,7	-	-
	72h-0,1mg/l	220	98	44,5	7	3,2	5	1	20,0	4	80,0	-	-
	72h-1,0mg/l	220	79	35,9	5	2,3	5	0	0	4	80,0	1	20,0
	bez kontroli without control	1320	1371	103,9	55	4,2	34	7	20,6	22	64,7	3	8,8
Bo 2626	kontrola — control	210	318	151,4	7	3,3	5	2	40,0	2	40,0	1	20,0
	24h-0,1mg/l	210	319	151,9	7	3,3	5	3	60,0	2	40,0	-	-
	24h-1,0mg/l	210	272	129,5	6	2,9	6	1	16,7	4	66,7	1	16,6
	48h-0,1mg/l	210	238	113,3	5	2,4	5	2	40,0	3	60,0	-	-
	48h-1,0mg/l	210	214	101,9	5	2,4	5	1	20,0	4	80,0	-	-
	72h-0,1mg/l	210	140	66,7	3	1,4	3	0	0	3	100,0	-	-
	72h-1,0mg/l	210	136	64,8	3	1,4	3	0	0	3	100,0	-	-
	bez kontroli without control	1260	1319	104,7	29	2,3	27	7	25,9	19	70,4	1	3,7

Σ — wszystkie analizowane rośliny; total plant analyzed

L. — liczba; No. — number

W przypadku badań 6 form jarych pszenżyta, w tabeli 2. przedstawiono wyniki dla 3 form, M 437, M 443 oraz TJ 14071; z trzech pozostałych form, TJ 14088, TJ 14074, M 417 nie udało się zregenerować roślin. W genotypach M 437 oraz M 443 stwierdzono, podobnie jak we wszystkich badanych formach ozimych, spadek efektywności otrzymywania

androgenicznych struktur i zielonych roślin przy wyższym stężeniu kolchicyny (1,0 mg/l) stosowanym przez 72 godziny. Obserwowano wówczas od 84,3 do 184,8 struktur/ 100 pylników (w zależności od genotypu), średnio 120,0 oraz od 2,5 do 15,6 zielonych roślin/ 100 pylników, średnio 6,8 porównaniu z warunkami kontrolnymi (tab. 2).

Tabela 2

Efektywność uzyskiwania androgenicznych struktur, zielonych roślin oraz podwojonych haploidów z 3 mieszańców pszenżyta jarego na pożywce C17 z dodatkiem kolchicyny
Frequencies of embryo-like structures, green plants and doubled haploids from 3 spring triticale hybrids on C17 medium supplemented with colchicine

Genotyp Genotype	Czas i stężenie kolchicyny Time and concentration colchicine	Liczba pylników No. of anthers	Struktury androgeniczne Androgenic structures		Zielone rośliny – Green plants									
					wszystkie otrzymane total obtained	badane-cytometr — analyzed-cytometer								
						Σ	haploidy haploids			podwojone haploidy doubled haploids		aneuploidy aneuploids		
			L. No.	/100 anthers	l. No.	%	L. No.	L. No.	%	L. No.	%	L. No.	%	
M 437	kontrola — control	200	555	277,5	20	10,0	6	4	66,7	2	33,3	-	-	
	24h-0,1mg/l	200	566	283,0	21	10,5	6	2	33,3	3	50,0	1	16,7	
	24h-1,0mg/l	200	487	243,5	15	7,5	6	3	50,0	3	50,0	-	-	
	48h-0,1mg/l	200	409	204,5	16	8,0	6	2	33,3	4	66,7	-	-	
	48h-1,0mg/l	200	377	188,5	13	6,5	5	1	20,0	4	80,0	-	-	
	72h-0,1mg/l	200	258	129,0	9	4,5	5	2	40,0	3	60,0	-	-	
	72h-1,0mg/l	200	182	91,0	5	2,5	5	2	40,0	3	60,0	-	-	
	bez kontroli without control	1200	2279	189,9	79	6,6	33	12	36,4	20	60,6	1	3,0	
M 443	kontrola — control	210	539	256,7	15	7,1	4	3	75,0	1	25,0	-	-	
	24h-0,1mg/l	210	509	242,4	16	7,6	4	2	50,0	2	50,0	-	-	
	24h-1,0mg/l	210	394	187,7	10	4,8	4	3	75,0	1	25,0	-	-	
	48h-0,1mg/l	210	370	176,2	8	3,9	4	3	75,0	1	25,0	-	-	
	48h-1,0mg/l	210	321	152,9	8	3,9	4	3	75,0	1	25,0	-	-	
	72h-0,1mg/l	210	307	146,2	4	1,9	3	1	33,3	2	66,7	-	-	
	72h-1,0mg/l	210	177	84,3	5	2,4	3	1	33,3	2	66,7	-	-	
	bez kontroli without control	1260	2078	164,9	51	4,1	22	13	59,1	9	40,9	-	-	
TJ 14071	kontrola — control	226	810	358,4	39	17,2	15	10	66,7	5	33,3	-	-	
	24h-0,1mg/l	224	785	350,5	45	20,1	16	10	62,5	5	31,3	1	6,2	
	24h-1,0mg/l	224	750	334,8	42	18,8	15	10	66,7	5	33,3	-	-	
	48h-0,1mg/l	224	685	305,8	40	17,9	15	10	66,7	5	33,3	-	-	
	48h-1,0mg/l	224	575	256,7	40	17,9	15	10	66,7	5	33,3	-	-	
	72h-0,1mg/l	224	490	218,8	35	15,6	15	8	53,3	4	26,7	3	20,0	
	72h-1,0mg/l	224	414	184,8	35	15,6	15	8	53,3	4	26,7	3	20,0	
	bez kontroli without control	1344	3699	275,2	237	17,6	91	56	61,5	28	30,8	7	7,7	

Σ — wszystkie analizowane rośliny; total plant analyzed

L. — liczba; No. — number

Łącznie z trzech genotypów jarych, stosując stężenie kolchicyny 0,1 mg/l otrzymano 4379 androgenicznych struktur i 194 rośliny zielone, przy czym po 24 godzinach traktowania kolchicyną otrzymano 1860 struktur i 82 rośliny, po 48 godzinach 1464 struktury i 64 rośliny oraz po 72 godzinach 1055 struktur i 48 roślin. Natomiast przy stężeniu kolchicyny

1,0 mg/l otrzymano łącznie 3677 struktur i 173 rośliny (po 24 godzinach traktowania kolchicyną otrzymano 1631 struktur i 67 roślin, po 48 godzinach 1273 struktury i 61 roślin oraz po 72 godzinach 773 struktury i 45 roślin). Ogółem, na pożywki z kolchicyną z trzech badanych form jarych wyłożono 3804 pylników i uzyskano 8056 androgenicznych struktur (211,7/100 pylników) oraz 367 roślin zielonych (9,7/100 pylników). Natomiast na pożywkę kontrolną bez kolchicyny wyłożono 636 pylników, z których otrzymano 1904 struktury (299/100 pylników) oraz 75 roślin (11,8/100 pylników) (tab. 2).

Wpływ zastosowania kolchicyny na efektywność otrzymywania roślin DH

Badania wpływu kolchicyny w pożywce C17 na efektywność otrzymywania roślin DH wykazały wzrost efektywności otrzymywania roślin DH we wszystkich badanych formach, zarówno ozimych, jak i jarych, przy czym najwyższy procent otrzymanych roślin DH w stosunku do roślin zielonych uzyskano przy zastosowaniu kolchicyny w stężeniu 1,0 mg/l przez 72 godziny. W tabeli 3 zamieszczono wyniki analiz cytometrycznych 172 roślin pszenżyta ozimego i 171 jarego. Wśród 139 roślin zielonych otrzymanych z form ozimych po zastosowaniu kolchicyny w pożywce C17 stwierdzono 66,2% podwojonych haploidów, 30,9% haploidów oraz 2,9% aneuploidów, natomiast pośród 146 regenerantów jarych 55,5% było haploidami, 39% diploidami oraz 5,5% aneuploidami (tab. 3).

Tabela 3

Poziom ploidalności roślin uzyskanych z mieszańców pszenżyta ozimego i jarego oznaczony cytometrycznie

Ploidy level of plants obtained from winter and spring triticale hybrids analyzed using cytometry

Forma pszenżyta Triticale forms	Warunki doświadczenia Experimental conditions	Badane rośliny Analyzed plants	Haploidy Haploids		Podwojone haploidy Doubled haploids		Aneuploidy Aneuploids	
		liczba number	liczba number	%	liczba number	%	liczba number	%
Ogółem ozime Total winter	bez kolchicyny without colchicine	33	18	54,5	10	30,3	5	15,2
	z kolchicyną with colchicine	139	43	30,9	92	66,2	4	2,9
Ogółem jare Total spring	bez kolchicyny without colchicine	25	17	68,0	8	32,0	-	-
	z kolchicyną with colchicine	146	81	55,5	57	39,0	8	5,5

W warunkach kontrolnych bez kolchicyny, zarówno w pszenżycie ozimym jak i jarym uzyskano odpowiednio tylko 30,3% i 32,0% roślin DH. Wśród badanych form jarych, najwięcej podwojonych haploidów w stosunku do roślin zielonych obserwowano przy obu badanych stężeniach, 0,1 oraz 1,0 mg/l kolchicyny przez 72 godziny w formach M 437 i M 443 (odpowiednio 60,0% i 66,7%). Jednak z uwagi na fakt, że w tych warunkach następuje znaczny spadek indukcji struktur androgenicznych i regeneracji zielonych roślin, jako optymalne parametry dla uzyskania roślin DH poprzez zastosowanie kolchicyny w pożywce C17 przyjęto stężenie 1,0 mg/l przez 24 godziny. W tych warunkach notowano niższą efektywność androgenicznych struktur (od 24,8 do 170,0/100 pylników w zależności od genotypu, średnio 113,7) i zielonych roślin (od 2,9 do 4,5/100 pylników w zależności od genotypu, średnio 3,7) w porównaniu z warunkami kontrolnymi (tab. 1 i 2).

Podobne wyniki otrzymano stosując kolchicynę w stężeniu 0,1 mg/l przez 48 godzin (tab. 1 i 2). W tych warunkach notowano od 14,8 do 152,5 struktur/ 100 pylników (w zależności od genotypu), średnio 102,4, oraz od 2,4 do 4,5 zielonych roślin/ 100 pylników, średnio 3,2. Stosując stężenie kolchicyny 1,0 mg/l przez 24 godziny oraz 0,1 mg/l przez 48 godzin obserwowano podwyższenie udziału procentowego podwojonych haploidów wśród zielonych regenerantów wszystkich form ozimych, odpowiednio średnio o 63,2% oraz 82,3%, w porównaniu z warunkami kontrolnymi, w których otrzymano średnio jedynie 31,5% roślin DH.

DYSKUSJA

Badano wpływ stężenia kolchicyny dodanej do pożywki C17 indukującej androgenezę oraz czasu inkubacji pylników w pożywce na efektywność indukcji struktur androgenicznych, regeneracji roślin zielonych oraz otrzymywania roślin DH z 6 ozimych oraz, ostatecznie, z 3 jarych form mieszańcowych pszenżyta. Wykazano znaczne zwiększenie liczby roślin DH u 6 badanych form ozimych i 2 jarych w wyniku zastosowania kolchicyny w pożywce C17. Analizując efektywność uzyskiwania androgenicznych struktur i zielonych roślin ze wszystkich badanych form, wykazano, że wyższe stężenie kolchicyny, 1,0 mg/l, i dłuższy czas traktowania pylników, 72 godz., powodowały około trzykrotne obniżenie indukcji androgenicznych struktur i regeneracji zielonych roślin zarówno w formach ozimych jak i jarych. Natomiast średnia efektywność otrzymywania podwojonych haploidów na pożywce z kolchicyną była trzykrotnie wyższa u form ozimych (przy parametrach 1,0 mg/l, przez 72 godziny) i dwukrotnie wyższa u form jarych (przy wszystkich parametrach) w porównaniu z warunkami kontrolnymi. Jednocześnie, zgodnie z przewidywaniami, na pożywce z dodatkiem kolchicyny zarówno w stężeniu 0,1 mg/l jak i 1,0 mg/l obserwowano obniżenie poziomu indukcji androgenicznych struktur i regeneracji zielonych roślin.

Arzani i Darvey (2001), w doświadczeniach z kolchicyną dodaną w stężeniu 400 mg/l do pożywki indukcyjnej MC17 wykazali dziesięciokrotne zmniejszenie efektywności uzyskiwania zielonych roślin u większości badanych form (z 0,6 do 0,06/100 pylników). Ponadto nie obserwowano podwyższenia liczby roślin DH; wśród 14 badanych form odnotowano średnio tylko 9,0% spontanicznych podwojeń. Würschum i in. (2012), stosując kolchicynę w trzech stężeniach (0,1 mg/l, 0,4 mg/l oraz 2,0 mg/l) przez, odpowiednio 24, 48, i 72 godziny, obserwowali w ciągu pierwszych godzin hodowli mikrospor pszenżyta na pożywce NBP99 (wg Eudes i Amundsen, 2005) podwyższenie efektywności uzyskania zielonych roślin z 48,3% w warunkach kontrolnych do 72% po użyciu kolchicyny w stężeniu 0,4 mg/l przez 24 godzin oraz w stężeniu 0,1 mg/l przez 72 godziny (z 48,3 do 69,5%). Równocześnie obserwowali wzrost procentowy roślin DH, np. z 29,2% na pożywce bez kolchicyny, do 50% przy stężeniu kolchicyny 0,4 mg/l przez 24 godziny.

Sariano i in. (2007) w badaniach prowadzonych w kulturach pylnikowych i kulturach izolowanych mikrospor pszenicy na pożywce MS3M, stanowiącej zmodyfikowaną

pożywkę MS (Hu i Kasha, 1997) wykazali, że zastosowanie kolchicyny podczas pierwszych godzin kultury podwyższyło około trzykrotnie liczbę zregenerowanych zielonych roślin DH w trzech genotypach na cztery badane. Redha i Talaat (2008) stosując kolchicynę również w kulturach pylnikowych pszenicy obserwowali obniżenie liczby androgenicznych struktur u dwóch form na trzy badane: dla formy ICR-4 od 135,4 struktur na pożywe bez kolchicyny do 33,3/ 100 pylników na pożywe z kolchicyną oraz odpowiednio dla formy V-15 od 132,5 do 14,9 struktur/ 100 pylników. Natomiast liczba roślin DH wzrosła w obu formach, odpowiednio od 1,7 i 3,1 do 11,3 i 25,7/ 100 pylników.

Wcześniejsze badania własne (Ślusarkiewicz-Jarzina i Ponitka, 2003; Ponitka i Ślusarkiewicz-Jarzina, 2011; Ślusarkiewicz-Jarzina i in., 2014) wykazały, że efektywność otrzymywania spontanicznie podwojonych haploidów pszenżyta na pożywe C17 bez kolchicyny wynosiła, np. u 7 form ozimych w zależności od genotypu, od 29,6 do 75,9% roślin DH (średnio 57,5%), u 15 form od 17,6 do 80,0% (średnio 38,0%) spontanicznych dihaploidów oraz u 6 form jarych od 17,2 do 55,9% (średnio 35,4%). Również Oleszczuk i in. (2004) w kulturach izolowanych mikrospor pszenżyta odmiany Bogo stwierdzili tylko 30,8% roślin ze spontanicznie podwojoną liczbą chromosomów (w różnych doświadczeniach od 10,0 do 70,0%).

Porównując efektywność uzyskiwania spontanicznie podwojonych haploidów z wynikami prezentowanymi w tej pracy, dotyczącymi efektywności otrzymywania roślin DH pod wpływem kolchicyny w pożywe indukującej androgenezę stwierdzono, że zastosowanie kolchicyny w stężeniach 1,0 mg/l przez 24 godziny oraz 0,1 mg/l przez 48 godzin w kulturach pylnikowych pszenżyta powoduje podwyższenie efektywności otrzymywania roślin DH. Ponadto, ze względów ekonomicznych korzystniejsze jest zastosowanie kolchicyny w pożywe indukującej androgenezę (w stężeniu 0,1 lub 1,0 mg/l), w porównaniu do traktowania roztworem kolchicyny otrzymanych roślin zielonych w warunkach *in vivo* (w stężeniu 1000 mg/l). Jednak aby wiarygodnie ocenić opłacalność stosowania kolchicyny w kulturach pylnikowych, jako technikę alternatywną do kolchicynowania haploidów *in vivo*, autorzy pracy zamierzają wykonać doświadczenia w kilku powtórzeniach wybierając genotypy pszenżyta charakteryzujące się sprawdzoną, wysoką efektywnością indukcji androgenicznych struktur i regeneracji roślin.

WNIOSKI

1. Optymalizacja stężenia kolchicyny i czasu traktowania pylników w płynnej pożywe C17 podwyższyła efektywność uzyskiwania podwojonych haploidów pszenżyta ozimego i jarego
2. W celu obniżenia kosztów uzyskiwania roślin DH pszenżyta należy stosować kolchicynę w pożywe indukującej androgenezę; powoduje to znaczne obniżenie kosztów w porównaniu do metody dotąd stosowanej, polegającej na traktowaniu roztworem kolchicyny roślin zielonych w warunkach *in vivo*, poprzez zanurzenie haploidalnych roślin w roztworze kolchicyny
3. Prezentowane badania są pilotażowe i dlatego autorzy zamierzają przetestować więcej kombinacji stężenia kolchicyny i czasu jej stosowania w pożywe indukującej

androgenezę pszenżyta w celu zoptymalizowania warunków dla uzyskiwania wysokiej efektywności podwojonych haploidów

LITERATURA

- Arzani A., Darvey N. L. 2001. The effect of colchicine on tritcale anther-derived plants: Microspore pre-treatment and haploid-plant treatment using a hydroponic recovery system. *Euphytica* 122: 235 — 241.
- Arzani A., Darvey N. L. 2002. Androgenetic response of heterozygous tritcale populations using a greenhouse hydroponic system. *Euphytica* 127: 53 — 60.
- Chu C. C., Wang C. C., Sun C. S., Hsu C., Yin K. C., Chu C. Y., Bi F. Y. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sinica* 18: 659 — 668.
- Eudes F., Amundsen E. 2005. Isolated microspore culture of Canadian 6x tritcale cultivars. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 82: 233 — 241.
- González J. M., Hernández I., Jouve N. 1997. Analysis of anther culture response in hexaploid tritcale. *Plant Breed.* 116: 302 — 304.
- González J. M., Jouve N. 2000. Improvement of anther culture media for haploid production in tritcale. *Cereal Res. Comm.* 28: 65 — 71.
- González J. M., Jouve N. 2005. Microspore development during in vitro androgenesis in tritcale. *Biol. Plant.* 49: 23 — 28.
- Hassawi D. S., Liang G. H. 1990. Effect of cultivar, incubation temperature, and stage of microspore development on anther culture in wheat and tritcale. *Plant Breed.* 105: 332 — 336.
- Hassawi D. S., Jiahua Q. I., Liang G. H. 1990. Effect of growth regulator and genotype production of wheat and tritcale polyhaploids from anther culture. *Plant Breed.* 104: 40 — 45.
- Hu T., Kasha K. J. 1997. Improvement of isolated microspore culture in wheat (*Triticum aestivum* L.) through ovary culture. *Plant Cell Rep.* 16: 520 — 525.
- Immonen S., Robinson J. 2000. Stress treatment and ficoll for improving green plant regeneration in tritcale anther culture. *Plant Sci.* 150: 77 — 84.
- Karsai I., Bedö Z., Hayes P. M. 1994. Effect of induction medium pH and maltose concentration on in vitro androgenesis of hexaploid winter tritcale and wheat. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 39: 49 — 53.
- Lantos C., Bóna L., Boda K., Pauk J. 2014. Comparative analysis of *in vitro* anther and isolated microspore culture in hexaploid tritcale (x *Triticosecale* Wittmack) for androgenic parameters. *Euphytica* 197: 27 — 37.
- Muranty H., Sourdille P., Bernard S., Bernard M. 2002. Genetic characterization of spontaneous diploid androgenetic wheat and tritcale plants. *Plant Breed.* 121: 470 — 474.
- Oleszczuk S., Sowa S., Zimny J. 2004. Direct embryogenesis and green plant regeneration from isolated microspores of hexaploid tritcale (x *Triticosecale* Wittmack) cv. Bogo. *Plant Cell Rep.* 22: 885 — 893.
- Oleszczuk S., Rabiza-Swider J., Zimny J., Łukaszewski A. J. 2011. Aneuploidy among androgenic progeny of hexaploid tritcale (X *Triticosecale* Wittmack). *Plant Cell Rep.* 30/4: 575 — 586.
- Ponitka A., Ślusarkiewicz-Jarzina A., Wędzony M., Marcińska I., Woźna J. 1999. The influence of various in vitro culture conditions on androgenetic embryo induction and plant regeneration from hexaploid tritcale (x *Triticosecale* Wittm.). *J. Appl. Genet.* 40: 165 — 174.
- Ponitka A., Ślusarkiewicz-Jarzina A. 2007. The effect of liquid and solid medium on production of winter tritcale (x *Triticosecale* Wittm.) anther-derived embryos and plants. *Cereal Res. Comm.* 35: 15 — 22.
- Ponitka A., Ślusarkiewicz-Jarzina A. 2011. Otrzymywanie spontanicznych i indukowanych linii podwojonych haploidów pszenżyta ozimego z wykorzystaniem kultur pylnikowych. *Biul. IHAR* 260: 183 — 191.
- Redha A., Attia T., Büter B., Saisintong S., Stamp P., Schmid J. E. 1998. Improved production of doubled haploids by colchicine application to wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Plant Cell Rep.* 17: 974 — 979.
- Redha A., Talaat A. 2008. Improvement of green plant regeneration by manipulation of anther culture induction medium of hexaploid wheat. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 92: 141 — 146.

- Sharma C. C., Wang W. C., Sapra V. T. 1982. Effect of genotype, media and temperature pretreatment on callus initiation in triticale, wheat and rye anther cultures. *Cereal Res. Comm.* 10: 143 — 150.
- Soriano M., Cistue L., Valles M. P., Castillo A. M. 2007. Effects of colchicine on anther and microspore culture of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 91: 225 — 234.
- Ślusarkiewicz-Jarzina A., Ponitka A. 1997. Effect of genotype and media composition on embryoid induction and plant regeneration from anther culture in triticale. *J. Appl. Genet.* 38: 253 — 258.
- Ślusarkiewicz-Jarzina A., Ponitka A. 2003. Efficient production of spontaneous and induced doubled haploid triticale plants derived from anther culture. *Cereal Res. Comm.* 31: 289 — 296.
- Ślusarkiewicz-Jarzina A., Ponitka A. 2014. Efektywność otrzymywania podwojonych haploidów pszenżyta jarego z wykorzystaniem kultur pylnikowych. *Zeszyty Naukowe UW we Wrocławiu (seria Rolnictwo)* 605: 65 — 74.
- Thomas J., Chen Q., Howes N. 1997. Chromosome doubling of haploids of common wheat with caffeine. *Genome* 40: 552 — 558.
- Turesson S., Liungberg N., Johansson N., Karlsson K. E., Suis L. W., Josset J. P. 2000. Large-scale production of wheat and triticale double haploids through the use of a single-anther culture method. *Plant Breed.* 119: 455 — 459.
- Wan Y., Duncan D. R., Rayburn A. L., Petolino J. F., Widholm J. M. 1991. The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther-derived maize callus. *Theor. Appl. Genet* 81: 205 — 211.
- Wang P., Chen Y. 1983. Preliminary study on production of high of pollen H2 generation in winter wheat grown in the field. *Acta Agron. Sin.* 9: 283 — 284.
- Warzecha R., Sowa S., Salak-Warzecha K., Oleszczuk S., Śliwińska E., Zimny J. 2005. Doubled haploids in production of male sterility maintaining triticale (*xTriticosecale* Wittmack) lines. *Acta Physiol. Plant.* 27: 245 — 250.
- Wędzony M. 2003. Protocol for anther culture in hexaploid triticale (*x Triticosecale* Wittm.). In: Małuszyński M., Kasha K. J., Foster B. P., Szarejko I. (eds). *Doubled Haploid Production in Crop Plants - A Manual*. Kluwer Academic Publishers Dordrecht /Boston/ London, pp: 123 — 128.
- Würschum T., Tucker M. R., Reif J. C., Maurer H. P. 2012. Improved efficiency of doubled haploid generation in hexaploid triticale by *in vitro* chromosome doubling. *BMC Plant Biol.* 12: 109 — 116.
- Zhuang J. J., Xu J. 1983. Increasing differentiation frequencies in wheat pollen callus. In: *Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement*, Science Press. Beijing: 431.

ANDRZEJ KASPERSKI¹**RENATA KASPERSKA**²¹ Wydział Nauk Biologicznych, Katedra Biotechnologii, Uniwersytet Zielonogórski, ul. Szafrana 1
65-516 Zielona Góra² Instytut Inżynierii Bezpieczeństwa i Nauk o Pracy, Uniwersytet Zielonogórski, ul. Szafrana 4
65-516 Zielona Góra

Zastosowanie n-wymiarowej macierzy kropkowej do analizy zmienności genetycznej roślin*

Application of n-dimensional dot-matrix to analysis of plant genetic diversity

Celem pracy jest przedstawienie możliwości wykorzystania nowej metody do analizy zmienności genetycznej organizmów, w tym organizmów o znaczeniu przemysłowym. Zaproponowana metoda działa na dwóch poziomach — na poziomie porównań aminokwasów oraz na poziomie porównań ich kodonów, tj. na poziomie kodu genetycznego. W pracy przedstawiono analizę inhibitorów proteinaz z nasion dyniowatych oraz analizę cytochromu c wybranych roślin uprawnych. Ponadto, za pomocą nowej metody dwupoziomowej analizy zmienności genetycznej otrzymano wyniki, które wykorzystano do interpretacji drzew filogenetycznych zbudowanych dla analizowanych sekwencji.

Słowa kluczowe: n-wymiarowa macierz kropkowa, statystyczna ocena przyrównań, transwersja, tranzycja, zmienność genetyczna

The aim of this study is to present the possibilities of using a new method for genetic variability analysis of organisms, including organisms of industrial use. The proposed method works at two levels — at the amino-acid comparison level and at the amino-acid codon comparison level, i.e. at the genetic code level. The paper presents analysis of proteinase inhibitors from squash seeds and analysis of cytochrome c of selected crops. Moreover, the results obtained using the new method of genetic variability two-level analysis, have been used to interpret the phylogenetic trees constructed for the analyzed sequences.

Key words: n-dimensional dot-matrix, statistical evaluation of alignments, transversion, transition, genetic variation

* Praca przedstawiona na konferencji IHAR — PIB, Zakopane, 3 lutego 2015 roku

WSTĘP

Przyczyną zmienności genetycznej organizmów są mutacje powodujące zmiany w sekwencjach DNA. Powstające różnicowanie genetyczne organizmów, w tym roślin uprawnych, jest istotne m.in. dla odporności danego gatunku na wirusy i bakterie. Ponadto, stopień zmienności genetycznej organizmów informuje o ich przeszłości. Zrozumienie zmienności genetycznej organizmów oraz ich metabolizmu stanowi podstawę optymalnego zaprojektowania procesów biotechnologicznych (Kasperski i in., 2015). Ze względu na złożoność obliczeń, np. podczas oceny interakcji genotypu z biotycznymi i antybiotycznymi czynnikami środowiska w trakcie trwania okresu wegetacji roślin, w komputerowych analizach zmienności często wykorzystywane są metody sztucznej inteligencji, w tym sztuczne sieci neuronowe (Janaszek i in., 2011). Badanie zmienności genetycznej organizmów może zostać wykonane poprzez budowanie drzew filogenetycznych, w których długości gałęzi pokazują rozmiar zmian genetycznych między poszczególnymi taksonami. Analiza drzewa filogenetycznego pozwala poznać pokrewieństwo pomiędzy organizmami oraz lepiej zrozumieć mechanizmy narastania zmienności genetycznej. Do wygenerowania drzew filogenetycznych w komputerowych implementacjach wykorzystywane są metody łączenia sąsiadów (ang. Neighbor Joining, NJ), maksymalnej wiarygodności (ang. Maximum Likelihood, ML), maksymalnej oszczędności (ang. Maximum Parsimony, MP), wnioskowania Bayesowskiego (ang. Bayesian Inference, BI) (Hall, 2008). Wygenerowanie drzewa filogenetycznego jedną spośród metod NJ, ML, MP, BI poprzedzone jest zawsze wzajemnym dopasowaniem sekwencji. Wzajemne dopasowanie sekwencji może zostać wykonane z wykorzystaniem różnych algorytmów oraz ich komputerowych implementacji, np. ClustalW, MUSCLE, ProbCons, T-Coffee. Wybór algorytmu decyduje o uzyskanym dopasowaniu oraz w konsekwencji o długościach gałęzi i topologii drzewa filogenetycznego. Dopasowanie sekwencji zależy także od ustawionych wartości parametrów, w wyniku czego możemy uzyskać wiele dopasowań dla różnych algorytmów i dla różnych ustawień parametrów. Im większa zmienność sekwencji, a w szczególności im większa ilość insercji i delecji, tym większa ilość możliwych dopasowań. Ilość możliwych drzew filogenetycznych zależy w istotny sposób od ilości sekwencji, np. dla 4 taksonów ilość możliwych drzew ukorzenionych jest równa 15, a dla 50 taksonów ilość możliwych drzew ukorzenionych jest większa od ilości atomów we wszechświecie. Teoretycznie wybór najlepszego drzewa wymaga przeanalizowania każdego z możliwych drzew, co w praktyce jest zadaniem niemożliwym do wykonania dla większej ilości sekwencji. W konsekwencji, w praktycznych rozwiązaniach stosowane są różne heurystyki. Reasumując, ze względu na złożoność zagadnienia dokładna rekonstrukcja zmienności genetycznej organizmów poprzez próby określenia rzeczywistych drzew filogenetycznych najczęściej nie jest możliwa. Powoduje to konieczność poszukiwania nowych metod, które pozwolą na wiarygodniejsze określenie zmienności genetycznej organizmów. Zaproponowana w tej pracy metoda bazuje na metodzie macierzy kropkowej. Jedną z zalet metody macierzy kropkowej jest możliwość znalezienia wszystkich możliwych podobieństw reszt przyrównywanych sekwencji. Metoda ta posiada także wady (Xiong, 2006): brak

wiarygodności statystycznej oceny przyrównań, możliwość wykonywania przyrównań sekwencji tylko parami oraz konieczność „ręcznego” łączenia sąsiednich fragmentów identyczności. W niniejszej pracy, poprzez implementację nowej metody pokazano, w jaki sposób można wyeliminować te ograniczenia i uzyskać w pełni funkcjonalną n-wymiarową metodę macierzy kropkowej, która posiada statystyczną ocenę uzyskanych fragmentów identyczności oraz umożliwia automatyczne łączenie sąsiednich fragmentów identyczności.

MATERIAŁ I METODY

Przedstawione w pracy wyniki analizy zostały wykonane dla sekwencji inhibitorów proteinaz z nasion dyniowatych oraz sekwencji cytochromu c wybranych roślin uprawnych. Sekwencje zostały pobrane z wykorzystaniem serwisów internetowych Protein Blast i NCBI oraz informacji zawartych w literaturze (m.in. Leluk, 2000 a) i są dostępne pod adresem <http://www.uz.zgora.pl/~akaspers/pliki/Zakopane2015/sekwencje.txt>.

Wzajemne dopasowanie sekwencji zostało wykonane z wykorzystaniem programu ClustalW (Dereeper i in., 2008; Thompson i in., 1994). Drzewa filogenetyczne zbudowano metodą maksymalnej wiarygodności (ang. Maximum Likelihood, ML), wykorzystując program MEGA6 (Tamura i in., 2013). Inne, ważniejsze metody tworzenia drzew filogenetycznych (w tym metoda ML) zostały szczegółowo opisane np. w książce „Łatwe drzewa filogenetyczne” (Hall, 2008). Do szacowania wiarygodności drzew filogenetycznych wykorzystano metodę samopróbkowania (ang. bootstrap) dla ilości replikacji równej 500.

Algorytm nowej metody dwupoziomowej analizy zmienności genetycznej organizmów został zaimplementowany w języku C# w programie dotPicker działającym pod systemem operacyjnym Windows. Program dotPicker jest dostępny pod adresem <http://www.uz.zgora.pl/~akaspers/others.html>. Algorytm zaproponowanej metody jest rozszerzeniem metody macierzy kropkowej (ang. dot-matrix method) o możliwość m.in. wyszukiwania podobieństw dla więcej niż dwóch sekwencji. Czyszczenie macierzy kropkowej zostało wykonane dla wielkości okna (ang. window size) równej 100 i progu identyczności (ang. identity threshold) równego 10 (Kasperski i Kasperska, 2014). Algorytm n-wymiarowej macierzy kropkowej jest powtarzany dla każdej z sekwencji ustawionej jako pierwsza i pozostałych sekwencji ustawionych w kolejności alfabetycznej (Kasperski i Kasperska, 2012). Współrzędne uzyskanych fragmentów identyczności po każdym kroku algorytmu są zapamiętywane, co umożliwia automatyczne wykrycie i połączenie sąsiednich fragmentów identyczności.

Nowa metoda wykorzystuje podejście semihomologiczne (ang. semihomology approach), które polega na wykrywaniu mutacji jednopunktowych (tj. tranzycji i transwersji) w kodonach porównywanych aminokwasów (Leluk, 1998, 2000 a, 2000 b; Leluk i in., 2001, 2003). W podejściu semihomologicznym wykorzystywany jest trójwymiarowy diagram relacji genetycznych występujących pomiędzy aminokwasami (Leluk i in., 2003). Podejście to umożliwia określenie możliwych mechanizmów zmienności i przebiegu zmienności ewolucyjnej (Kuśka i in., 2005).

Kolejne etapy działania algorytmu nowej metody są następujące:

- a) w pierwszym kroku algorytmu pierwsza sekwencja (ze zbioru rozpatrywanych sekwencji) jest odkładana na osi Y macierzy, a druga sekwencja (ze zbioru rozpatrywanych sekwencji) jest odkładana na osi X. Uruchamiana jest standardowa metoda macierzy kropkowej z dodatkowym wykrywaniem pozycji semihomologicznych (tj. tranzycji i transwersji), w wyniku której otrzymujemy zbiór fragmentów identyczności;
- b) w drugim kroku trzecia sekwencja (ze zbioru rozpatrywanych sekwencji) jest odkładana na osi X macierzy. Standardowa metoda macierzy kropkowej z wykrywaniem pozycji semihomologicznych jest powtarzana dla każdego otrzymanego w pierwszym kroku fragmentu identyczności odkładanego kolejno na osi Y. W rezultacie otrzymujemy zmodyfikowany zbiór fragmentów identyczności;
- c) w ostatnim kroku ostatnia sekwencja (ze zbioru rozpatrywanych sekwencji) jest odkładana na osi X macierzy. Standardowa metoda macierzy kropkowej z wykrywaniem pozycji semihomologicznych jest powtarzana dla każdego otrzymanego w przedostatnim kroku fragmentu identyczności odkładanego kolejno na osi Y. W rezultacie otrzymujemy zmodyfikowany zbiór fragmentów identyczności będący wynikowym zbiorem fragmentów identyczności dla danej sekwencji ustawionej jako pierwsza;
- d) z wynikowego zbioru fragmentów identyczności (tj. zbioru fragmentów identyczności określonego w punkcie c) wybierany jest najlepszy fragment identyczności (zgodnie ze stosowaną w tej pracy oceną fragmentu identyczności);
- e) powyższy algorytm jest powtarzany dla każdej sekwencji (ze zbioru rozpatrywanych sekwencji) odkładanej jako pierwsza na osi Y macierzy.

Stosowana w tej pracy ocena fragmentu identyczności polega na określeniu ilości pozycji dla otrzymanego fragmentu identyczności:

- a) pozycji konserwatywnych typu:
 - "R" — w danej pozycji występują te same aminokwasy,
 - "+" — występuje co najmniej 80% porównań tych samych aminokwasów,
- b) pozycji semikonserwatywnych typu:
 - "#" — w danej pozycji występują tylko porównania tych samych aminokwasów i tranzycje,
 - "@" — występują tylko porównania tych samych aminokwasów, tranzycje i transwersje,
 - "\$" — występują tylko porównania tych samych aminokwasów i transwersje,
 - "*" — występuje co najmniej 80% porównań tych samych aminokwasów, tranzycje i transwersji w danej pozycji.
 - "-" — oznacza pozostałe pozycje z dwupunktowymi lub trójpunktowymi mutacjami.

Najlepsza ocena fragmentu identyczności oznacza kolejno największą liczbę pozycji konserwatywnych (tj. największą sumę pozycji "R" i "+") oraz największą liczbę pozycji semikonserwatywnych (tj. największą sumę pozycji "#", "@", "\$" i "*").

Statystyczną ocenę przyrównań uzyskano poprzez obliczanie współczynnika P_{an} dla każdego otrzymanego fragmentu identyczności. Współczynnik P_{an} obliczany był według wzoru (Kasperski i Kasperska, 2012):

$$P_{an} = \frac{\sum_{k=a}^n \binom{n}{k} x^k (x(x-1))^{n-k}}{x^{2n}}$$

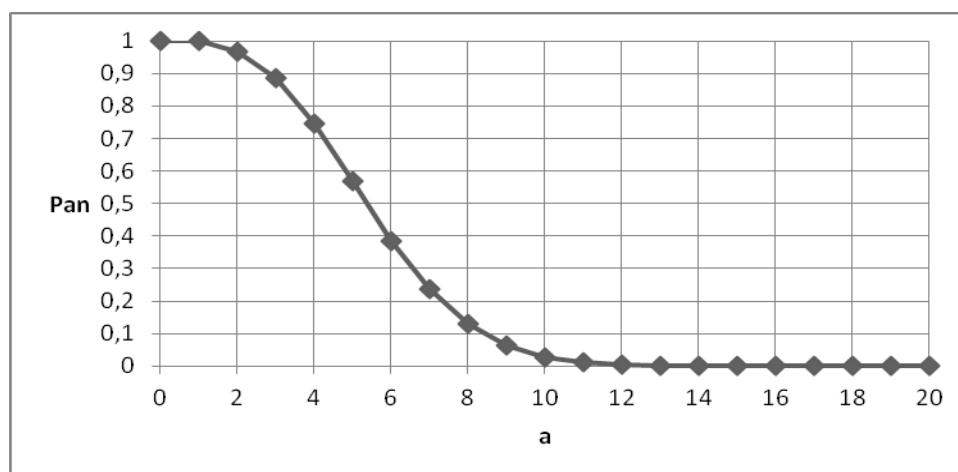
gdzie:

$x = 20$ dla sekwencji aminokwasowych,

n — długość fragmentu identyczności,

a — ilość identycznych pozycji.

Wartość współczynnika P_{an} przyjmuje wartości z przedziału $[0, 1]$ i informuje o losowości danego przyrównania. Wartość $P_{an} = 1$ oznacza, że przyrównanie jest całkowicie losowe, tzn., że otrzymany fragment identyczności jest całkowicie losowy. Wartość $P_{an} = 0$ oznacza, że przyrównanie jest całkowicie nielosowe, tzn., że otrzymany fragment identyczności jest całkowicie nielosowy. Wartość współczynnika P_{an} może zostać obliczona np. z wykorzystaniem programu dotPicker po wybraniu opcji Tools -> Analyser. Na rysunku 1 została przedstawiona przykładowa zależność współczynnika P_{an} od ilości identycznych pozycji (tj. pozycji "a") dla fragmentu identyczności o długości $n = 100$. Zgodnie z rysunkiem 1 wzrost ilości identycznych pozycji powoduje zmniejszanie się współczynnika P_{an} , co świadczy o zmniejszaniu się losowości przyrównania wraz ze wzrostem ilości identycznych pozycji w danym przyrównaniu.



Rys. 1. Przykładowa zależność współczynnika P_{an} od ilości identycznych pozycji
Fig. 1. The exemplary dependence of the P_{an} factor on the number of identical positions

OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

W pracy zostaną zaprezentowane wyniki analizy inhibitorów proteinaz z nasion dyniowatych oraz cytochromu c wybranych roślin uprawnych.

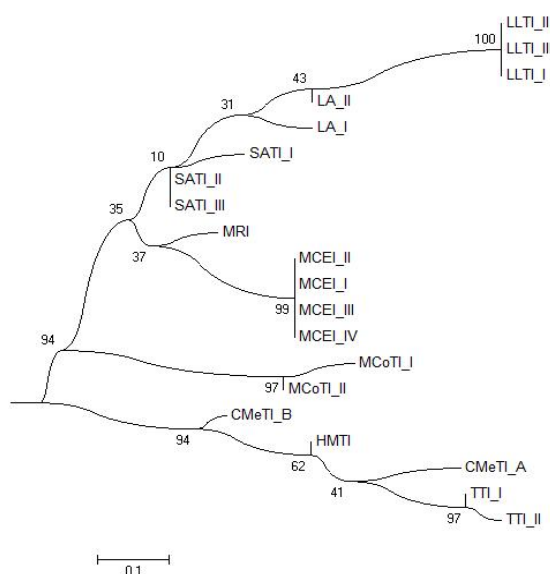
Badanie zmienności proteinaz z nasion dyniowatych

Analizę zmienności genetycznej proteinaz z nasion dyniowatych rozpoczęto od obliczenia logarytmu wiarygodności drzew zbudowanych metodą ML (maksymalnej wiarygodności, ang. Maximum Likelihood) dla tych sekwencji i różnych modeli substytucji aminokwasów (tab. 1). Metoda ML jest metodą statystyczną, umożliwiającą określenie drzewa, którego wiarygodność jest największa (Higgs i Attwood, 2005). Najbardziej wiarygodne drzewo (o największej wartości logarytmu wiarygodności) otrzymano dla modelu WAG (tab. 1).

Tabela 1

Logarytmy wiarygodności drzew ML dla proteinaz z nasion dyniowatych
Logarithms of ML tree likelihoods for proteinase inhibitors from squash seeds

Model substytucji aminokwasów Amino-acid substitution model	Logarytm wiarygodności drzewa Logarithm of tree likelihood
Dayhoffa	-320,29
JTT	-321,59
LG	-328,65
Poissona	-344,29
WAG	-320,14



Rys. 2. Drzewo ML dla inhibitorów proteinaz z nasion dyniowatych, otrzymane dla modelu WAG substytucji aminokwasów

Fig. 2. ML tree for proteinase inhibitors from squash seeds, obtained for the amino-acid substitution WAG model

Drzewo to zostało przedstawione na rysunku 2. W drzewie ML wiarygodności kładów, zawierających sekwencje położone najbliżej korzenia (tj. sekwencje SATI_II i SATI_III), wynoszą odpowiednio: 94%, 35% i 10% (rys. 2). Nie ma reguły, która określałaby minimalną wartość określoną metodą samopróbkowania, aby uznać węzeł za wiarygodny.

W praktyce przyjmuje się, że taką minimalną wartością wiarygodności jest 70% (Higgs i Attwood, 2005). Z tego powodu określenie na podstawie rysunku 2, które sekwencje w rzeczywistości leżą najbliżej korzenia, wymaga dodatkowego sprawdzenia. Uzyskane wyniki sprawdzono wykonując dwupoziomową analizę zmienności genetycznej organizmów. Ustawiając każdą z sekwencji jako pierwszą otrzymano fragmenty identyczności oraz ich oceny, które zostały przedstawione na rysunku 3.

sekwencja ustawiona jako pierwsza	fragment identyczności	ocena fragmentu identyczności
		[R/+/#/@/\$/*/-]
SATI_II	CP@I-+-C**+-DC@-@C@C---G*CG	[11/2/0/4/0/3/7]
SATI_III	CP@I-+-C**+-DC@-@C@C---G*CG	[11/2/0/4/0/3/7]
SATI_I	CP@I-+-C**+-DC@-@C-C-*G*CG	[11/2/0/3/0/4/7]
LA_II	CP@I-+-C*-+-DC@*C@C---G-CG	[11/2/0/4/0/2/8]
LA_I	CP@I-+-C*-+-DC**C@C---G*CG	[11/2/0/3/0/3/8]
CMeTI_B	CP@I-+*C*-+-DC@-C-C-*G*CG	[11/2/0/2/0/4/8]
HMTI	CP@I-+*C*-+-DC@-C-C-*G*CG	[11/2/0/2/0/4/8]
MRI	CP@I-+-C**+-DC@-C-C---G*CG	[11/2/0/2/0/3/9]
MCEI_I	CP*I-+-C**+-DC@-C@C---G-CG	[11/2/0/2/0/3/9]
MCEI_II	CP*I-+-C**+-DC@-C@C---G-CG	[11/2/0/2/0/3/9]
MCEI_III	CP*I-+-C**+-DC@-C@C---G-CG	[11/2/0/2/0/3/9]
MCEI_IV	CP*I-+-C**+-DC@-C@C---G-CG	[11/2/0/2/0/3/9]
CMeTI_A	CP@I-+-C*-+-DC*-C-C-*G*CG	[11/2/0/1/0/4/9]
LLTI_I	CP@I-+-C*-+-DC@-C-C---G-CG	[11/2/0/2/0/1/11]
LLTI_II	CP@I-+-C*-+-DC@-C-C---G-CG	[11/2/0/2/0/1/11]
LLTI_III	CP@I-+-C*-+-DC@-C-C---G-CG	[11/2/0/2/0/1/11]
MCoTI_II	CP-I-\$*C@*+-DC**C@C-*G*CG	[11/1/0/2/1/7/5]
MCoTI_I	CP-I---C@*+-DC**C@C-*G*CG	[11/1/0/2/0/6/7]
TTI_I	CP@I-+-C*-#-DC@-C-C-*G*CG	[11/1/1/2/0/3/9]
TTI_II	CP@I-+-C*-#-DC@-C-C-*G*CG	[11/1/1/2/0/3/9]

Rys. 3. Analiza inhibitorów proteinaz z nasion dyniowatych dla każdej sekwencji ustawionej jako pierwsza

Fig. 3. Analysis of proteinase inhibitors from squash seeds for each sequence put as a first one

Najlepszą ocenę otrzymanych fragmentów identyczności uzyskano dla sekwencji SATI_II i SATI_III ustawionych jako pierwsze. Najlepsza ocena może świadczyć o tym, że sekwencje SATI_II i SATI_III najmniej zmutowały podczas ewolucji w stosunku do pozostałych sekwencji i dlatego ich umieszczenie najbliżej korzenia drzewa jest uzasadnione. Z rysunku 3 wynika także, że największą różnicę w stosunku do pozostałych sekwencji wykazują sekwencje TTI_I i TTI_II, tzn. te sekwencje powinny być umiejscowione w dużej odległości od korzenia drzewa, co jest zgodne z wynikami przedstawionymi na rysunku 2.

Na rysunku 4 przedstawiono przykładową analizę inhibitorów proteinaz z nasion dyniowatych dla sekwencji SATI_II ustawionej jako pierwsza. Wynikowy fragment identyczności CP@I-+-C**+-DC@-@C@C---G*CG jest „zawieszony” w 20-wymiarowej przestrzeni sekwencji. W pozycji 10 uzyskano "@", ponieważ w tej pozycji istnieje 13 homologii (porównania R z R), 4 transwersje (porównania R z L), dwie tranzycje (porównania R z K). W pozycji 13 uzyskano "+", ponieważ w tej pozycji istnieje ponad 80% homologii

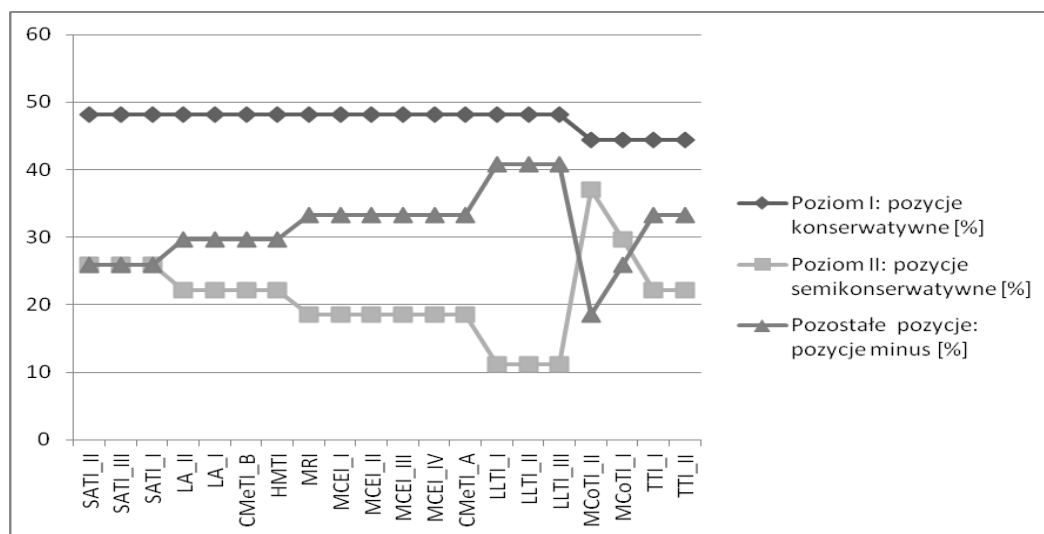
(porównań M z M). W pozycji 16 uzyskano "*", ponieważ w tej pozycji istnieje 15 homologii (porównania K z K), jedna transwersja (porównanie K z Q), dwie tranzycje (porównania K z R), jedna mutacja dwupunktowa (porównanie K z S).

	12345678901234567890123456789012345
SATI_II	----GRICPRILMECKRSDCLAECICQ-SGYCG-
CMeTI_A	-----GICPRILMPCKTDDDCMLDCRCLSNGYCG-
CMeTI_B	-----VGCPRIWMKCKTDRDCLTGCTCKRNGYCG-
HMTI	-----VGCPRIWMKCKTDDDCMLGCKCLSNGYCG-
LA_I	-----ICPRILMECSHSDCFGEICLSSGYCG-
LA_II	-----IRCPRIYMECKHSDCLGECICLESFGYCG-
LLTI_I	----ERRCPRIYMECKHSDCLADCVCLEHGICGG
LLTI_II	----RRCPRIYMECKHSDCLADCVCLEHGICG-
LLTI_III	----ERRCPRIYMECKHSDCLADCVCLEHGICG-
MCEI_I	-----RICPLIWMECKRSDCLAQCIC-VDGHCG-
MCEI_II	-----RICPLIWMECKRSDCLAQCIC-VDGHCG-
MCEI_III	---EERICPLIWMECKRSDCLAQCIC-VDGHCG-
MCEI_IV	--EEERICPLIWMECKRSDCLAQCIC-VDGHCG-
MCoTI_I	SGSDGGVCPKILQRCRRSDCPGACICRGNGYCG-
MCoTI_II	SGSDGGVCPKILKKRRSDCPGACICRGNGYCG-
MRI	-----GICPRILMECKRSDCLAQCVCKRQGYCG-
SATI_I	-----RVCPRILMRCKRSDCLAECTCQGSYCG-
SATI_III	--ERGRICPRILMECKRSDCLAECICQ-SGYCG-
TTI_I	-----CPRIIMPCKVNDCLRGCKCLSNGYCG-
TTI_II	-----CPRIIMPCKVNDCLRGCKCLSNGYCG-
uzyskany fragment	CP@I-+-C**+-DC@-@C@C--G*CG
identyczności	

Rys. 4. Przykładowa analiza inhibitorów proteinaz z nasion dyniowatych dla sekwencji SATI_II ustawionej jako pierwsza

Fig. 4. Exemplary analysis of proteinase inhibitors from squash seeds for the SATI_II sequence put as a first one

Dynamika zmienności proteinaz z nasion dyniowatych została przedstawiona na rysunku 5. Stosunkowo nieduża (poniżej 50%) ilość pozycji konserwatywnych (tj. pozycji typu "R" i "+") oraz duży zakres zmian (od ok. 10% do ok. 40%) pozycji semikonserwatywnych (tj. pozycji typu "#", "@", "\$" i "*") i pozycji Minus ("-") świadczą o dużej zmienności proteinaz z nasion dyniowatych. Jest to wynik zgodny z wynikiem uzyskanym dla drzewa filogenetycznego (rys. 2), dla którego otrzymane dystanse ewolucyjne są również duże (skala drzewa filogenetycznego równa 0,1).



Rys. 5. Dynamika zmienności inhibitorów proteinaz z nasion dyniowatych rozpatrywana na dwóch poziomach

Poziom I: pozycje konserwatywne [%] = $100 * ("R" + "+") / \text{ilość pozycji}$

Poziom II: pozycje semikonserwatywne [%] = $100 * ("R" + "+" + "@" + "$" + "*" + "-") / \text{ilość pozycji}$

Pozycje minus [%] = $100 * ("-") / \text{ilość pozycji}$

Fig. 5. Variability dynamics of proteinase inhibitors from squash seeds considered at two levels

Level I: conservative positions [%] = $100 * ("R" + "+") / \text{number of positions}$

Level II: semiconservative positions [%] = $100 * ("R" + "+" + "@" + "$" + "*" + "-") / \text{number of positions}$

Minus positions [%] = $100 * ("-") / \text{number of positions}$

		[R/+/#/@/\$/*/-]	P _{an}
SATI_III	GRICPRILMECKRSDCLAECICQ-SGYCG	[29/0/0/0/0/0/1]	6.67E-37
SATI_I	R#CPRIILM-CKRSDCLAEC#CQ-SGYCG	[25/0/2/0/0/0/2]	7.40E-29
MRI	ICPRILMECKRSDCLA\$C#C\$- -GYCG	[23/0/1/0/2/0/2]	1.18E-25
LA_I	ICPRILMECK-#DSDC\$E\$CIC\$-SGYCG	[22/0/1/0/3/0/2]	8.65E-24
MCEI_I	RICP\$I\$MECKRSDCLA\$CIC- -G#CG	[22/0/1/0/3/0/3]	3.36E-23
MCEI_II	RICP\$I\$MECKRSDCLA\$CIC- -G#CG	[22/0/1/0/3/0/3]	3.36E-23
MCEI_III	RICP\$I\$MECKRSDCLA\$CIC- -G#CG	[22/0/1/0/3/0/3]	3.36E-23
MCEI_IV	RICP\$I\$MECKRSDCLA\$CIC- -G#CG	[22/0/1/0/3/0/3]	3.36E-23
LA_II	CPRI-MECK#DSDCL\$E\$CIC\$-SG\$CG	[21/0/1/0/3/0/2]	1.38E-22
LLTI_I	R\$CPRI-MECK#DSDCLA\$C#C\$- -G-CG	[20/0/2/0/3/0/4]	7.84E-20
LLTI_II	R\$CPRI-MECK#DSDCLA\$C#C\$- -G-CG	[20/0/2/0/3/0/4]	7.84E-20
LLTI_III	R\$CPRI-MECK#DSDCLA\$C#C\$- -G-CG	[20/0/2/0/3/0/4]	7.84E-20
MCoTI_II	G##CP#IL\$C#RSDC#\$CIC#-#GYCG	[18/0/8/0/3/0/1]	2.32E-16
MCoTI_I	G##CP#IL- -C#RSDC#\$CIC#-#GYCG	[18/0/7/0/2/0/3]	2.32E-16
CMeTI_B	CPRIILM#CK\$D\$DCL##C#C\$-#GYCG	[18/0/5/0/3/0/1]	1.52E-17
HMTI	CPRIILM#CK\$D-DCL-#C\$C\$-#GYCG	[18/0/3/0/3/0/3]	1.52E-17
CMeTI_A	ICPRILM-CK\$D-DC\$-C\$C\$-#GYCG	[18/0/1/0/5/0/4]	3.98E-17
TTI_I	CPRIILM-CK-#-DCL-#C\$C\$-#GYCG	[17/0/3/0/2/0/5]	5.21E-16
TTI_II	CPRIILM-C\$-#-DCL-#C\$C\$-#GYCG	[16/0/3/0/3/0/5]	1.54E-14

Rys. 6. Analiza inhibitorów proteinaz z nasion dyniowatych dla porównania każdej sekwencji z sekwencją SATI_II. Współczynnik P_{an} określa statystyczną ocenę uzyskanych przyrównań

Fig. 6. Analysis of proteinase inhibitors from squash seeds for comparison of each sequence with the SATI_II sequence. The P_{an} factor determines the statistical evaluation of the alignments

Dodatkowe sprawdzenie wykonano dla jednej z sekwencji uznawanej za najbliższej położoną od korzenia, tj. porównując sekwencję SATI_II po kolei ze wszystkimi pozostałymi sekwencjami. Na rysunku 6 przedstawiono wyniki porównania, w kolejności od wyniku mającego ocenę najlepszą do wyniku o najgorszej ocenie. Najmniejszy dystans od sekwencji SATI_II, przy zastosowaniu hipotezy jednopunktowej mutacji, uzyskano dla sekwencji SATI_III, SATI_I i MRI, co jest zgodne również z rysunkiem 2. Ponadto, wyniki przedstawione na rysunku 6 pokazują dużą zgodność zaproponowanego sposobu oceny fragmentów identyczności (wartości podane w nawiasie kwadratowym) z wartością współczynnika P_{an} , który określa ich statystyczną ocenę. Zwiększenie zmienności poszczególnych sekwencji w stosunku do sekwencji SATI_II powoduje zwiększenie współczynnika P_{an} (wyjątek stanowi pozycja oznaczona za pomocą znaku "~").

Badanie zmienności wybranych roślin uprawnych na podstawie analizy cytochromu c

Analizę zmienności genetycznej wybranych roślin uprawnych rozpoczęto od obliczenia logarytmu wiarygodności drzew zbudowanych metodą ML dla cytochromu c i różnych modeli substytucji aminokwasów (tab. 2).

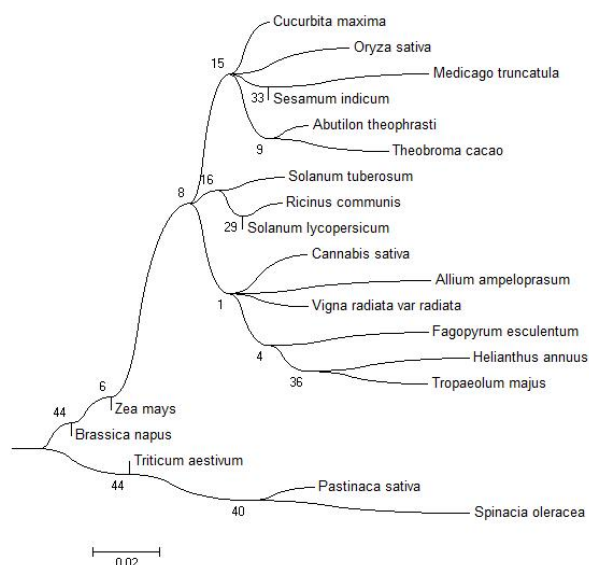
Tabela 2

Logarytmy wiarygodności drzew ML dla cytochromu c wybranych roślin uprawnych
Logarithms of ML tree likelihoods for cytochrome c of selected crops

Model substytucji aminokwasów Amino-acid substitution model	Logarytm wiarygodności drzewa Logarithm of tree likelihood
Dayhoffa	-637,77
JTT	-647,19
LG	-658,64
Poissona	-703,36
WAG	-648,84

Najbardziej wiarygodne drzewo (o największej wartości logarytmu wiarygodności) otrzymano dla modelu Dayhoffa (tab. 2). Drzewo to zostało przedstawione na rysunku 7. Z tabeli 2 i rysunku 7 wynika, że zarówno logarytm wiarygodności otrzymanego drzewa, jak i wiarygodność poszczególnych kładów są stosunkowo małe. Małą wiarygodność kładów (tj. poniżej 50%) dla cytochromu c wybranych roślin uprawnych uzyskiwano zarówno dla modelu Dayhoffa, jak i innych modeli substytucji aminokwasów (tj. dla modeli JTT, LG, Poissona, WAG) oraz dla większych ilości powtórzeń równej 2000 w metodzie samopróbkowania. Mała wiarygodność kładów powoduje konieczność dodatkowego sprawdzenia uzyskanych wyników. Sprawdzenie wyników wykonano wykonując dwupoziomową analizę zmienności genetycznej organizmów.

Ustawiając każdą z sekwencji jako pierwszą otrzymano fragmenty identyczności o ocenach przedstawionych na rysunku 8. Rysunek 8 pokazuje, że podobieństwo pomiędzy sekwencjami jest duże, tzn. ilość pozycji konserwatywnych ("R", "+") jest znacznie większa od ilości pozycji "-", dla każdej sekwencji ustawionej jako pierwsza. Można również zauważyć, że ilość pozycji "\$", jest większa od ilości pozycji "#". Ponadto, ilość pozycji "*" jest większa zarówno od ilości pozycji "\$" (dla *Pastinaca sativa* równa), jak i pozycji "@" (dla *Oryza sativa* równa).



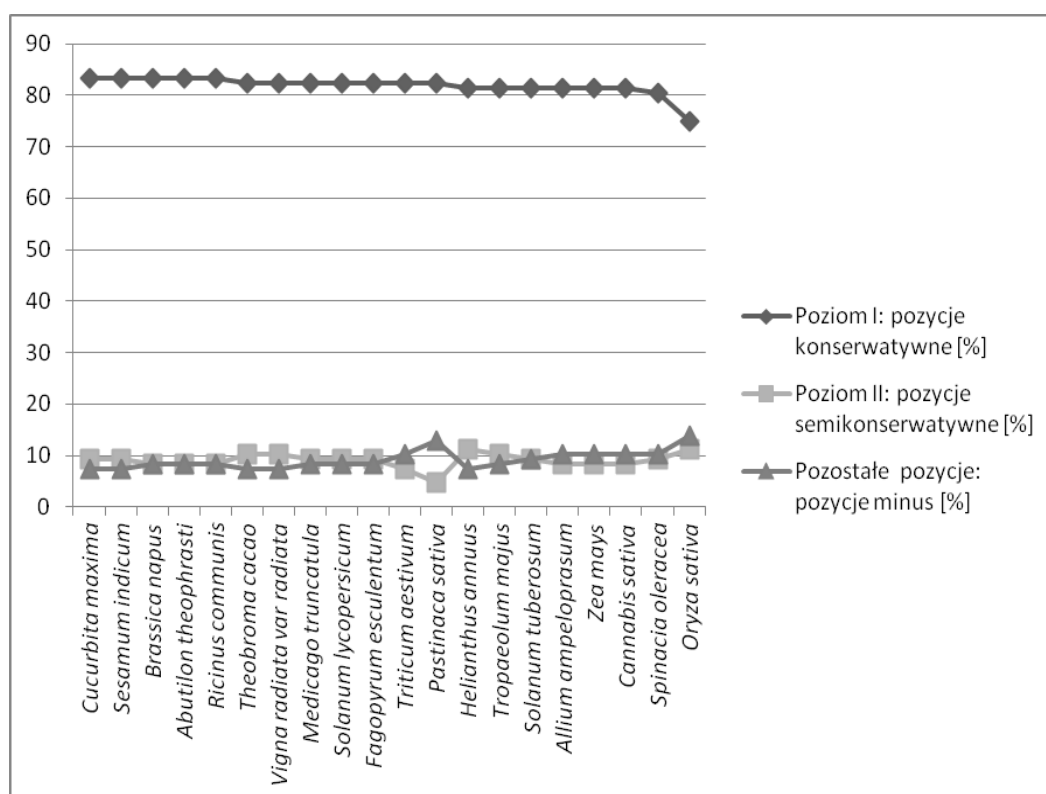
Rys. 7. Drzewo ML dla cytochromu c wybranych roślin uprawnych, otrzymane dla modelu Dayhoffa substytucji aminokwasów

Fig. 7. ML tree for cytochrome c of selected crops, obtained for the amino-acid substitution Dayhoff's model

	[R/ +/#/@/\$/*/-]
<i>Cucurbita maxima</i>	[71/19/0/4/1/5/8]
<i>Sesamum indicum</i>	[71/19/0/2/2/6/8]
<i>Brassica napus</i>	[71/19/0/3/2/4/9]
<i>Abutilon theophrasti</i>	[71/19/0/3/2/4/9]
<i>Ricinus communis</i>	[71/19/0/2/3/4/9]
<i>Theobroma cacao</i>	[71/18/1/3/2/5/8]
<i>Vigna radiata var radiata</i>	[71/18/0/2/3/6/8]
<i>Medicago truncatula</i>	[71/18/1/1/2/6/9]
<i>Solanum lycopersicum</i>	[71/18/0/2/3/5/9]
<i>Fagopyrum esculentum</i>	[71/18/0/2/3/5/9]
<i>Triticum aestivum</i>	[71/18/0/2/2/4/11]
<i>Pastinaca sativa</i>	[71/18/0/1/2/2/14]
<i>Helianthus annuus</i>	[71/17/0/2/4/6/8]
<i>Tropaeolum majus</i>	[71/17/0/2/3/6/9]
<i>Solanum tuberosum</i>	[71/17/0/2/3/5/10]
<i>Allium ampeloprasum</i>	[71/17/1/1/3/4/11]
<i>Zea mays</i>	[71/17/0/3/2/4/11]
<i>Cannabis sativa</i>	[71/17/0/2/3/4/11]
<i>Spinacia oleracea</i>	[71/16/2/1/3/4/11]
<i>Oryza sativa</i>	[71/10/1/4/3/4/15]

Rys. 8. Analiza cytochromu c wybranych roślin uprawnych dla każdej sekwencji ustawionej jako pierwsza

Fig. 8. Analysis of cytochrome c of selected crops for each sequence put as a first one



Rys. 9. Dynamika zmienności wybranych roślin uprawnych na podstawie analizy cytochromu c rozpatrywana na dwóch poziomach

Poziom I: pozycje konserwatywne [%] = $100 * ("R" + "+") / \text{ilość pozycji}$

Poziom II: pozycje semikonserwatywne [%] = $100 * ("#" + "@" + "$" + "*") / \text{ilość pozycji}$

Pozycje minus [%] = $100 * ("-") / \text{ilość pozycji}$

Fig. 9. Variability dynamics of selected crops based on the analysis of cytochrome c considered at two levels

Level I: conservative positions [%] = $100 * ("R" + "+") / \text{number of positions}$

Level II: semiconservative positions [%] = $100 * ("#" + "@" + "$" + "*") / \text{number of positions}$

Minus positions [%] = $100 * ("-") / \text{number of positions}$

Dynamika zmienności wybranych roślin uprawnych, określona na podstawie analizy cytochromu c, została przedstawiona na rysunku 9. Duża ilość (powyżej 70%) pozycji konserwatywnych (tj. pozycji "R" i "+") oraz stosunkowo mała (poniżej 15%) ilość pozycji semikonserwatywnych (tj. pozycji typu "#", "@", "\$" i "*") i pozycji Minus ("-") mogą świadczyć o małej zmienności cytochromu c wybranych roślin uprawnych. Jest to wynik zgodny z wynikiem otrzymanym dla drzewa filogenetycznego (rys. 7), dla którego otrzymane dystanse ewolucyjne są również małe (skala drzewa filogenetycznego równa 0,02).

Dodatkowe sprawdzenie wykonano porównując sekwencję *Bassica napus* (którą można uznać za leżącą najbliżej korzenia na podstawie rysunków 7 i 8) po kolei ze wszystkimi

sekwencjami. Uporządkowane wyniki porównania, od oceny najlepszej do najgorszej, przedstawiono na rysunku 10. Dla tej analizy ilość transwersji (tj. pozycji "\$") przy porównaniu każdej sekwencji z sekwencją *Brassica napus* jest zazwyczaj większa (z trzema wyjątkami dla *Pastinaca sativa*, *Cucurbita Maxima* i *Oryza sativa*) od ilości tranzycji (tj. pozycji "#"). Najmniejszy dystans od sekwencji *Bassica napus* przy zastosowaniu hipotezy jednopunktowej mutacji uzyskano dla sekwencji *Cucurbita maxima*, co jest zgodne z wynikiem przedstawionym na rysunku 8. Rysunki 8 i 10 potwierdzają także dużą odległość sekwencji *Oryza sativa* i *Spinacia oleracea* od korzenia drzewa. Ponadto, wyniki przedstawione na rysunku 10 pokazują dużą zgodność zaproponowanego sposobu oceny fragmentów identyczności (wartości podane w nawiasie kwadratowym) z wartością współczynnika P_{an} , który określa ich statystyczną ocenę. Zwiększenie zmienności poszczególnych sekwencji w stosunku do sekwencji *Brassica napus* powoduje zwiększenie współczynnika P_{an} (z jednym wyjątkiem, który oznaczono za pomocą znaku "~").

	[R/+/#/@/\$/*/-]	P_{an}
<i>Cucurbita maxima</i>	[108/0/1/0/1/0/2]	1.57E-134
<i>Vigna radiata</i> var <i>radiata</i>	[106/0/1/0/3/0/2]	2.18E-129
<i>Zea mays</i>	[103/0/1/0/4/0/4]	3.44E-122
<i>Solanum lycopersicum</i>	[102/0/3/0/5/0/2]	6.74E-120
<i>Solanum tuberosum</i>	[102/0/3/0/4/0/3]	6.74E-120
<i>Triticum aestivum</i>	[102/0/2/0/3/0/4]~	6.33E-121
<i>Ricinus communis</i>	[101/0/1/0/4/0/6]	1.19E-117
<i>Theobroma cacao</i>	[100/0/1/0/8/0/1]	2.23E-117
<i>Tropaeolum majus</i>	[100/0/2/0/5/0/5]	1.90E-115
<i>Sesamum indicum</i>	[100/0/1/0/5/0/6]	1.90E-115
<i>Medicago truncatula</i>	[99/0/2/0/7/0/2]	3.86E-115
<i>Abutilon theophrasti</i>	[99/0/1/0/6/0/6]	2.78E-113
<i>Helianthus annuus</i>	[98/0/2/0/8/0/2]	6.06E-113
<i>Fagopyrum esculentum</i>	[98/0/1/0/7/0/5]	4.91E-112
<i>Cannabis sativa</i>	[98/0/2/0/3/0/9]	3.74E-111
<i>Pastinaca sativa</i>	[97/0/3/0/2/0/10]	4.64E-109
<i>Allium ampeloprasum</i>	[96/0/1/0/6/0/9]	5.35E-107
<i>Spinacia oleracea</i>	[95/0/3/0/5/0/8]	9.17E-106
<i>Oryza sativa</i>	[92/0/3/0/3/0/13]	9.00E-100

Rys. 10. Analiza cytochromu c wybranych roślin uprawnych dla porównania każdej sekwencji z sekwencją *Brassica napus*. Współczynnik P_{an} określa statystyczną ocenę uzyskanych przyrównań
 Fig. 10. Analysis of cytochrome c of selected crops for comparison of each sequence with the *Brassica napus* sequence. The P_{an} factor determines the statistical evaluation of the alignments

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W pracy przedstawiono analizę zmienności genetycznej wybranych organizmów za pomocą nowej metody. W przedstawionej metodzie porównywanie sekwencji następuje na poziomie aminokwasowym i w przypadku, gdy porównywane aminokwasy są różne

następuje automatyczna zmiana poziomu i porównanie danych aminokwasów jest wykonywane na poziomie ich kodonów. Implementacja nowej metody wskazuje na możliwości usunięcia ograniczeń standardowej metody macierzy kropkowej poprzez:

- wprowadzenie sposobu oceny otrzymanych fragmentów identyczności, który jest zgodny ze statystyczną oceną przyrównań, określoną przez współczynnik P_{an} ,
- zaproponowanie algorytmu n-wymiarowej macierzy kropkowej, który rozszerza możliwości standardowej metody macierzy kropkowej o możliwość przyrównania dowolnej ilości sekwencji oraz uwzględnienie podejścia semihomologicznego,
- zapamiętywanie w czasie obliczeń współrzędnych odnalezionych fragmentów identyczności, co umożliwia automatyczne wykrycie i łączenie sąsiednich fragmentów identyczności.

Metoda poprawnie działa zarówno dla dużych zbiorów sekwencji, jak i dla zbiorów sekwencji o niewysokim stopniu podobieństwa. Dla sekwencji o niewysokim stopniu podobieństwa ilość fragmentów identyczności, otrzymywanych po każdym z etapów działania algorytmu, może szybko maleć. W przypadku, gdy ilość fragmentów identyczności zmaleje do zera, konieczna może być m.in. zmiana wartości parametrów, tj. zwiększenie wielkości okna i/lub zmniejszenie progu identyczności w celu zwiększenia ilości otrzymywanych fragmentów identyczności. W przypadku dużych zbiorów sekwencji (tj. powyżej 50) konieczne może być również podzielenie wejściowego zbioru sekwencji na mniejsze podzbiory i rozpatrywanie każdego podzbioru osobno. W przypadku zbiorów sekwencji o dużym stopniu podobieństwa ilość otrzymywanych fragmentów identyczności po każdym z etapów działania algorytmu może być bardzo duża (np. kilkaset), przez co czas obliczeń może być długi. W takim przypadku konieczne może być m.in. zmniejszenie wielkości okna i/lub zwiększenie progu identyczności w celu redukcji ilości otrzymywanych fragmentów identyczności. Zastosowanie dwupoziomowej analizy zmienności genetycznej organizmów ułatwia zrozumienie i interpretację wyników, szczególnie interpretację zmian na poszczególnych pozycjach oraz ocenę otrzymanych fragmentów identyczności w kontekście jednopunktowej mutacji. Zaproponowany sposób określenia charakterystyki zmian (rys. 5 i 9) pozwolił na ocenę dynamiki zmian inhibitorów proteinaz z nasion dyniowatych (duża zmienność) oraz sekwencji cytochromu c wybranych roślin uprawnych (mała zmienność). Dynamiki zmian określone za pomocą przedstawionej metody dwupoziomowej analizy zmienności, są zgodne z wynikami uzyskanymi dla drzew filogenetycznych otrzymanych metodą maksymalnej wiarygodności (rys. 2 i 7).

LITERATURA

- Dereeper A., Guignon V., Blanc G., Audic S., Buffet S., Chevenet F., Dufayard J. F., Guindon S., Lefort V., Lescot M., Claverie J.M., Gascuel O. 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* 36: 465 — 469.
- Hall B. 2008. Łatwe drzewa filogenetyczne. Wydawnictwa Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa.
- Higgs P. G., Attwood T. K. 2005. *Bioinformatics and Molecular Evolution*. Blackwell Publishing Company, Oxford.
- Janaszek M., Mańkowski D. R., Kozdój J. 2011. Sieci neuronowe typu MLP w prognozowaniu plonu jęczmienia jarego. *Biul. IHAR* 259: 93 — 112.
- Kasperski A., Kasperska R. 2012. A novel method of sequence similarity evaluation in n-dimensional sequence space. *Curr. Bioinformatics* 7: 295 — 303.

- Kasperski A., Kasperska R. 2014. Identification of protein family representatives. *Curr. Bioinformatics* 9: 414 — 425.
- Kasperski A., Sun K., Tian Y. 2016. New approach to control of the dissolved oxygen concentration in a biomass-driven self-cycling biochemical process. *Chem. Eng. Commun.* 203 (1): 75 — 93.
- Kuśka J., Leluk J., Lesyng B. 2005. Zmienność mutacyjna w homologicznych rodzinach kinaz. *Bio-Algorithms and Med-Systems* 1 (1/2): 125 — 128.
- Leluk J. 1998. A new algorithm for analysis of the homology in protein primary structure. *Comput. Chem.* 22 (1): 123 — 131.
- Leluk J. 2000 a. Serine proteinase inhibitor family in squash seeds: mutational variability mechanism and correlation. *Cell. Biol. Mol. Lett.* 5: 91 — 106.
- Leluk J. 2000 b. Regularities in mutational variability in selected protein families and the Markovian model of amino acid replacement. *Comput. Chem.* 24(1): 659 — 672.
- Leluk J., Hanus-Lorenz B., Sikorski A. F. 2001. Application of genetic semihomology algorithm to theoretical studies on various protein families. *Acta Biochim. Pol.* 48: 21 — 33.
- Leluk J., Konieczny L., Roterman I. 2003. Search for structural similarity in proteins. *Bioinformatics* 19: 117 — 124.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A. i Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725 — 2729.
- Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673 — 4680.
- Xiong J. 2006. *Essential Bioinformatics*, Cambridge University Press.

KAROLINA KAŻMIŃSKA
ALEKSANDRA KORZENIEWSKA
ANNA SEROCZYŃSKA
GRZEGORZ BARTOSZEWSKI
KATARZYNA NIEMIROWICZ-SZCZYTT

Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Zmienność wybranych cech ilościowych rekombinacyjnych linii wsobnych dyni olbrzymiej (*Cucurbita maxima* Duch.)

Variability of selected quantitative traits in recombinant inbred lines of winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.)

Przeprowadzono ocenę fenotypową populacji dyni olbrzymiej pod względem cech ilościowych takich jak: średnia masa owocu, liczba owoców na roślinę oraz plon handlowy. W eksperymencie wykorzystano populację mapującą składającą się ze 112 rekombinacyjnych linii wsobnych (RIL) pokolenia F₆ dyni olbrzymiej uzyskanych z mieszańca dwóch linii wsobnych 802 × 801 o odmiennym pochodzeniu i skrajnie zróżnicowanych pod względem badanych cech. Doświadczenie polowe założono w układzie losowym w trzech powtórzeniach w 2013 i 2014 roku. Linie rodzicielskie wykazywały istotne statystycznie różnice w odniesieniu do wartości cech. Zakres zmienności cech w populacji mapującej przekraczał wartości cech dla linii rodzicielskich. Zakres zmienności dla średniej masy owocu wynosił od 0,6 kg do 9,0 kg, dla średniej liczby owoców na roślinie od 1,0 do 7,5 (2013) i od 1,0 do 11,5 (2014), dla plonu handlowego (kg/roślinę) 1,7–11,8 (2013) i 1,26–30,0 (2014). Odziedziczalność cech wynosiła 71% dla plonu handlowego, 70% dla średniej masy owoców i 82% dla średniej liczby owoców na roślinę.

słowa kluczowe: dynia olbrzymia, RIL, plon handlowy, ocena fenotypowa

The present study assessed the phenotypes of winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.) population in terms of quantitative traits such as: average fruit weight, number of fruits per plant and marketable yield. Winter squash mapping population, developed by crossing two inbred lines of different origins and extremely diverse in terms of the studied traits, consisting of 112 recombinant inbred lines (RIL) F₆ was used. The field experiments were established in a random arrangement with three replications in the years 2013 and 2014. Parental lines showed statistically significant differences in relation to the value of all the studied traits. Range of variability of all studied traits in the mapping population exceeded the values of parental lines. In case of average fruit weight the range of variation was 0.6–9.0

kg, for the average number of fruits per plant 1.0–7.5 (2013) and 1.0–11.5 (2014). In case of marketable yield, the variation range was 1.7–11.8 kg/plant (2013) and 1.26–30.0 kg/plant (2014). Heritability of the traits was: 71% for marketable yield, 70% for the average fruit weight and 82% for the average number of fruits per plant.

Key words: winter squash, RIL, yield, phenotyping

WSTĘP

Dynia olbrzymia (*Cucurbita maxima* Duch.) jest gatunkiem dobrze przystosowanym do uprawy w polskich warunkach klimatycznych. Może wydawać wysoki plon i nie wymaga zabiegów chemicznej ochrony roślin. Owoce dyni posiadają dużą wartość odżywczą, właściwości dietetyczne oraz lecznicze. Główną zaletą dyni olbrzymiej jest wysoka zawartość związków karotenoidowych w miąższu owoców (Sztangret i in., 2004), co powoduje, że jest warzywem konkurencyjnym w stosunku do marchwi, szczególnie w produkcji ekologicznej. Ponadto gatunek ten cechuje znaczna zawartość cukrowców i suchej masy w owocach (Niewczas i in., 2014; Niewczas i Mitek, 2007), co sprawia, że dynia olbrzymia jest cennym surowcem dla przemysłu przetwórczego. Jednak pomimo wielu zalet dynia olbrzymia jest w Polsce gatunkiem uprawianym na niewielką skalę. Rosnące zainteresowanie dynią olbrzymią związane z wykorzystaniem owoców w przemyśle przetwórczym oraz jako pasza dla zwierząt, generuje potrzebę produkcji nowych wartościowych odmian tego gatunku.

Średnia masa owocu, liczba owoców na roślinę oraz plon to jedne z najważniejszych cech branych pod uwagę w hodowli i uprawie dyni olbrzymiej. Ze względu na ilościowy charakter cechy te podlegają silnej modyfikacji wywołanej przez warunki środowiska. Aby wykluczyć wpływ środowiska, hodowla nowych, bardziej plennych odmian dyni olbrzymiej wymaga selekcji i oceny fenotypowej materiałów wyjściowych w kilku sezonach. Wykorzystanie markerów molekularnych ściśle sprzężonych z *loci* tych cech znacząco skróciłoby proces hodowlany. Dla dyni olbrzymiej nie zidentyfikowano do tej pory *loci* cech ilościowych QTL (Quantitative Trait Loci, *loci* cechy ilościowej) związanych z plonem i masą owoców. Identyfikacja QTL wymaga oceny fenotypowej i genotypowej populacji uzyskanej w wyniku skrzyżowania linii rodzicielskich o skrajnych wartościach badanej cechy. Wybór typu, wyprowadzenie oraz ocena fenotypowa populacji w odpowiednio zaplanowanym doświadczeniu są kluczowymi etapami w identyfikowaniu QTL.

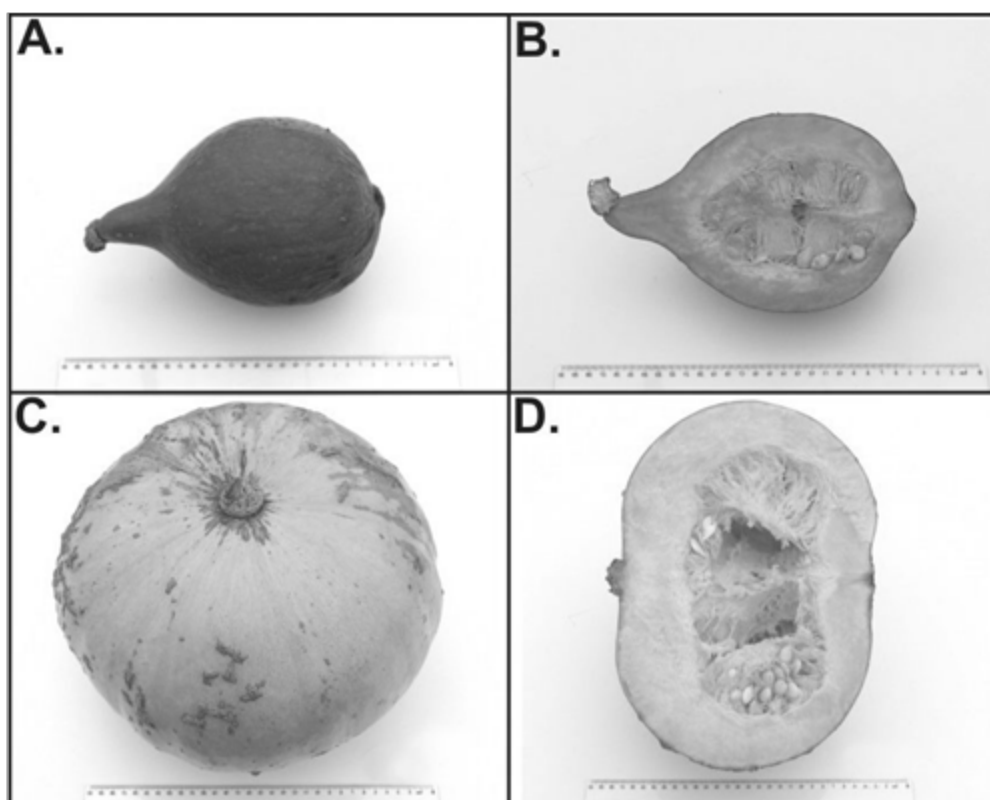
Rekombinacyjne linie wsobne (RIL) są liniami homozygotycznymi, mogą więc być testowane w wielu powtórzeniach oraz poddawane wpływom różnych czynników środowiskowych. Wysoka zmienność genetyczna w populacji RIL pozwala na wykrycie genetycznych interakcji pomiędzy poszczególnymi *loci*. Z tego względu linie RIL znalazły zastosowanie w analizach cech ilościowych prowadzących do identyfikacji QTL (Harel-Beja i in., 2010; Ashrafi i in., 2011; Ren i in., 2014).

Celem prezentowanej pracy była ocena fenotypowa populacji dyni olbrzymiej składającej się ze 112 linii RIL pod względem cech ilościowych jak: średnia masa owocu, liczba owoców na roślinę oraz plon handlowy. Praca stanowi kontynuację zadania

badawczego „Identyfikacja *loci* cech ilościowych związanych z zawartością związków karotenoidowych i suchej masy w owocach dyni olbrzymiej” nr PBZ-MNiSW-2/3/2006/34 realizowanego w ramach projektu „Nowe metody genetyki molekularnej i genomiki służące doskonaleniu odmian roślin uprawnych” i umożliwi skonstruowanie mapy genetycznej oraz identyfikację QTL u dyni olbrzymiej.

MATERIAŁY I METODY

W eksperymencie wykorzystano populację mapującą składającą się ze 112 rekombinacyjnych linii wsobnych (RIL) pokolenia F₆ dyni olbrzymiej powstałych w wyniku samozapylenia mieszańca 802 × 801. Formami rodzicielskimi były dwie linie wsobne o odmiennym pochodzeniu, skrajnie zróżnicowane pod względem badanych cech w tym cech związanych z owocami (rys. 1).



Rys. 1. Owoce linii rodzicielskich populacji mapującej. A i B owoce linii 802 (linia mateczna). C i D linia 801 (linia ojcowska)

Fig. 1. Fruits of the parental lines of mapping population. A and B line 802 (maternal line) C and D line 801 (paternal line)

Doświadczenia polowe założono w układzie losowym, w trzech powtórzeniach (6 roślin w powtórzeniu) na polu doświadczalnym Katedry Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin SGGW 'Wolica' w latach 2013 i 2014. Średnie miesięczne wartości temperatury i opadów przedstawiono w tabeli 1. Nasiona badanych linii wysiewano do gruntu 15 maja, w rozstawie: 1 m w rzędzie i 1,6 m pomiędzy rzędami. Zbiór owoców przeprowadzano w pierwszej dekadzie września. Do oceny plonowania wybierano owoce wyrośnięte, fizjologicznie dojrzałe i zdrowe. Określono liczbę owoców na roślinie, średnią masę owoców oraz średni plon handlowy. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie przy użyciu programu STATISTICA 10 (Statsoft Inc., USA). Jednoczynnikową analizę wariancji wykonano przy pomocy programu ANOVA. Szczegółowego porównania średnich dokonano za pomocą testu Tukeya przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Odziedziczalność w szerokim sensie obliczono według Singh i Ceccarelli (1995).

Tabela 1

Średnie miesięczne wartości temperatury powietrza (°C) oraz wartości opadów (mm) w porównaniu do średniej wieloletniej; Stacja Ursynów-SGGW
Average monthly air temperature (°C) and the rainfall (mm) compared to the long-term average; Station Ursynów-SGGW

Miesiąc Month	Temperatura (°C) Temperature (°C)			Opady (mm) Rainfall (mm)		
	2013	2014	średnia wieloletnia 1971–2010 long-term average 1971–2010	2013	2014	średnia wieloletnia 1971–2010 long-term average 1971–2010
Maj — May	15,6	14,4	14,1	120,0	80,6	76,2
Czerwiec — June	18,7	16,3	17,3	86,4	63,8	71,8
Lipiec — July	20,8	21,1	21,0	0,8	100,1	88,4
Sierpień — August	19,2	18,3	19,2	99,0	70,8	83,8
Wrzesień — September	12,2	15,0	13,5	96,6	7,0	60,2

WYNIKI I DYSKUSJA

Linie rodzicielskie wykazywały istotne statystycznie różnice w odniesieniu do wartości badanych cech ilościowych: średnia masa owocu, liczba owoców na roślinie oraz plon handlowy. Zakres zmienności cech w populacji mapującej przekraczał wartości dla linii rodzicielskich, co może wskazywać na wystąpienie zjawiska transgresji. W przypadku średniej masy owoców zakres zmienności wynosił od 0,6 kg do 9,0 kg w obydwu latach badań, a średnia ogólna cechy kształtowała się na poziomie 2,64 kg (2013) i 2,99 kg (2014) (tab. 2, rys. 2). Dla średniej liczby owoców na roślinie zakres zmienności wynosił od 1,0 do 7,5 (2013) i 1,0 do 11,5 (2014), przy średniej ogólnej wynoszącej 2,3 (2013) i 3,48 (2014) (tab. 2, rys. 2). W przypadku plonu handlowego (kg/roślinę) zakres zmienności wynosił 1,7–11,8 (2013) i 1,26–30,0 (2014) przy średniej ogólnej 5,14 (2013) i 8,96 (2014) (tab. 2, rys. 2). Istotnie najwyższym plonem handlowym charakteryzowały się linie 1568 (2013) i 1534 (2014), natomiast najniższym linie 1521 i 1517 (2013) oraz 1587 (2014). Znaczne różnice w wartości cech pomiędzy poszczególnymi latami mogą wynikać z istotnych różnic średnich temperatur oraz różnic w ilości opadów. W roku 2013 wysoka

ilość opadów w maju spowodowała zasklepienie gleby i utrudnione kiełkowanie nasion a długotrwała susza panująca w lipcu zahamowała wzrost roślin i ich kwitnienie, odbijając się negatywnie na wysokości plonu (tab. 1). Natomiast rok 2014 odznaczał się bardzo dobrymi warunkami atmosferycznymi dla wzrostu i plonowania dyni zarówno pod względem temperatur, jak i ilości opadów (tab. 1).

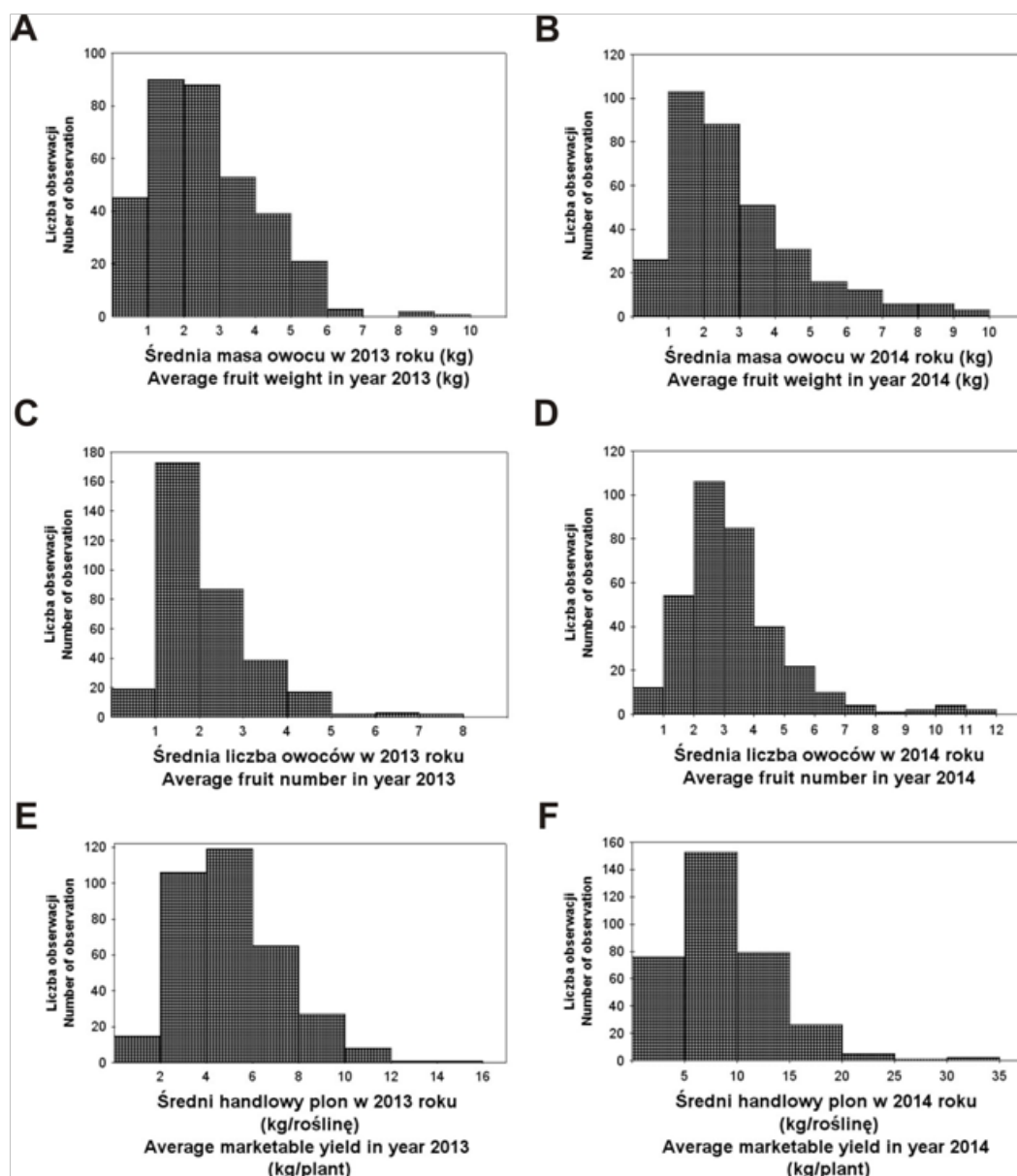
Tabela 2

Średnie wartości badanych cech ($\pm$ odchylenie standardowe) dla linii rodzicielskich oraz zakres ich zmienności w populacji mapującej 802 $\times$ 801, w latach 2013 i 2014
Average values of studied traits ($\pm$ standard deviation) for parental lines and the range of their variation in mapping population 802 $\times$ 801, in years 2013 and 2014

Cecha Trait	Wartość cechy dla linii rodzicielskich Value of trait for parental lines:				Zakres zmienności w populacji mapującej (112 linii RIL F ₆) Range of variation in mapping population (112 RIL F ₆ lines)		Średnia wartość cechy Average value of trait	
	linia mateczna (802) maternal line (802)		linia ojcowska (801) paternal line (801)					
	2013	2014	2013	2014	2013	2014	2013	2014
Średnia masa owocu (kg) Average fruit weight (kg)	1,1 $\pm$ 0,4	1,6 $\pm$ 0,3	4,9 $\pm$ 2,4	8,4 $\pm$ 2,8	0,6-9,0	0,6-9,0	2,64 $\pm$ 1,5	2,99 $\pm$ 1,8
Średnia liczba owoców Average fruit number	3,7 $\pm$ 0,2	4,3 $\pm$ 0,8	1,6 $\pm$ 0,3	2,2 $\pm$ 0,0	1,0-7,5	1,0-11,5	2,3 $\pm$ 1,1	3,48 $\pm$ 1,8
Średni plon (kg/roślinę) Average yield (kg/plant)	4,3 $\pm$ 0,1	6,7 $\pm$ 1,5	7,7 $\pm$ 1,2	18,2 $\pm$ 0,8	1,7-11,8	1,26-30,0	5,14 $\pm$ 2,3	8,96 $\pm$ 4,8

Niewielkie odchylenia od rozkładu normalnego (rys. 2) mogą być spowodowane utratą niektórych linii w trakcie kolejnych samozapyleń w procesie otrzymywania linii RIL. Ze względu na sterylność niektórych linii bądź bardzo późny termin kwitnienia nie było możliwe ich samozapylenie i uzyskanie nasion.

Odziedziczalność cech wynosiła 71% dla plonu handlowego, 70% dla średniej masy owoców i 82% dla średniej liczby owoców na roślinie. Uzyskane wyniki wskazują na wysoki udział zmienności genetycznej w całkowitej zmienności wszystkich badanych cech. Znaczny wpływ zmienności środowiskowej (18–30%) w przypadku badanych cech wskazuje jednak na potrzebę bardziej precyzyjnego oznaczenia współczynnika odziedziczalności. Zalapa i in. (2006) badając odziedziczalność w szerokim sensie cech u melona otrzymali porównywalne wyniki dla liczby owoców na roślinie (80%) natomiast dla średniej masy owocu otrzymali znacznie wyższą odziedziczalność wynoszącą 89%. Różnice w uzyskanych wynikach mogą być spowodowane specyfiką gatunku i co za tym idzie różną liczbą genów warunkujących badaną cechę lub też mogą wynikać z wykorzystania różnego typu populacji.



Rys. 2. Rozkład wartości dla średniej masy owocu (A i B), średniej liczby owoców na roślinie (C i D) oraz plonu handlowego (E i F) w populacji mapującej 802 × 801, w latach 2013 i 2014. Obserwacje reprezentują wartości średnie dla linii RIL (dla trzech powtórzeń)

Fig. 2. Distribution of values for average fruit weight (A and B), average fruit number per plant (C and D) and marketable yield (E and F) in mapping population 802 × 801, in years 2013 and 2014. Observations represent average value for RIL lines (for three replications)

Praca stanowi pierwszą ocenę fenotypową populacji mapującej dyni olbrzymiej pod względem cech związanych z plonem. Jak do tej pory nie zidentyfikowano QTL związanych z plonem dla tego gatunku. Prace nad oceną fenotypową populacji dyni olbrzymiej będą poszerzone o takie cechy jak: zawartość suchej masy, związków karotenoidowych oraz cukrowców w miąższu owoców, grubość miąższu, procentowy udział gniazda nasiennego oraz masa 1000 nasion. Szczegółowa ocena fenotypowa populacji mapującej pozwoli na identyfikację genów i QTL zaangażowanych w genetyczną kontrolę wielu cech na mapie genetycznej i umożliwi tworzenie nowych wartościowych odmian dyni olbrzymiej.

WNIOSKI

1. Populacja RIL charakteryzowała się wysoką zmiennością pod względem średniej masy owoców, liczby owoców na roślinę oraz plonu handlowego owoców. Umożliwi to precyzyjną lokalizację QTL na mapie genetycznej dyni olbrzymiej.
2. Wartość współczynnika odziedziczalności w szerokim sensie była wysoka, co wskazuje na duży udział zmienności genetycznej w zmienności fenotypowej badanych cech.
3. Zakres zmienności badanych cech w populacji przekraczał wartości cech dla linii rodzicielskich, co może wskazywać na wystąpienie zjawiska transgresji.

LITERATURA

- Ashrafi H., Kinkade M. P., Merk H. L., Foolad M. R. 2011. Identification of novel quantitative trait loci for increased lycopene content and other fruit quality traits in a tomato recombinant inbred line population. *Mol. Breed.* 30: 549 — 567.
- Harel-Beja H., Tzuri G., Portnoy V., Lotan-Pompan M., Lev S., Cohen S., Dai N., Yeselson L., Libhaber S. E. 2010. A genetic map of melon highly enriched with fruit quality QTLs and EST markers, including sugar and carotenoid metabolism genes. *Theor. Appl. Genet.* 121: 511 — 533.
- Niewczas J., Mitek M., Korzeniewska A., Niemirowicz-Szczytt K. 2014. Characteristics of selected quality traits of novel cultivars of pumpkin (*Cucurbita maxima* Duch.). *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 64: 101 — 107.
- Niewczas J., Mitek M. 2007. The storage influence on selected chemical composition parameters of new varieties of the winter squash (*Cucurbita maxima*). *Żywn.- Nauk. Technol. Ja.* 5 (54) Suppl.: 155 — 164.
- Ren Y., McGregor C., Zhang Y., Gong G., Zhang H., Guo S., Sun H., Cai W., Zhang J., Xu Y. 2014. An integrated genetic map based on four mapping populations and quantitative trait loci associated with economically important traits in watermelon (*Citrullus lanatus*). *BMC Plant Biol.* 14:33.
- Sigh M., Ceccarelli S. 1995. Estimation of heritability using variety trials data from incomplete blocks. *Theor. Appl. Genet.* 90: 142 — 145.
- Sztangret J., Korzeniewska A., Horbowicz M., Niemirowicz-Szczytt K. 2004. Comparison of fruit yields and carotenoids content in new winter squash hybrids (*Cucurbita maxima* Duch.). *Veget. Crop Res. Bull.* 61: 51 — 60.
- Zalapa J. E., Staub J. E., McCreight D. 2006. Generation means analysis of plant architectural traits and fruit yield in melon. *Plant Breed.* 125: 482 — 487.

RENATA SŁOMNICKA
ADRIANNA PIETLUCH
JUSTYNA ŁĘCZYCKA
ANNA DORACZYŃSKA
ALEKSANDRA KORZENIEWSKA
HELENA OLCZAK-WOLTMAN
KATARZYNA NIEMIROWICZ-SZCZYT
GRZEGORZ BARTOSZEWSKI

Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Identyfikacja markerów SSR przydatnych do konstrukcji mapy genetycznej i mapowania genów odporności na kanciastą plamistość liści ogórka (*Cucumis sativus* L.)*

Identification of SSR markers useful for construction of genetic map and mapping of angular leaf spot resistance genes in cucumber (*Cucumis sativus* L.)

W pracy podjęto próbę identyfikacji markerów SSR użytecznych do konstrukcji mapy genetycznej ogórka dla populacji mapującej 110 rekombinacyjnych linii wsobnych (RIL). Populację uzyskano z krzyżowania amerykańskiej linii Gy14 wykazującej tolerancję na bakteryjną kanciastą plamistość z polską linią B10 wrażliwą na tę chorobę. Analiza bioinformatyczna zróżnicowania sekwencji *loci* mikrosatelitarnych pozwoliła wskazać markery SSR potencjalnie przydatne do mapowania w tej populacji. Wytypowano 222 markery SSR, spośród których 160 przetestowano na liniach rodzicielskich i wybranych RIL. Potwierdzono polimorfizm dla 103 markerów SSR (64,4%), zaś dla 52 z nich wykazano przydatność do konstrukcji mapy genetycznej populacji Gy14 × B10 i mapowania genów odporności na kanciastą plamistość liści ogórka. Wstępnie wskazano, że marker SSR00398 zlokalizowany na chromosomie 5 może być sprzężony z genem odporności na tę chorobę.

Słowa kluczowe: *Cucumis sativus*, kanciasta plamistość ogórka, markery SSR, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*

The aim of this study was identification of SSR markers useful for construction of genetic map of cucumber population that consists of 110 recombinant inbred lines (RILs). RILs population

* Praca była dofinansowana przez MRiRW

segregating for angular leaf spot (ALS) resistance was developed by crossing two inbred lines, an American line Gy14 showing tolerance for angular leaf spot and a Polish line B10, susceptible to this disease. A set of SSR markers was preliminary examined for polymorphism using bioinformatic analysis. There were 222 selected SSR markers and 160 of them were further tested on parental lines and chosen RILs. The polymorphism was confirmed for 103 (64.4%) SSR markers. Fifty two SSR markers were found to be useful for construction of genetic map of cucumber population Gy14 × B10 and further mapping of angular leaf spot resistance genes. Preliminary results suggest that SSR00398 located on chromosome 5 may be linked to angular leaf spot resistance gene.

Key words: *Cucumis sativus*, angular leaf spot (ALS), SSR markers, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*

WSTĘP

Ogórek (*Cucumis sativus* L.) jest obok melona najlepiej poznanym gatunkiem należącym do rodziny *Cucurbitaceae*, wykorzystywanym jako roślina modelowa w badaniach determinacji płci (Malepszy, Niemirowicz-Szczytt, 1991; Tanurdzic, Banks, 2004), biologii naczyniowej (Lough, Lucas, 2006) oraz reakcji na stresy biotyczne i abiotyczne (Hammerschmidt 1999a,b). Ogórek jest jednocześnie ważnym gospodarczo i ekonomicznie warzywem, uprawianym w ponad 80 krajach na świecie (Adhikari i in., 2012), a jego roczną produkcję szacuje się na ponad 66 milionów ton, w tym około 500 tysięcy ton produkuje się w Polsce (<http://faostats.fao.org>). Duże znaczenie ogórka w Polsce powoduje, że prowadzone są krajowe programy hodowlane, dla których istotne jest poszukiwanie nowych źródeł odporności na choroby i stresy abiotyczne, a także identyfikacja markerów molekularnych przydatnych do selekcji (Olczak-Woltman i in., 2007). W ostatnich latach poznana została sekwencja genomu ogórka (Huang i in., 2009 — linia 9930, Wóycicki i in., 2011 — linia B10, Phytozome v8.0 — linia Gy14), opublikowano kilka zagęszczonych map genetycznych (Ren i in., 2009; Miao i in., 2011; Yang i in., 2012), jak również scharakteryzowano geny odporności R, kodujące białka NBS-LRR (Wan i in., 2013; Yang i in., 2013). Pomimo zsekwencjonowania genomu ogórka i licznych prac genomicznych wiedza na temat tego gatunku w kontekście reakcji odpornościowej na bakterię *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* będącą sprawcą kanciastej plamistości liści ogórka jest niepełna. Jak dotychczas opracowano około 30 map genetycznych ogórka, głównie dla populacji mapujących wyprowadzonych z linii amerykańskich, indyjskich czy też chińskich (Ren i in., 2009; Miao i in., 2011; Yang i in., 2012). Nie skonstruowano jednak zaawansowanej mapy genetycznej dla polskich linii lub odmian, przystosowanych do uprawy w klimacie środkowoeuropejskim. Opracowane mapy posłużyły do zmapowania genów warunkujących ważne cechy użytkowe (Miao i in., 2011), jednak nie zidentyfikowano jak dotychczas genów warunkujących odporność na kanciastą plamistość liści ogórka. Próby zidentyfikowania markerów molekularnych sprzężonych z tymi genami umożliwiły wskazanie markera RAPD OP-AO07, jednakże marker ten był w odległości 13cM od locus związanego z genem odporności (Olczak-Woltman i in., 2009). Celem pracy była identyfikacja markerów SSR przydatnych do konstrukcji mapy genetycznej ogórka oraz mapowania genów odporności na tę chorobę z wykorzystaniem populacji RIL Gy14 × B10. Konstrukcja takiej mapy przyczyni się do

identyfikacji markerów molekularnych genów odporności na kanciąstą plamistość liści ogórka, które pozwoliłyby na prowadzenie selekcji pożądanych roślin już we wczesnych etapach hodowli.

MATERIAŁ I METODY

W badaniach wykorzystano populację mapującą RIL-F₅, w skład której wchodziło 110 rekombinowanych linii wsobnych. Nasiona linii Gy14 i F₁ z krzyżowania Gy14 × B10 uzyskano od Prof. M. J. Havey (University of Wisconsin, Madison, WI, USA). Wypróbowanie linii z pojedynczych F₂ wykonano w tunelach na Polu Doświadczalnym Katedry Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin 'Wolica'. Linie rodzicielskie charakteryzowały się zróżnicowaną reakcją odpornościową na bakteryjną kanciąstą plamistość — linia Gy14 wykazywała tolerancję na kanciąstą plamistość, zaś linia B10 była wrażliwa na tę chorobę (Olczak-Woltman i in., 2008). Testy patogeniczności przeprowadzono na dwutygodniowych roślinach ogórka w fazie dwóch liści, zgodnie z metodyką opracowaną przez Olczak-Woltman i in. (2008). W obrębie każdej linii rekombinacyjnej testowano 16 roślin (4 powtórzenia i 4 rośliny w każdym powtórzeniu). Do przygotowania inokulumu użyto wirulentny izolat *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* 814/98 (OD₆₀₀ = 0,05; 1×10⁷ CFU/ml). Inokulum nanoszono od dolnej strony liści za pomocą ręcznego opryskiwacza. Podczas trwania testu zachowywano 16 h fotoperiod. Temperatura w ciągu dnia wynosiła 25°C, a w nocy 22°C. W celu zwiększenia względnej wilgotności powietrza do 95–100% rośliny nakrywano tunelikami foliowymi oraz wyłączano światło na 24 h bezpośrednio po inokulacji roślin. Ocenę stopnia porażenia roślin, w oparciu o dwa porażone liście, dokonano po 7 dniach od inokulacji używając 9-stopniowej skali bonitacyjnej wzorowanej na skali Jenkins i Wehner (1983), gdzie 1 oznacza pełną podatność zaś 9 pełną odporność na patogena (Olczak-Woltman i in., 2008). Ocena fenotypowa populacji mapującej obejmowała również ocenę typu reakcji na infekcję. Na podstawie oceny stopnia porażenia roślin oraz charakterystyki chloroz wyróżniano dwie klasy fenotypowe (Olczak-Woltman i in., 2009). Pierwszą stanowiły linie z wyraźnie odciętym, jasnym, chlorotycznym halo wokół drobnych lub średniej wielkości nekroz zajmujących od 8 do 15% powierzchni liści (typ reakcji typowy dla tolerancyjnej linii Gy14). W skład drugiej grupy wchodziły linie o rozmytych, rozległych intensywnie żółtych chlorozach oraz dużych nekrozach obejmujących powierzchnię liści do 87% (typ reakcji typowy dla linii B10). Segregację tej cechy 1:1 w odniesieniu do typu reakcji odpornościowej zweryfikowano testem statystycznym χ^2 ($v = 1$, $\alpha = 0,05$).

Ocenę przydatności markerów SSR do mapowania w populacji mapującej Gy14 × B10 opracowanych przez Ren i in. (2009) oraz Yang i in. (2012) przeprowadzono w dwóch etapach. W pierwszym etapie wykonano analizę bioinformatyczną z użyciem algorytmu BLAST oraz programów Sequencher 4.5 (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI, USA) i CLC Genomics Workbench 7.5 (CLCBio, Aarhus, Denmark) wykorzystując sekwencje genomów linii Gy14 (<http://phytozome.net/>) i B10 (<http://csgenome.sggw.pl/>) i wskazując polimorficzne markery SSR *in silico*. W drugim etapie przetestowano doświadczalnie wytypowane markery SSR na liniach rodzicielskich i ośmiu losowo wybranych RIL

populacji mapującej, a następnie markery polimorficzne testowano na całej populacji mapującej. Segregację 1:1 potwierdzającą przydatność markerów do konstrukcji mapy genetycznej oceniono testem statystycznym χ^2 ($v = 1$, $\alpha = 0,05$). Test χ^2 użyto również do wstępnej identyfikacji markerów SSR sprzężonych z genem odporności na kanciastą plamistość ogórka. Dla każdego markera SSR wytypowano zestaw RIL, które podczas oceny fenotypowej wykazywały tolerancję na kanciastą plamistość, podobnie jak linia Gy14. W grupie tak wyselekcjonowanych RIL obserwowano przewagę linii z allelem markera SSR charakterystycznym dla linii Gy14.

Genomowe DNA izolowano z młodych liści ogórka z użyciem zestawu Gene Elute™ Plant Genomic MiniPrep Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Skład mieszaniny reakcyjnej PCR przy całkowitej objętości reakcji 20 μ l był następujący: DreamTaq Buffer, dNTPs Mix 2mM, starter F — 1 μ M, starter R — 1 μ M, DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) — 0,6 U, DNA 40 ng. Amplifikację wykonano w termocyklerze PTC-200 (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, USA) wykorzystując program opracowany przez Pillen i in. (2000): 94°C 1 min, 64°C 30 sek, 72°C 1 min — 10 cykli, następnie 30 cykli — 94°C 1 min, 55°C 30 sek, 72°C 1 min i 1 cykl — 72°C przez 5 min. Elektroforeza produktów amplifikacji prowadzona była w 6% denaturującym żelu poliakrylamidowym. Produkty rozdziału wizualizowano metodą srebrną według Benbouza i in. (2006).

WYNIKI I DYSKUSJA

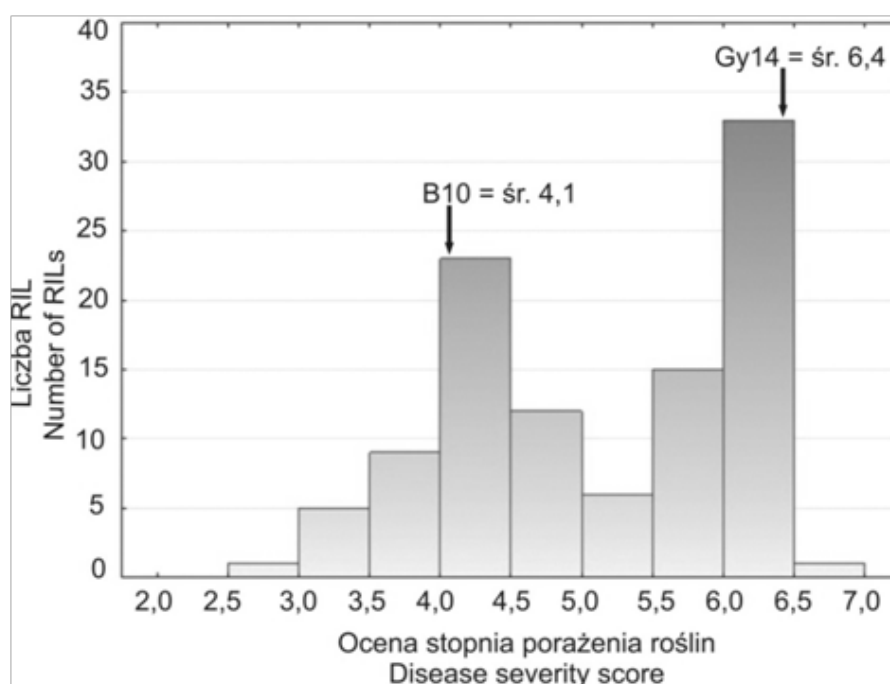
Charakterystyka reakcji odpornościowej RIL populacji mapującej ogórka

Testom patogeniczności poddano 110 RIL populacji mapującej Gy14 $\times$ B10. Podczas oceny fenotypowej rozpatrywano odporność na bakteryjną kanciastą plamistość jako dwie oddzielne cechy. Pierwszą był stopień nasilenia objawów chorobowych z wykorzystaniem 9-stopniowej skali porażenia. Linia B10 wykazywała podatność na kanciastą plamistość. Na porażonych liściach pojawiały się duże początkowo silnie uwodnione plamy, przechodzące w nekrozy z pojawiającymi się wyciekami bakteryjnymi. Stopień nasilenia objawów sięgał od 50% do 75%, a często nawet do 87% powierzchni liści. Średnia ocena stopnia porażenia liści wyniosła 4,1. Z kolei linia Gy14 charakteryzowała się tolerancją na kanciastą plamistość. Na porażonych liściach obserwowano drobne lub średniej wielkości plamy nekrotyczne, a udział porażonej powierzchni liści wahał się od 8 do 25%, zaś średnia ocena stopnia porażenia liści wynosiła 6,4. Wyniki oceny fenotypowej linii rodzicielskich są zgodne z wcześniejszymi badaniami, których celem było wskazanie standardów podatności i tolerancji użytecznych podczas testowania materiałów hodowlanych na kanciastą plamistość liści ogórka (Olczak-Woltman i in., 2008). Zakres ocen stopnia porażenia RIL scharakteryzowanych jako typ linii B10 wynosił od 2,8 do 4,9; zaś dla RIL ocenionych jako typ linii Gy14 od 5,3 do 6,6 (tab. 1, rys. 1).

Tabela 1

Zakres ocen oraz średnia ocena stopnia porażenia roślin w odniesieniu do typu reakcji odpornościowej
The evaluation of range and average disease severity scores in relation to the angular leaf spot (ALS)
resistance type

Typ reakcji odpornościowej ALS resistance type	Liczba linii Number of lines	Zakres ocen Score range		Średnia ocen Mean	Odchylenie standardowe Standard deviation
		minimum minimum	maksimum maximum		
Linia Gy14 Gy14 line	linia mateczna materna line	6,0	7,0	6,4	0,48
Linia B10 B10 line	linia ojcowska paternal line	3,0	5,0	4,1	0,63
Typ linii Gy14 Gy14 resistance type	55	5,3	6,6	6,0	0,33
Typ linii B10 B10 resistance type	51	2,8	4,9	4,2	0,48



Rys. 1. Rozkład oceny stopnia porażenia roślin w populacji mapującej Gy14 × B10
Fig. 1. Distribution of disease severity scores in mapping population Gy14 × B10

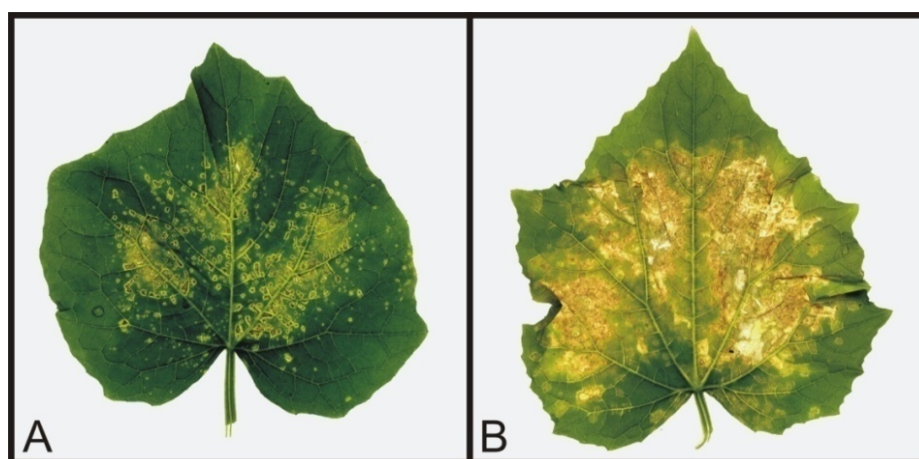
Drugą ocenianą podczas testu cechą była obecność chlorotycznego halo. Na tej podstawie wyróżniono dwie klasy fenotypowe. Pierwszą stanowiły linie z wyraźnie odciętym, jasnym chlorotycznym halo wokół nekroz, podobnie jak u linii Gy14 wykazujące tolerancję na bakteryjną kanciastą plamistość liści. W skład drugiej klasy

fenotypowej wchodziły linie o rozmytych, rozległych i intensywnych chlorozach bez halo, podobnie jak u linii B10 i podatne na tę chorobę (tab. 2, rys. 2).

Tabela 2

Wyniki analizy genetycznej w odniesieniu do typu reakcji odpornościowej
Results of genetic analysis in relation to the angular leaf spot resistance type

Liczba testowanych linii Number of tested lines		110
Liczba obserwowanych linii (typ reakcji odpornościowej) Number of observed lines (angular leaf spot resistance type)	Typ Gy14: odcięte, chlorotyczne halo, drobne nekrozy Gy14 type: limited chlorotic halo, small necroses	55
	Typ B10: rozległe chlorozy i nekrozy widespread chloroses and necroses	51
Testowane rozszczepienie Tested segregation ratio		1:1
Wartość empiryczna χ^2 χ^2 empirical value		0,29
Wartość krytyczna χ^2 ($v = 1, \alpha = 0,05$) χ^2 critical value ($v = 1, \alpha = 0.05$)		3,84



Rys. 2. Objawy bakteryjnej kanciatej plamistości ogórka wywołane przez *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. (A) linia Gy14 tolerancyjna na kanciatą plamistość liści, (B) linia B10 podatna na kanciatą plamistość liści

Fig. 2. Angular leaf spot symptoms on cucumber accessions caused by *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. (A) Gy14 line tolerant to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, (B) B10 line susceptible to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*

Spośród badanych linii 55 charakteryzowało się wyraźnie odciętym halo wokół nekroz i tolerancją, a 51 linii wykazywało rozmyte, rozległe chlorozy i podatność na kanciatą plamistość liści. Dla 4 linii trudno było określić jednoznacznie typ reakcji odpornościowej. Rozszczepienie fenotypowe 1:1, zweryfikowane testem χ^2 potwierdziło, że cecha obecności/braku chlorotycznego halo i typu chloroz jest determinowana monogenicznie. Wcześniej wykonane badania na roślinach pokolenia F_2 , BC_1 i BC_2 uzyskanych z krzyżowania linii B10 $\times$ H603 również wskazały na jednogenowe dziedziczenie tej cechy. Stwierdzono

ponadto, że brak halo i rozległe chlorozy są cechą dominującą związaną z podatnością na kanciastą plamistość (Olczak-Woltman i in., 2009). Wyniki klasycznej analizy genetycznej potwierdziły też, że populacja mapująca Gy14 × B10 osiągnęła w pokoleniu F₅ wysoki poziom homozygotyczności, a linie wchodzące w jej skład są wyrównane genetycznie, co czyni tę populację przydatną do mapowania genów odporności na kanciastą plamistość liści ogórka (tab. 2).

Identyfikacja markerów SSR przydatnych do konstrukcji mapy genetycznej ogórka

Dostępność sekwencji genomów ogórka linii Gy14 i B10 pozwoliła na zastosowanie analizy bioinformatycznej do zidentyfikowania *loci* mikrosatelitarnych potencjalnie różnicujących te linie. Wytypowano w ten sposób 89 markerów SSR spośród 995 markerów opracowanych przez Ren i in. (2009) oraz 133 markery spośród 735 opracowanych przez Yang i in. (2012), co stanowiło odpowiednio 8,9% i 18,1%. Wskazano również potencjalny typ polimorfizmu, oznaczony jako „expGy14” lub „expB10”, gdzie polimorfizm „expGy14” oznaczał większą liczbę powtórzeń sekwencji mikrosatelitarnej dla linii Gy14, a polimorfizm „expB10” dla B10. W przypadku markerów opracowanych przez Ren i in. (2009) 46 markerów wykazywało polimorfizm typu „expGy14”, zaś 43 typu „expB10”. Wśród markerów opracowanych przez Yang i in. (2012) 75 markerów charakteryzowało się polimorfizmem typu „expGy14”, zaś 58 typu „expB10”, co sugeruje częstszą ekspansję *loci* mikrosatelitarnych u linii Gy14 (tab. 3).

Tabela 3

Zestawienie *loci* mikrosatelitarnych wykazujących polimorfizm na podstawie analizy bioinformatycznej Bioinformatic analysis of results in relation to identified microsatellite loci showing polymorphism

	Loci mikrosatelitarne opracowane przez: Microsatellite loci developed by:			
	Ren i in. (2009)		Yang i in. (2012)	
	liczba number of loci	% wszystkich <i>loci</i> ^b % of all loci ^b	liczba number of loci	% wszystkich <i>loci</i> ^b % of all loci ^b
Loci mikrosatelitarne ^a : Microsatellite loci ^a :	995	100	735	100
- zidentyfikowane bioinformatycznie w genomie linii Gy14 - bioinformatically identified in Gy14 genome	562	56,5	695	94,6
- zidentyfikowane bioinformatycznie w genomie linii B10 - bioinformatically identified in B10 genome	484	48,6	469	63,8
Polimorficzne <i>loci</i> mikrosatelitarne: Polymorphic microsatellite loci:	89	8,9	133	18,1
- polimorfizm typu „expGy14” ^c - „expGy14” polymorphism type ^c	46	4,6	75	10,2
- polimorfizm typu „expB10” ^d - „expB10” polymorphism type ^d	43	4,3	58	7,9

^a suma *loci* mikrosatelitarnych opracowanych przez Ren i in. (2009) oraz Yang i in. (2012); sum of the microsatellite loci published by Ren et al. (2009) and Yang et al. (2012)

^b % *loci* mikrosatelitarnych w odniesieniu do sumy opracowanych *loci*; % of microsatellite loci with regard to the sum of published loci

^c liczba powtórzeń sekwencji mikrosatelitarnej większa dla linii Gy14; number of the microsatellite sequence repeats greater for the line Gy14

^d liczba powtórzeń sekwencji mikrosatelitarnej większa dla linii B10; number of the microsatellite sequence repeats greater for the line B10

Wytypowany *in silico* zestaw 89 markerów opracowanych przez Ren i in. (2009) oraz 71 markerów opracowanych przez Yang i in. (2012), łącznie 160 markerów SSR, przetestowano doświadczalnie na liniach rodzicielskich i ośmiu wybranych RIL. Potwierdzono polimorfizm dla 68,5% *loci* mikrosatelitarnych opracowanych przez Ren i in. (2009) oraz dla 59% *loci* opracowanych przez Yang i in. (2012), łącznie dla 64,4% markerów SSR. Zastosowanie analizy bioinformatycznej do typowania markerów SSR potencjalnie różnicujących linie rodzicielskie Gy14 i B10 okazało się efektywne, a uzyskany stopień polimorfizmu w obrębie linii rodzicielskich i ośmiu wybranych RIL można uznać za satysfakcjonujący. Dla porównania Yang i in. (2012) stosując tę samą metodę z zestawu 1266 markerów SSR opracowanych przez Ren i in. (2009) wskazali 731 markerów SSR (57,7%) potencjalnie różnicujących linie Gy14 i 9930, jednakże eksperymentalnie polimorfizm potwierdzono jedynie dla 312 markerów SSR (25%). Wykorzystanie analizy bioinformatycznej pozwoliło w znacznym stopniu ograniczyć liczbę markerów SSR wytypowanych do dalszego testowania spośród markerów opracowanych przez Ren i in. (2009) oraz Yang i in. (2012). Potwierdza to zasadność jej wykonania, jednakże metoda ta nie była w pełni skuteczna. Dla 35,4% markerów SSR wytypowanych bioinformatycznie jako różnicujące linie rodzicielskie uzyskano produkty amplifikacji, które jednak nie różnicowały linii rodzicielskich. Przyczynami braku polimorfizmu mogły być niedokładności analizy bioinformatycznej spowodowane nieścisłościami w sekwencjach genomów linii Gy14 i B10 wynikającymi z błędów podczas sekwencjonowania i/lub składania odczytów sekwencyjnych, jak również fakt, że do sekwencjonowania genomów wykorzystywano DNA pochodzące z innych roślin niż to, które wykorzystywano do oceny polimorfizmu.

Zakres wielkości uzyskanych ampikonów dla testowanych markerów SSR wynosił od 107 do 460 par zasad (pz). Natomiast różnice w wielkości ampikonów między liniami rodzicielskimi wahały się od 2 do 60 pz, przy czym dla większości markerów był to zakres od 2 do 10 pz. Liczba zidentyfikowanych na podstawie analizy bioinformatycznej polimorficznych *loci* mikrosatelitarnych na poszczególnych chromosomach była nierównomierna. Najwięcej polimorficznych *loci* (51) zidentyfikowano dla chromosomu 3, najmniej (15) — dla chromosomu 2. Z prac dotyczących identyfikacji genów odporności, kodujących białka NBS-LRR wynika, że geny te u ogórka występują na chromosomach 2, 3, 4 i 5 podczas gdy nie zidentyfikowano ich na chromosomach 1, 6 i 7 (Huang i in., 2009; Wang i in., 2013; Yang i in., 2013). Testując markery opracowane przez Ren i in. (2009) na całej populacji mapującej wykazano przydatność 52 markerów do konstrukcji mapy genetycznej ogórka, co potwierdzono testem statystycznym χ^2 . Najwięcej polimorficznych markerów SSR zidentyfikowano na chromosomie 3, w przeciwieństwie do chromosomu 1, 2 i 4, na których zidentyfikowano ich stosunkowo mało (tab. 4). Wstępne analizy pokazały, że marker SSR00398 zlokalizowany na chromosomie 5 może być sprzężony z genem odporności na kanciastą plamistość liści ogórka. Z punktu widzenia konstrukcji mapy genetycznej i mapowania genów związanych z kanciastą plamistością liści ogórka konieczne są dalsze prace nad identyfikacją markerów SSR zlokalizowanych na chromosomach 2, 3, 4 i 5.

Tabela 4

Lokalizacja chromosomowa loci mikrosatelitarnych ogórka
Chromosome location of cucumber microsatellite loci

Chromosom Chromosome	Loci mikrosatelitarne — Microsatellite loci						przydatne do konstrukcji mapy genetycznej ^b useful to genetic map construction ^b
	polimorfizm w analizie bioinformatycznej polymorphism based on bioinformatics analysis			polimorfizm na podstawie wstępnej analizy ^a polymorphism based on preliminary analysis ^a			
	oprac. przez Ren i in. (2009) developed by Ren et al. (2009)	oprac. przez Yang i in. (2012) developed by Yang et al. (2012)	razem total	oprac. przez Ren i in. (2009) developed by Ren et al. (2009)	oprac. przez Yang i in. (2012) developed by Yang et al. (2012)	razem total	
Chr1	8	30	38	7	4	11	4
Chr2	5	10	15	4	3	7	3
Chr3	24	27	51	21	8	28	20
Chr4	8	19	27	5	8	13	3
Chr5	16	21	37	7	7	14	6
Chr6	17	13	30	9	6	15	9
Chr7	11	13	24	8	6	14	7
Razem Total	89	133	222	61	42	103	52

^a wykazujące polimorfizm na podstawie wstępnej analizy na liniach rodzicielskich i ośmiu losowo wybranych liniach RIL; showing polymorphism in preliminary analysis of parental lines and a sample of eight random RILs

^b przetestowane na całej populacji mapującej, przydatne do konstrukcji mapy genetycznej; tested in the whole mapping population, useful for genetic map construction

WNIOSKI

1. Ocena populacji mapującej Gy14 × B10 pod względem cechy odporności na bakteryjną kanciastą plamistość liści wskazuje, że populacja osiągnęła w pokoleniu F₅ wysoki poziom homozygotyczności, a linie wsobne wchodzące w jej skład są wyrównane genetycznie. Umożliwia to wykorzystanie tej populacji do mapowania genów odporności związanych z kanciastą plamistością liści ogórka.
2. Wysoki udział polimorficznych markerów SSR w porównaniu z poziomem polimorfizmu opisywanym w innych pracach dotyczących konstrukcji map genetycznych ogórka potwierdza przydatność wstępnej analizy bioinformatycznej loci mikrosatelitarnych w celu typowania markerów SSR przydatnych do mapowania.
3. Liczba markerów SSR przydatnych do konstrukcji mapy genetycznej Gy14 × B10 zidentyfikowanych na poszczególnych chromosomach jest nierównomierna. Dla chromosomu 3, w przeciwieństwie do chromosomu 1, 2 i 4, potwierdzono przydatność największej liczby markerów SSR. W oparciu o dostępną wiedzę na temat lokalizacji chromosomowej genów odporności u ogórka konieczne jest dalsze poszukiwanie markerów SSR, a szczególnie dla chromosomów 2, 3, 4 i 5.
4. Spośród 52 markerów SSR przetestowanych w populacji mapującej Gy14 × B10 wstępnie wskazano marker SSR00398 zlokalizowany na chromosomie 5 jako sprzężony z genem odporności na bakteryjną kanciastą plamistość liści ogórka.

LITERATURA

- Adhikari B. N., Savory E. A., Vaillancourt B., Childs K. L., Hamilton J. P., Day B., Buell C. R. 2012. Expression profiling of *Cucumis sativus* in response to infection by *Pseudoperonospora cubensis*. PLoS ONE 7: e34954.
- Benbouza H., Jacquemin J., Baudoin J., Mergeai G. 2006. Optimization of reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 10: 77 — 81.
- Hammerschmidt R. 1999 a. PHYTOALEXINS: What have we learned after 60 years? Ann. Rev. Phytopathol. 37: 285 — 306.
- Hammerschmidt R. 1999 b. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? Physiol. Mol. Plant. Pathol. 55: 77 — 84.
- Huang S., Li R., Zhang Z., Li L., Gu X., Fan W., Lucas W. J., Wang X., Xie B., Ni P., Ren Y., Zhu H., Li J., Lin K., Jin W., Fei Z., Li G., Staub J., Kilian A., van der Vossen E. A., Wu Y., Guo J., He J., Jia Z., Ren Y., Tian G., Lu Y., Ruan J., Qian W., Wang M., Huang Q., Li B., Xuan Z., Cao J., Asan Wu Z., Zhang J., Cai Q., Bai Y., Zhao B., Han Y., Li Y., Li X., Wang S., Shi Q., Liu S., Cho W. K., Kim J. Y., Xu Y., Heller-Uszynska K., Miao H., Cheng Z., Zhang S., Wu J., Yang Y., Kang H., Li M., Liang H., Ren X., Shi Z., Wen M., Jian M., Yang H., Zhang G., Yang Z., Chen R., Liu S., Li J., Ma L., Liu H., Zhou Y., Zhao J., Fang X., Li G., Fang L., Li Y., Liu D., Zheng H., Zhang Y., Qin N., Li Z., Yang G., Yang S., Bolund L., Kristiansen K., Zheng H., Li S., Zhang X., Yang H., Wang J., Sun R., Zhang B., Jiang S., Wang J., Du Y., Li S. 2009. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. Nat. Genet. 41: 1275 — 1281.
- Jenkins S. F., Wehner T. C. 1983. A system for the measurement of foliar diseases of cucumber. Cucurbit Genet. Coop. Rep. 6: 10 — 12.
- Lough T. J., Lucas W. J. 2006. Integrative plant biology: role of phloem long distance macromolecular trafficking. Ann. Rev. Plant Biol. 57: 203 — 232.
- Malepszy S., Niemirowicz-Szczytt K. 1991. Sex determination in cucumber (*Cucumis sativus*) as a model system for molecular biology. Plant Sci. 80: 39 — 47.
- Miao H., Zhang S., Wang X., Zhang Z., Li M., Mu S., Cheng Z., Zhang R., Huang S., Xie B., Fang Z., Zhang Z., Weng Y., Gu X. 2011. A linkage map of cultivated cucumber (*Cucumis sativus* L.) with 248 microsatellite marker loci and seven genes for horticulturally important traits. Euphytica 182: 167 — 176.
- Olczak-Woltman H., Gałęcka T., Korzeniewska A., Niemirowicz-Szczytt K. 2007. Odporność linii DH ogórka na bakteryjną kanciastą plamistość. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych 517: 527 — 532.
- Olczak-Woltman H., Schollenberger M., Mądry W., Niemirowicz-Szczytt K. 2008. Evaluation of cucumber (*Cucumis sativus*) cultivars grown in Eastern Europe and progress in breeding for resistance to angular leaf spot (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*). Eur. J. Plant Pathol. 122: 385 — 393.
- Olczak-Woltman H., Bartoszewski G., Mądry W., Niemirowicz-Szczytt K. 2009. Inheritance of resistance to angular leaf spot (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) in cucumber and identification of molecular markers linked to resistance. Plant Pathol. 58: 145 — 151.
- Pillen K., Binder A., Kreuzkam B., Ramsay L., Waugh R., Förster J., Léon J. 2000. Mapping new EMBL-derived barley microsatellites and their use in differentiating German barley cultivars. Theor. Appl. Genet. 101: 652 — 660.
- Ren Y., Zhang Z., Liu J., Staub J. E., Han Y., Cheng Z., Li X., Lu J., Miao H., Kang H., Xie B., Gu X., Wang X., Du Y., Jin W., Huang S. 2009. An integrated genetic and cytogenetic map of the cucumber genome. PLoS ONE 4: e5795.
- Tanurdzic M., Banks J. A. 2004. Sex-determining mechanisms in land plants. Plant Cell 16 Suppl.: S61 — 71.
- Wan H., Yuan W., Bo K., Shen J., Pang X., Chen J. 2013. Genome-wide analysis of NBS-encoding disease resistance genes in *Cucumis sativus* and phylogenetic study of NBS-encoding genes in *Cucurbitaceae* crops. BMC Genomics 14: 109.
- Wóycicki R., Witkiewicz J., Gawroński P., Dąbrowska J., Lomsadze A., Pawełkowicz M., Siedlecka E., Kohei Yagi, Piłader W., Seroczyńska A., Śmiech M., Gutman W., Niemirowicz-Szczytt K., Bartoszewski G., Norikazu Tagashira, Yoshikazu Hoshi, Borodovsky M., Karpiński S., Malepszy S., Przybecki Z. 2011.

- The genome sequence of the North-European cucumber (*Cucumis sativus* L.) unravels evolutionary adaptation mechanisms in plants. PLoS ONE 6: e22728.
- Yang L., Koo D.H., Li Y., Zhang X., Luan F., Havey M. J., Jiang J., Weng Y. 2012. Chromosome rearrangements during domestication of cucumber as revealed by high-density genetic mapping and draft genome assembly. Plant J 71: 895 — 906.
- Yang L., Dawei L., Yuhong L., Xingfang G., Sanwen H., Garcia-Mas J., Weng Y. 2013. A 1,681-locus consensus genetic map of cultivated cucumber including 67 NB-LRR resistance gene homolog and ten gene loci. BMC Plant Biol. 13: 53.

ARTUR MAKAREWICZ

Katedra Agrotechnologii

Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach

Jakość konsumpcyjna bulw ziemniaka nawożonego wsiewkami międzyplonowymi w integrowanym i ekologicznym systemie produkcji

The quality of potato tubers fertilized with undersown catch crops in the integrated and organic production system

W pracy przedstawiono wyniki badań z lat 2006–2009 mające na celu określenie wpływu biomasy wsiewek międzyplonowych przyoranych jesienią i pozostawionych do wiosny w formie mulczu na jakość konsumpcyjną bulw ziemniaka w integrowanym i ekologicznym systemie produkcji. W doświadczeniu badano dwa czynniki. I. Nawożenie wsiewką międzyplonową: obiekt kontrolny (bez nawożenia wsiewką międzyplonową), obornik, koniczyna perska, koniczyna perska + życica westerwoldzka, życica westerwoldzka, koniczyna perska — mulcz, koniczyna perska + życica westerwoldzka — mulcz, życica westerwoldzka — mulcz. II. System produkcji: integrowany i ekologiczny. Cechy konsumpcyjne bulw ziemniaka (ciemnienie mięszu surowego i ugotowanego oraz smakowitość) nawożonego biomasą wsiewek międzyplonowych były zbliżone do zaobserwowanych na oborniku. Najlepszą jakością konsumpcyjną, a zwłaszcza smakowitością, wyróżniały się bulwy ziemniaka nawożone biomasą koniczyny perskiej, zarówno przyoranej jesienią, jak i pozostawionej do wiosny w formie mulczu. Ciemnienie mięszu surowego i ugotowanego bulw ziemniaka uprawianego w ekologicznym systemie produkcji było istotnie niższe niż w systemie integrowanym, natomiast smakowitość bulw ziemniaka była wyższa w integrowanym systemie produkcji.

Słowa kluczowe: ciemnienie bulw, mulcz, obornik, smakowitość, system produkcji, wsiewki międzyplonowe, ziemniak

The work presents results of a study carried out in 2006-2009 whose objective was to determine the influence of undersown catch crops, which were incorporated in autumn or left on the soil surface as mulch for spring incorporation, on the quality of table potato grown in the integrated and organic production systems. Two factors were examined in the study: 1. fertilization with undersown catch crops: control (no undersown catch crop), farmyard manure (FYM), Persian clover, Persian clover + westerwolds ryegrass, westerwolds ryegrass, Persian clover – mulch, Persian clover + westerwolds ryegrass — mulch, westerwolds ryegrass — mulch; 2. production system: integrated and organic. The

aforementioned tuber characteristics of table potato fertilized with the biomass of undersown catch crops were similar to the traits of FYM-fertilized potato. The best quality, flavour in particular, was determined for tubers of potato fertilized with autumn-and spring-incorporated Persian clover. Raw flesh darkening and after cooking darkening of organic potato was significantly lower compared with the integrated production, but the tuber flavour was better in the integrated production system.

Key words: tuber darkening, mulch, farmyard manure, flavour, production system, undersown catch crops, potato

WSTĘP

O jakości konsumpcyjnej bulw ziemniaka decyduje ich skład chemiczny, który jest uwarunkowany genetycznie, lecz modyfikowany przez czynniki środowiskowe i agrotechnikę (Sawicka, 1991; Ceglarek i in., 1998; Kaaber i in., 2002; Różyło, 2002; Savage i in., 2007; Zarzecka i in., 2011). Niekorzystne oddziaływanie chemizacji rolnictwa na skład chemiczny i jakość konsumpcyjną bulw ziemniaka powinno być sygnałem do poszukiwania alternatywnych rozwiązań. Takim rozwiązaniem może być integrowany i ekologiczny sposób uprawy ziemniaka (Danilchenko i Trečiokaite-Jarine, 2002; Sawicka i in., 2006; Smith, 2007; Kaźmierczak i Rychlik, 2014)). W tych systemach produkcji zaleca się wysycenie płodozmianu międzyplonami, które mogą być źródłem substancji organicznej zastępującej obornik w nawożeniu ziemniaka (Ceglarek i in., 1998; Płaza i in., 2010; Makarewicz i in., 2014). W piśmiennictwie zauważa się pewien niedobór publikacji z tego zakresu. Stąd wyłania się potrzeba prowadzenia tego typu badań. Próbę częściowego wypełnienia tej luki stanowi niniejsza praca, której celem jest określenie wpływu biomasy wsiewek międzyplonowych przyoranych jesienią i pozostawionych do wiosny w formie mulczu na jakość konsumpcyjną bulw ziemniaka w integrowanym i ekologicznym systemie produkcji.

MATERIAŁ I METODY

Eksperyment polowy przeprowadzono w latach 2006–2009 w Rolniczej Stacji Doświadczalnej w Zawadach należącej do Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach. Badania prowadzono na glebie płowej wytworzonej z piasku gliniastego mocnego, o odczynie obojętnym, średniej zasobności w przyswajalny fosfor, potas i magnez. Zawartość węgla organicznego wynosiła 0,82%. Doświadczenie założono w układzie split-block, w trzech powtórzeniach. Badano dwa czynniki. I. Nawożenie wsiewką międzyplonową: obiekt kontrolny (bez nawożenia wsiewką międzyplonową), obornik, wsiewka międzyplonowa — biomasa przyorana jesienią (koniczyna perska, koniczyna perska + życica westerwoldzka, życica westerwoldzka), wsiewka międzyplonowa — biomasa pozostawiona do wiosny w formie mulczu (koniczyna perska, koniczyna perska + życica westerwoldzka, życica westerwoldzka). II. System produkcji: integrowany i ekologiczny.

Doświadczenie założono w stanowisku po owsie. Resztki poźniwne owsa przyorano podorywką. Następnie wykonano kilkukrotne bronowanie i orkę przedzimową. Na wiosnę wsiewki międzyplonowe wsiewano w pszenżyto jare uprawiane na ziarno. W pierwszym

roku po nawożeniu wsiewkami międzyplonowymi uprawiano ziemniaki jadalne odmiany Zeus. W integrowanym systemie produkcji ziemniaka, wczesną wiosną, rozsiano nawozy mineralne, których ilość w przeliczeniu na 1 ha wynosiła: 90 kg N, 36,9 kg P i 99,6 kg K. Dawki nawożenia mineralnego dostosowano do zasobności gleby i wielkości przewidywanego plonu. Na poletkach, na których jesienią wykonano orkę przedzimową, nawozy mineralne wymieszano z glebą za pomocą kultywatora zagregatowanego z broną. Natomiast na poletkach z mulczem stosowano bronę talerzową i kultywator. W ekologicznym systemie produkcji zamiast nawożenia mineralnego, stosowano obornik w dawce $30 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$ pod pszenżyto jare uprawiane z wsiewkami międzyplonowymi. Z dawką $30 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$ świeżej masy obornika wprowadzono do gleby na 1 ha: 7,8 t suchej masy, 163,2 kg N, 48,4 kg P i 134,7 kg K. Ziemniaki wysadzano w 3. dekadzie kwietnia, a zbierano w 2. dekadzie września. W integrowanym systemie produkcji, na plantacji ziemniaka stosowano pielęgnację mechaniczno-chemiczną. Do wschodów, co 7 dni, ziemniaki obsypywano i bronowano, a tuż przed wschodami wykonano opryskiwanie mieszaną herbicydową Afalon 50 WP + Reglone Turbo 200 SL ($1 \text{ kg} + 1 \text{ dm}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$). Stonkę ziemniaczaną zwalczano dwukrotnie preparatem Fastac ($0,1 \text{ dm}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$), a zarazę ziemniaczaną trzykrotnie fungicydem Ridomil MZ 72 WP ($2 \text{ dm}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$). Natomiast w ekologicznym systemie produkcji chwasty zwalczano mechanicznie. Od posadzenia do zwarcia rzędów, co 7 dni, stosowano obsypnik z broną. Stonkę ziemniaczaną zwalczano dwukrotnie preparatem Novodor SC ($2,5 \text{ dm}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$), a zarazę ziemniaczaną trzykrotnie fungicydem Miedzian 50 WP ($4 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$). Podczas zbioru ziemniaka, z każdego poletka pobrano próby bulw w celu określenia cech konsumpcyjnych. Ciemnienie mięszu bulw surowych i po ugotowaniu oceniono według barwnych tablic, w odwróconej 9-stopniowej skali duńskiej; liczba 9 oznaczono miąższ niezmienny, a liczba 1 miąższ czarny. Zmiany barwy miąższu surowego bulw oceniono po 4 godzinach od chwili pokrojenia ziemniaka, a ugotowanego po 2 i 24 godzinach. Oceny smakowości dokonano przy użyciu 9-stopniowej skali, gdzie ocenę 9 — przyjęto za bardzo dobrą, a ocenę 1 — za bardzo złą. Badania przeprowadzono na 10 połówkach bulw ziemniaka. Ocenę smakowości przeprowadziło 4 osoby w wieku od 22 do 50 lat.

Każdą z badanych cech poddano analizie wariancji zgodnie ze schematem układu split-block. W przypadku istotnych źródeł zmienności dokonano szczegółowego porównania średnich testem Tukeya. Do obliczeń statystycznych użyto algorytmów własnych pisanych w Ms Excel 7.0.

Lata prowadzenia badań charakteryzowały się znacznym zróżnicowaniem warunków pogodowych (tab. 1). Największą sumę opadów odnotowano w 2008 roku. W tym też roku średnia temperatura była niższa o $0,4^\circ\text{C}$ od średniej temperatury wieloletniej. W 2009 roku suma opadów była niższa niż w 2008 roku, ale wyższa od sumy wieloletniej. Średnia miesięczna temperatura oscylowała wokół średniej wieloletniej. W 2007 roku odnotowano najmniejszą sumę opadów, przy najwyższej temperaturze.

Tabela 1

Warunki pogody podczas badań zgodnie z danymi ze Stacji Meteorologicznej w Zawadach
Weather conditions in the period of investigations, according to the data from the Meteorological Station at Zawady

Lata Years	Miesiąc Month						Średnie Means
	IV	V	VI	VII	VIII	IX	
Temperatura (°C) Temperature (°C)							
2007	8,6	14,6	18,2	18,9	18,9	13,1	15,4
2008	9,1	12,7	17,4	18,4	18,5	12,2	14,7
2009	10,3	12,9	15,7	19,4	17,7	14,6	15,1
1951–2000	7,8	13,8	17,1	18,7	18,0	13,0	14,7
Suma opadów (mm) Rainfall sum (mm)							
2007	21,2	59,1	59,0	70,2	31,1	67,6	308,2
2008	28,1	85,6	49,0	69,8	75,4	63,4	371,2
2009	8,1	68,9	145,2	26,4	80,9	24,9	354,4
1951–2000	37,1	50,6	61,5	71,6	53,8	50,0	324,6

WYNIKI

Ciemnienie miąższu surowego bulw ziemniaka było istotnie modyfikowane przez badane czynniki doświadczenia i ich współdziałanie (tab. 2).

Tabela 2

Ciemnienie miąższu surowego bulw ziemniaka po 4 godz. (średnie z lat 2007–2009) [skala 9°]
Raw flesh darkening of potato tubers after 4 h (means across 2007–2009) [9-point scale]

Nawożenie wsiewką międzyplonową Fertilization with undersown catch crop	System produkcji Production system		Średnie Means
	integrowany integrated	ekologiczny organic	
Obiekt kontrolny — Control treatment	6,4	7,0	6,7
Obornik — Farmyard manure	7,0	7,4	7,2
Koniczyna perska — Persian clover	7,4	7,8	7,6
Koniczyna perska + życica westerwoldzka Persian clover + westerwolds ryegrass	7,0	7,4	7,2
Życica westerwoldzka Westerwolds ryegrass	6,6	7,0	6,8
Koniczyna perska-mulcz Persien clover-mulch	7,6	8,1	7,9
Koniczyna perska + życica westerwoldzka-mulcz Persian clover + westerwolds ryegrass-mulch	7,4	7,8	7,6
Życica westerwoldzka-mulcz — Westerwolds ryegrass-mulch	6,9	7,2	7,1
Średnie — Means	7,0	7,5	-
NIR _{0,05} — LSD _{0,05}			
Nawożenie wsiewką międzyplonową — Fertilization with undersown catch crop			0,3
System produkcji — Production system			0,2
Interakcja — Interaction			0,4

Na obiektach nawożonych koniczyną perską, zarówno przyoraną jesienią, jak i pozostawioną do wiosny w formie mulczu oraz na obiekcie nawożonym mieszanką koniczyny

perskiej z życicą westerwoldzką stosowaną w formie mulczu odnotowano najniższy stopień ciemnienia miąższu surowego bulw, który istotnie różnił się od stopnia ciemnienia miąższu bulw nawożonych obornikiem. Na pozostałych obiektach, nawożonych biomasą wsiewek międzyplonowych, z wyjątkiem życicy westerwoldzkiej przyoranej jesienią, stopień ciemnienia miąższu bulw nie różnił się istotnie od występującego na oborniku. Na obiekcie kontrolnym zaobserwowano najwyższy stopień ciemnienia miąższu bulw. Ciemnienie miąższu surowego bulw ziemniaka różnicował także system produkcji. Istotnie mniejszy stopień ciemnienia miąższu bulw surowych otrzymano w ekologicznym niż w integrowanym systemie produkcji. Wykazano współdziałanie badanych czynników, z którego wynika, że najniższym stopniem ciemnienia miąższu surowego charakteryzowały się bulwy ziemniaka nawożonego koniczyną perską oraz mieszanką koniczyny perskiej z życicą westerwoldzką stosowanymi w formie mulczu w ekologicznym systemie produkcji, a najwyższym stopniem ciemnienia bulwy ziemniaka zebrane z obiektu kontrolnego w integrowanym systemie produkcji. Należy tłumaczyć to tym, iż ziemniaki nawożone wsiewkami międzyplonowymi w ekologicznym systemie produkcji otrzymały mniej składników pokarmowych niż ziemniaki uprawiane na obiekcie kontrolnym tylko z nawożeniem mineralnym, w integrowanym systemie produkcji. Stąd niższy stopień ciemnienia miąższu bulw surowych.

Analiza statystyczna wykazała istotny wpływ nawożenia wsiewką międzyplonową, systemu produkcji i ich współdziałania na ciemnienie miąższu ugotowanego bulw ziemniaka po 2 i 24 h (tab. 3 i 4).

Tabela 3

Ciemnienie miąższu ugotowanego bulw ziemniaka po 2 godz. (średnie z lat 2007–2009) [skala 9°]
After cooking darkening of potato tubers after 2 h (means across 2007–2009) [9-point scale]

Nawożenie wsiewką międzyplonową Fertilization with undersown catch crop	System produkcji Production system		Średnie Means
	integrowany integrated	ekologiczny organic	
Obiekt kontrolny — Control treatment	7,2	7,7	7,5
Obornik — Farmyard manure	7,8	8,3	8,1
Koniczyna perska — Persian clover	8,1	8,4	8,3
Koniczyna perska + życica westerwoldzka Persian clover + westerwolds ryegrass	7,9	8,2	8,1
Życica westerwoldzka Westerwolds ryegrass	7,5	8,1	7,8
Koniczyna perska-mulcz Persien clover-mulch	8,2	8,7	8,5
Koniczyna perska + życica westerwoldzka-mulcz Persian clover + westerwolds ryegrass-mulch	8,1	8,5	8,3
Życica westerwoldzka-mulcz — Westerwolds ryegrass-mulch	7,8	8,0	7,9
Średnie — Means	7,8	8,2	-
NIR _{0,05} — LSD _{0,05}			
Nawożenie wsiewką międzyplonową — Fertilization with undersown catch crop			0,3
System produkcji — Production system			0,1
Interakcja — Interaction			0,4

Tabela 4

Ciemnienie miąższu ugotowanego bulw ziemniaka po 24 godz. (średnie z lat 2007–2009) [skala 9°]
After cooking darkening of potato tubers after 24 h (means across 2007–2009) [9-point scale]

Nawożenie wsiewką międzyplonową Fertilization with undersown catch crop	System produkcji Production system		Średnie Means
	integrowany integrated	ekologiczny organic	
Obiekt kontrolny — Control treatment	7,0	7,4	7,2
Obornik — Farmyard manure	7,7	8,0	7,9
Koniczyna perska — Persian clover	7,8	8,2	8,0
Koniczyna perska + życica westerwoldzka Persian clover + westerwolds ryegrass	7,6	7,9	7,8
Życica westerwoldzka Westerwolds ryegrass	7,2	7,8	7,5
Koniczyna perska-mulcz Persian clover-mulch	8,0	8,4	8,2
Koniczyna perska + życica westerwoldzka-mulcz Persian clover + westerwolds ryegrass-mulch	7,8	8,2	8,0
Życica westerwoldzka-mulcz — Westerwolds ryegrass-mulch	7,5	7,8	7,7
Średnie — Means	7,6	8,0	-
NIR _{0,05} — LSD _{0,05}			
Nawożenie wsiewką międzyplonową — Fertilization with undersown catch crop			0,2
System produkcji — Production system			0,1
Interakcja — Interaction			0,3

Stopień ciemnienia miąższu ugotowanego bulw ziemniaka na obiektach nawożonych biomasą wsiewek międzyplonowych, z wyjątkiem koniczyny perskiej pozostawionej do wiosny w formie mulczu, nie różnił się istotnie od odnotowanego na oborniku. Bulwy ziemniaka nawożone koniczyną perską stosowaną w formie mulczu były najjaśniejsze. Natomiast najintensywniejsze nasilenie barwy szarej miąższu ugotowanego odnotowano w bulwach zebranych z obiektu kontrolnego zarówno po 2, jak i po 24 h. Ciemnienie miąższu ugotowanego bulw ziemniaka różnicował także system produkcji. Bulwy ziemniaka pochodzące z ekologicznego systemu produkcji wyróżniały się niższym stopniem ciemnienia miąższu ugotowanego po 2 i 24 h niż bulwy ziemniaka uprawianego w integrowanym systemie produkcji. Wykazano współdziałanie badanych czynników, z którego wynika, że najjaśniejszą barwą miąższu ugotowanego po 2 i 24 h charakteryzowały się bulwy ziemniaka nawożonego koniczyną perską zarówno przyoraną jesienią, jak i pozostawioną do wiosny w formie mulczu oraz mieszanką koniczyny perskiej z życicą westerwoldzką pozostawioną do wiosny w formie mulczu w ekologicznym systemie produkcji, a najintensywniejszym nasileniem barwy szarej bulwy ziemniaka zebrane z obiektu kontrolnego w integrowanym systemie produkcji.

Smakowitość bulw ziemniaka była istotnie różnicowana przez badane czynniki doświadczenia i ich współdziałanie (tab. 5). Nawożenie biomasą wsiewek międzyplonowych wpływało korzystnie na smakowitość bulw ziemniaka. Bulwy nawożone wsiewkami międzyplonowymi wyróżniały się lepszą smakowitością od bulw nawożonych obornikiem i od bulw zebranych z obiektu kontrolnego. Najlepszą smakowitością charakteryzowały się bulwy ziemniaka nawożonego koniczyną perską zarówno przyoraną jesienią, jak i pozostawioną do wiosny w formie mulczu.

Tabela 5

**Smakowitość bulw ziemniaka (średnie z lat 2007–2009) [skala 9°]
Potato tuber flavour (means across 2007–2009) [9-point scale]**

Nawożenie wsiewką międzyplonową Fertilization with undersown catch crop	System produkcji Production system		Średnie Means
	integrowany integrated	ekologiczny organic	
Obiekt kontrolny — Control treatment	6,0	5,5	5,8
Obornik — Farmyard manure	6,7	6,3	6,5
Koniczyna perska — Persian clover	8,0	7,7	7,9
Koniczyna perska + życica westerwoldzka Persian clover + westerwolds ryegrass	7,5	7,0	7,3
Życica westerwoldzka Westerwolds ryegrass	7,1	6,6	6,9
Koniczyna perska-mulcz Persian clover-mulch	8,3	7,8	8,1
Koniczyna perska + życica westerwoldzka-mulcz Persian clover + westerwolds ryegrass-mulch	7,6	7,1	7,4
Życica westerwoldzka-mulcz — Westerwolds ryegrass-mulch	7,3	6,9	7,1
Średnie — Means	7,3	6,9	-
NIR _{0,05} — LSD _{0,05}			
Nawożenie wsiewką międzyplonową — Fertilization with undersown catch crop			0,3
System produkcji — Production system			0,2
Interakcja — Interaction			0,4

Smakowitość bulw ziemniaka różnicował także system produkcji. Bulwy ziemniaka uprawianego w integrowanym systemie produkcji charakteryzowały się lepszą smakowitością niż pochodzące z ekologicznego systemu produkcji. Wykazano współdziałanie nawożenia biomasą wsiewek międzyplonowych z systemem produkcji, z którego wynika, że najlepszym smakiem wyróżniały się bulwy ziemniaka nawożonego koniczyną perską zarówno przyoraną jesienią, jak i pozostawioną do wiosny w formie mulczu w integrowanym systemie produkcji, a najgorszym smakiem bulwy zebrane z obiektu kontrolnego w ekologicznym systemie produkcji.

DYSKUSJA

Z punktu widzenia wartości konsumpcyjnej ziemniaka jadalnego istotna jest ocena stopnia ciemnienia miąższu surowego i ugotowanego oraz smakowitość bulw (Zgórska i Frydecka-Mazurczyk, 2000; Grudzińska i Zgórska, 2006; Kaźmierczak i Rychlik, 2014). Zdaniem Zgórskiej i Frydeckiej-Mazurczyk (2000) oraz Kaabera i in. (2002) brązowienie (ciemnienie ziemniaków) pomimo, że nie oddziałuje na smak i wartość żywieniową stanowi poważny problem w przemyśle spożywczym. Ciemnienie miąższu bulw surowych jest skutkiem enzymatycznego utleniania związków fenolowych. Ciemnienie bulw gotowanych jest z kolei procesem nieenzymatycznym. Intensywność ciemnienia zależy od zawartości związków fenolowych i jest w znacznej mierze cechą genetyczną. Ilość tych związków zależy od warunków edaficznych m.in. typu gleby, warunków meteorologicznych w okresie wegetacji, nawożenia oraz stopnia dojrzałości bulw, itp. (Sawicka, 1991; Zgórska i Frydecka-Mazurczyk, 2000; Ding i in. 2005; Zarzecka i in.,

2011). W badaniach własnych nawożenie biomasą wsiewek międzyplonowych istotnie modyfikowało ciemnienie miąższu bulw. Na obiektach nawożonych koniczyną perską zarówno przyoraną jesienią, jak i pozostawioną do wiosny w formie mulczu oraz na obiekcie nawożonym mieszanką koniczyny perskiej z życicą westerwoldzką stosowaną w formie mulczu odnotowano najniższy stopień ciemnienia miąższu surowego i ugotowanego bulw ziemniaka. Na pozostałych obiektach nawożonych biomasą wsiewek międzyplonowych, z wyjątkiem życicy westerwoldzkiej przyoranej jesienią stopień ciemnienia miąższu bulw nie różnił się istotnie od odnotowanego na oborniku. Również badania Płazy i in. (2010) oraz Makarewicza i in. (2014) wykazały, że ziemniaki uprawiane po międzyplonach, z wyjątkiem gorczycy białej wykazały mniejszą tendencję do ciemnienia miąższu surowego i ugotowanego niż bulwy ziemniaka uprawianego na obiekcie kontrolnym. Powyższą zależność potwierdzają badania Ceglarka i in. (1998) oraz Różyły (2002), którzy wykazali, że ziemniaki uprawiane tylko na nawozach mineralnych charakteryzowały się większym nasileniem barwy szarej niż ziemniaki uprawiane na oborniku czy nawozach zielonych. Jest to zbieżne z wynikami badań własnych.

System produkcji także istotnie różnicował ciemnienie miąższu bulw surowych. W przeprowadzonym doświadczeniu ziemniaki uprawiane w ekologicznym systemie produkcji wyróżniały się niższym stopniem ciemnienia miąższu surowego i ugotowanego bulw niż ziemniaki uprawiane w integrowanym systemie produkcji. Jest to zbieżne z wynikami badań Sawickiej i Kusia (2002), Danilčenko i Trečioakaite-Jarine (2002), Sawickiej i in. (2006), Zarzyńskiej i Goliszewskiego (2006) oraz Savage i in., (2007), którzy wykazali, że bulwy z systemu ekologicznego w porównaniu z integrowanym odznaczały się mniejszym ciemnieniem miąższu surowego i ugotowanego.

Smakowitość uznawana jest za najbardziej subiektywną cechę charakteryzującą ziemniaki jadalne. W omawianym doświadczeniu wykazano, że smakowitość bulw ziemniaka nawożonego biomasą wsiewek międzyplonowych zarówno przyoranych jesienią, jak i pozostawionych do wiosny w formie mulczu dorównywała, a nawet przewyższała smakowitość bulw ziemniaka nawożonego obornikiem. Na szczególne podkreślenie zasługuje tu koniczyna perska zarówno przyorana jesienią, jak i pozostawiona do wiosny w formie mulczu, po zastosowaniu której ziemniaki charakteryzowały się najlepszym smakiem. Jest to zbieżne z wynikami badań Ceglarka i in. (1998), Różyły (2002) oraz Płazy i in. (2010). Należy tłumaczyć to tym, iż stanowiska dla ziemniaka jadalnego użyźnione roślinami bobowatymi charakteryzują się lepszym zbilansowaniem składników odżywczych oraz prawidłowym przebiegiem procesu ich udostępniania dla roślin.

System produkcji także różnicował smakowitość bulw ziemniaka. W badaniach własnych wykazano, że ziemniaki uprawiane w integrowanym systemie produkcji charakteryzowały się lepszym smakiem niż pochodzące z ekologicznego systemu produkcji. Wyniki szczegółowych badań prowadzonych w Szwecji (Warman i Havard, 1998) pokazują, że ziemniaki wyprodukowane w gospodarstwach ekologicznych charakteryzowały się wyższą oceną smakową niż w gospodarstwach konwencjonalnych. Badania Zarzyńskiej i Goliszewskiego (2006) potwierdzają lepszą smakowitość bulw pochodzących z upraw ekologicznych. Powyższe rozbieżności wynikają ze zróżnico-

wanego składu chemicznego bulw ziemniaka. Ziemniaki pochodzące z upraw konwencjonalnych zawierają więcej składników mineralnych, w tym azotanów, stąd ich smakowitość jest gorsza.

Ziemniak przeznaczony do bezpośredniego spożycia powinien charakteryzować się, jak najlepszymi cechami konsumpcyjnymi. Zauważa się tu korzystne oddziaływanie wsiewek międzyplonowych, a zwłaszcza koniczyny perskiej.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. Cechy konsumpcyjne bulw ziemniaka (ciemnienie mięszu surowego i ugotowanego oraz smakowitość) nawożonego biomasą wsiewek międzyplonowych były zbliżone do występujących na oborniku.
2. Najlepszą jakością konsumpcyjną, a zwłaszcza smakowitością wyróżniały się bulwy ziemniaka nawożonego biomasą koniczyny perskiej, zarówno przyoranej jesienią, jak i pozostawionej do wiosny w formie mulczu.
3. Ciemnienie mięszu surowego i ugotowanego bulw ziemniaka uprawianego w ekologicznym systemie produkcji było istotnie mniejsze niż w systemie integrowanym, natomiast smakowitość bulw ziemniaka była lepsza w integrowanym systemie produkcji.
4. Nawożenie wsiewkami międzyplonowymi, zarówno w integrowanym, jak i ekologicznym systemie produkcji wpływa korzystnie na cechy konsumpcyjne bulw ziemniaka.

LITERATURA

- Ceglarek F., Płaza A., Buraczyńska D., Jabłońska-Ceglarek R. 1998. Alternatywne nawożenie organiczne ziemniaka jadalnego w makroregionie środkowo-wschodnim. Cz. II. Wartość odżywcza i konsumpcyjna ziemniaka. *Rocz. Nauk Rol.*, Ser. A, T. 113, Zesz. 2-3: 189 — 201.
- Daniłchenko H., Trečiokaite-Jarine E. 2002. Wpływ ekologicznego i integrowanego systemu produkcji ziemniaków na skład chemiczny bulw i jakość otrzymanych produktów. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 489: 309 — 318.
- Ding C. K., Chachin K., Ueda Y., Wang C. Y. 2002. Inhibition of loquat enzymatic browning by sulphhydryl compounds. *Food Chem.* 76: 213 — 218.
- Grudzińska M., Zgórska K. 2006. Ciemnienie enzymatyczne miazgi bulw ziemniaka w zależności od odmiany. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 511: 579 — 584.
- Hamouz K., Lachman J., Dvořák P., Pivec V. 2005. The effect of ecological growing on the potatoes yields and quality. *Plant Soil Environ.* 51: 397 — 402.
- Kaaber L., Martinsen B. K., Brathen E., Shomer I. 2002. Browning inhibition and textural changes of pre-peeled potatoes caused by anaerobic conditions. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 35 (6): 526 — 531.
- Kaźmierczak M., Rychlik B. 2014. Wpływ systemu uprawy ziemniaków na ciemnienie mięszu bulw. *Mat. konf. nauk. nt. „Nasiennictwo i ochrona ziemniaka”*. IHAR Radzików, ZN i OZ Bonin: 19 — 20.
- Makarewicz A., Płaza A., Gąsiorowska B., Królikowska M. A. 2014. Wybrane cechy konsumpcyjne bulw ziemniaka w integrowany i ekologicznym systemie produkcji. *Biul. IHAR* 273: 73 — 82.
- Płaza A., Ceglarek F., Królikowska M. A. 2010. The influence of intercrops and farmyard manure fertilization in changeable weather conditions on consumption value of potato tubers. *J. Centr. Europ. Agric.* 11 (1): 47 — 54.

- Różyło K. 2002. Wstępna ocena walorów konsumpcyjnych odmiany Irga różnie nawożonej na glebie lekkiej i ciężkiej. Mat. konf. nauk. nt. „Ziemniak spożywczy i przemysłowy oraz jego przetwarzanie. Perspektywy ekologicznej produkcji ziemniaka w Polsce”, AR Wrocław: 97 — 98.
- Savage G. P., Searle B. P., Hellenäs K. E. 2007. Glycoalkaloid content, cooking quality and sensory evaluation of early introductions of potatoes into New Zealand. *Potato Res.* 43 (1): 1 — 7.
- Sawicka B. 1991. Próba ustalenia niektórych czynników środowiska i zabiegów agrotechnicznych na ciemnienie miąższu bulw ziemniaka. *Biul. IHAR* 179: 67 — 75.
- Sawicka B. 2000. Wpływ technologii produkcji na jakość bulw ziemniaka. *Pam. Puł.* 120: 391 — 401.
- Sawicka B., Kuś J. 2002. Zmienność składu chemicznego bulw ziemniaka w warunkach ekologicznego i integrowanego systemu produkcji. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 489: 273 — 282.
- Sawicka B., Kuś J., Barbaś P. 2006. Ciemnienie miąższu bulw ziemniaka w warunkach ekologicznego i integrowanego systemu uprawy. *Pam. Puł.* 142: 445 — 457.
- Smith O. 2007. Potato quality X. Post harvest treatment to prevent after cooking darkening. *Am. J. Potato Res.* 35 (7): 573 — 584.
- Warman P. R., Havard K. A. 1998. Yield, vitamin and mineral contents of organically and conventionally grown potatoes and seed corn. *Agric. Ecosyst. Environ.* 68 (3): 207 — 216.
- Zarzecka K., Zadrozniak B., Gugała M. 2011. Wpływ insektycydów na cechy konsumpcyjne bulw ziemniaka. *Fragm. Agron.* 28 (3): 129 — 138.
- Zarzyńska K., Goliszewski W. 2006. Uprawa ziemniaka w systemie ekologicznym i integrowanym a jakość plonu bulw. *Pam. Puł.* 142: 617 — 626.
- Zgórska K., Frydecka-Mazurczyk A. 2000. Wpływ warunków w czasie wegetacji oraz temperatury przechowywania na cechy jakości ziemniaków przeznaczonych do przetwórstwa. *Biul. IHAR* 213: 239 — 251.

CEZARY TRAWCZYŃSKI

Zakład Agronomii Ziemiaka

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — PIB, Oddział Jadwisin

Wpływ nawożenia mineralnego azotem na plon i jakość bulw nowych odmian ziemniaka

The influence of mineral nitrogen fertilization on the yield and tuber quality of new potato cultivars

Celem doświadczeń było określenie wpływu zróżnicowanego poziomu nawożenia mineralnego azotem oraz właściwości odmian ziemniaka na plon bulw, udział w plonie bulw zdeformowanych, zazielenionych i porażonych parchem zwykłym oraz na zawartość skrobi, azotanów i suchej masy w bulwach. Dla odmian ustalono wymagania nawozowe pod względem dawki azotu oraz jej efektywność. Badania przeprowadzono na glebie lekkiej, na której przyorano słomę i poplon z gorczycy białej. Zastosowano zróżnicowany poziom nawożenia mineralnego azotem: 0, 50, 100, 150 i 200 kg N·ha⁻¹ oraz jednakową dawkę fosforu — 17,5 kg P·ha⁻¹ i potasu — 99,6 kg K·ha⁻¹. Przebadano trzy odmiany jadalne: dwie średnio wczesne Bursztyn i Etiuda oraz jedną średnio późną — Zenia. Badane odmiany charakteryzowały się średnimi wymaganiami odnośnie azotu mineralnego. Uzyskano jednakową efektywność agronomiczną maksymalnej dawki azotu dla odmian Bursztyn i Etiuda (96 kg bulw na 1 kg N) i większą dla odmiany Zenia (119 kg bulw na 1 kg N). Nawożenie mineralne azotem od 0 do 200 kg N·ha⁻¹ miało istotny wpływ na zawartość skrobi, suchej masy i azotanów w bulwach lecz nie wpływało na udział w plonie bulw zdeformowanych, zazielenionych i porażonych parchem zwykłym. Największy plon bulw i najmniejsze stężenie azotanów w bulwach uzyskano w przypadku odmiany Zenia, natomiast istotnie większą zawartość skrobi i suchej masy w bulwach oraz mniejszy udział bulw z wadami wyglądu dla odmian Bursztyn i Etiuda.

Słowa kluczowe: dawki azotu, plon bulw, skład chemiczny bulw, wady bulw, wymagania nawozowe, ziemniak

The aim of the experiments was to determine the impact of different levels of nitrogen fertilization and the characteristics of the cultivars on the potato tuber yield, share of tubers with deformations, greening, infection with common scab as well as starch, nitrate and dry matter contents in tubers. Optimal nitrogen doses and their efficiency were established for the particular cultivars. The experiment was carried on a light soil, on which straw and aftercrop of white mustard were ploughed in. In these experiments 5 levels of mineral nitrogen fertilization were applied: 0, 50, 100, 150 and 200 kg N·ha⁻¹, at the constant levels of phosphorus — 17.5 kg P·ha⁻¹ and potassium — 99.6 kg K·ha⁻¹. Three medium early, table cultivars: Bursztyn, Etiuda and Zenia were tested. Studied cultivars were characterized by medium requirements for mineral nitrogen. The agronomical efficiencies of nitrogen doses for cultivars of

Bursztyn and Etiuda were similar (96 kg of tubers per 1 kg of N) and for cultivar Zenia the efficiency was higher (119 kg of tubers per 1 kg of N). Mineral nitrogen fertilization from 0 to 200 kg N·ha⁻¹ had a significant effect on the starch content, dry matter and nitrate contents in tubers but did not influence the share of deformed tubers, tuber greening and scab infections. The largest tuber yield and the smallest nitrate concentration in tubers were obtained for the cultivar Zenia, but cultivars Bursztyn and Etiuda had significantly higher contents of starch and dry matter in tubers and smaller share of tubers with flaws.

Key words: chemical composition of tubers, defects of tubers, doses of nitrogen, fertilization requirements, potato, tubers yield

WSTĘP

Nawożenie należy do głównych czynników agrotechnicznych decydujących o potencjale plonotwórczym poszczególnych odmian ziemniaka oraz jakości bulw rozumianej jako ich wygląd i zawartość w nich składników (Roztropowicz, 1989; Kalbarczyk, 2003; Dmowski i in., 2004; Sawicka i in., 2011). Spośród makroelementów stosowanych w nawożeniu azot ma decydujący wpływ na plon i jakość bulw, a poszczególne odmiany wykazują zróżnicowaną reakcję na ten składnik (Wierzejska-Bujakowska 1996 a; Jabłoński 2004 a, 2006; Trawczyński, 2004, 2007, 2008). Ustalanie wymagań nawozowych w odniesieniu do corocznie wpisywanych do rejestru nowych odmian umożliwia uzyskanie możliwie największych efektów produkcyjnych (Roztropowicz, Wierzejska-Bujakowska, 1993; Jabłoński 2004 b; Wierzbicka, Lis, 2002; Wierzbicka, 2006; Trawczyński, 2010). Udział bulw z defektami wyglądu oraz o nieodpowiedniej zawartości składników decydują o złej jakości handlowej i żywieniowej bulw ograniczając ich wykorzystanie do spożycia (Nowacki, 2006 a; Rytel, 2010).

Celem badań było określenie wpływu poziomu nawożenia azotem na wielkość plonu bulw, udział bulw z wadami wyglądu, zawartość skrobi, azotanów i suchej masy w bulwach oraz ustalenie zapotrzebowania na azot mineralny nowych odmian ziemniaka.

MATERIAŁ I METODY

W latach 2012–2014 w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — PIB, Oddział Jadwisin, w ścisłych doświadczeniach polowych określono reakcję jadalnych odmian ziemniaka na nawożenie mineralne azotem. Doświadczenia zakładano metodą losowanych podbloków w 3 powtórzeniach. Badanymi czynnikami były: zróżnicowany poziom azotu (0, 50, 100, 150 i 200 kg N·ha⁻¹) oraz trzy odmiany ziemniaka jadalnego: Bursztyn i Etiuda (średnio wczesne) oraz Zenia (średnio późna).

Badania przeprowadzono na glebie lekkiej o składzie granulometrycznym piasku gliniastego (PTG, 2009). Gleba w poszczególnych latach badań wykazywała kwaśny odczyn, wysoką zasobność w przyswajalny fosfor oraz średnią w potas i średnią do wysokiej w magnez (tab. 1).

Lata badań zaliczały się do mokrych, o czym świadczą średnie wartości współczynnika hydrotermicznego Sielianiowa dla okresów wegetacji (tab. 2). Odnotowano jednak znaczne zróżnicowanie wartości współczynnika hydrotermicznego pomiędzy poszczególnymi miesiącami okresu wegetacji w analizowanych latach. W 2012 roku

we wszystkich miesiącach wegetacji było wilgotno, a jedynie we wrześniu wystąpiła posucha. W 2013 roku lipiec był suchy, natomiast pozostałe miesiące zaliczały się do wilgotnych. W 2014 roku susza wystąpiła w lipcu i wrześniu, a w maju zanotowano okres posuchy. Pozostałe miesiące w tych latach należały do wilgotnych.

Tabela 1

Zawartość P, K, Mg w glebie oraz pH gleby
Soil contents of P, K, Mg and pH

Rok Year	pH w KCl pH in KCl	Zawartość w glebie (mg·kg ⁻¹) Content in the soil (mg·kg ⁻¹)		
		P	K	Mg
2012	5,4	85	107	69
2013	5,3	87	124	48
2014	5,0	77	120	34

Tabela 2

Charakterystyka warunków pogody w latach badań na podstawie wartości współczynników
Sielaninova (k)

Weather conditions in the years of testing on a base of Sielianinov's coefficient values (k)

Rok Year	Miesiąc Month						
	IV	V	VI	VII	VIII	IX	IV-IX
2012	2,28	1,21	2,06	1,95	1,61	0,67	1,63
2013	2,68	2,95	2,04	0,29	1,73	2,86	2,09
2014	1,98	0,92	1,47	0,35	1,40	0,26	1,06

K = 0,0-0,5 susza — drought; k = 0,6–1,0 posucha — moderate drought; k >1,0 wilgotno — wet

Nawożenie organiczne pod ziemniaki stanowiła przyorywana po żniwach podorywką słoma pszenna w dawce 4–5 t·ha⁻¹ z dodatkiem azotu mineralnego (1 kg N na 100 kg słomy) oraz przyorywana jesienią orką przedzimową zielona masa poplonu ścierniskowego z gorczycy białej w dawce 15–16 t·ha⁻¹. Nawożenie mineralne fosforem i potasem stosowano w oparciu o zasobność gleby w przyswajalne formy tych składników. Każdego roku jesienią przed wykonaniem orki przedzimowej stosowano 17,5 kg·ha⁻¹ P (superfosfat wzbogacony — 17,4% P) i 99,6 kg·ha⁻¹ K (sól potasowa — 49,8% K). Nawożenie mineralne azotem (saletszak 27% N) stosowano wiosną bezpośrednio przed sadzeniem bulw do dawki 100 kg·ha⁻¹ N oraz uzupełniającą ilość odpowiednio 50 i 100 kg·ha⁻¹ N (na obiektach z dawkami 150 i 200 kg·ha⁻¹ N) bezpośrednio przed wschodami roślin ziemniaka, przed ostatnim obredlaniem.

Chwasty niszczone mechanicznie i chemicznie, do wschodów roślin ziemniaka stosowano 2-krotnie obsypnik z łańcuchami, a bezpośrednio przed wschodami, po ostatnim obredleniu zastosowano Afalon 450SC oraz po wschodach roślin ziemniaka Titus 23WG. W okresie wegetacji 4–5 razy przeprowadzano zabiegi ochronne przeciwko zarazie ziemniaka oraz 2–3 razy zwalczające stonkę.

Ziemniaki sadzono ręcznie w III dekadzie kwietnia w rozstawie 75×33 cm, a zbierano w III dekadzie września. Powierzchnia poletka wynosiła 14,85 m². Podczas zbioru określono masę plonu bulw z każdego poletka oraz zgodnie z metodyką pobierano 5-

kilogramowe próby w celu określenia udziału bulw z wadami zewnętrznymi w plonie (zdeformowane, zazielenione, porażone parchem zwykłym) — Roztropowicz (1999). Na podstawie średnich prób obiektowych oznaczono zawartość skrobi, azotanów i suchej masy w bulwach. Zawartość skrobi oznaczono metodą polarymetryczną Eversa (hydrolizę skrobi przeprowadzono we wrzącej łązni wodnej, a następnie wytrącono białko przy pomocy kwasu fosforowo-wolframowego) z dokonaniem odczytów na automatycznym polarymetrze Polamat S. Zawartość azotanów (NO_3^-) oznaczono reflektometrycznie przy użyciu przyrządu pomiarowego RQ Flex Merck według metodyki Merck. Suchą masę oznaczono metodą suszarkową, poprzez suszenie naważki miazgi ziemniaczanej w temperaturze 60°C , a następnie dosuszanie w temperaturze 105°C .

Z zależności pomiędzy wielkością uzyskanego plonu bulw a zastosowanymi dawkami azotu określono zapotrzebowanie odmian na azot. Na podstawie parametrów funkcji kwadratowej $Y = a + bX + cX^2$, gdzie Y = plon bulw; X = dawka azotu; a = plon przy dawce $0 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1} \text{ N}$; b = przyrost plonu na 1 kg dawki N ; c = współczynnik zmniejszającego się przyrostu plonu, wyznaczono wielkość maksymalnej dawki azotu $X_{\max} = -b/2c$. Następnie wyliczono plon bulw dla maksymalnej dawki azotu $Y_{\max} = (a - b^2/4c)$ oraz efektywność agronomiczną maksymalnej dawki azotu $E_A = (Y_N - Y_0)/N$, gdzie Y_N = plon bulw przy maksymalnej dawce azotu; Y_0 = plon bulw na obiekcie bez azotu; N = dawka azotu (Mercik, 2002). Określenie wymagań względem dawki azotu mineralnego dla badanych odmian przeprowadzono przy zastosowaniu ustalonego na podstawie wieloletnich badań podziału odmian ziemniaka na 3 grupy: o małych (poniżej 145), średnich (145–177) i dużych wymaganiach (powyżej $177 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1} \text{ N}$) — Wierzejska-Bujakowska, 1996 a; Trawczyński, 2004.

Wyniki doświadczeń opracowano statystycznie posługując się analizą wariancji dwuczynnikowej i regresji kwadratowej. Analizę porównania średnich przeprowadzono z wykorzystaniem testu Tukeya na poziomie $p = 0,05$.

WYNIKI I DYSKUSJA

Wielkość uzyskanego plonu bulw była istotnie zróżnicowana w odniesieniu do badanych czynników, zarówno poziomu nawożenia mineralnego azotem, jak i odmian. Istotnie największy plon bulw stwierdzono po zastosowaniu dawki $150 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$. Zwiększenie dawki do $200 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$ spowodowało istotne obniżenie plonu bulw w porównaniu do dawki azotu $150 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ (tab. 3). Podobną reakcję na zastosowaną dawkę azotu stwierdzono u wszystkich analizowanych odmian. Niezależnie od wielkości zastosowanej dawki azotu istotnie największy plon bulw uzyskano dla odmiany Zenia, a odmiany Bursztyn i Etiuda nie różniły się istotnie pod tym względem (tab. 3).

Zależność pomiędzy plonem i wzrastającymi dawkami azotu dla badanych odmian miała układ paraboliczny (tab. 4), co było potwierdzeniem wcześniejszych doniesień w stosunku do wielu odmian (Jabłoński, 2002, 2004 a, 2004 b, 2006; Trawczyński, 2004, 2007; Trawczyński, Wierzbicka, 2011; Wierzbicka, Lis, 2002; Wierzbicka, 2006). Na podstawie regresji obliczono, że maksymalna dawka azotu dla przebadanych odmian wynosiła od 141 do $144 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ (tab. 4). W odniesieniu do ustalonego podziału pod

względem zapotrzebowania roślin ziemniaka na azot mineralny odmiany zaliczono do grupy o średnich wymaganiach (Trawczyński, 2004), a efektywność nawożenia przy maksymalnej dawce azotu wyniosła 96 kg bulw na 1 kg zastosowanego azotu dla odmian Bursztyn i Etiuda oraz 119 kg bulw u odmiany Zenia (tab. 4).

Tabela 3

Wpływ dawek azotu na plon bulw badanych odmian ($t \cdot ha^{-1}$). Lata 2012–2014
The influence nitrogen doses on the tubers yield of investigation cultivars ($t \cdot ha^{-1}$). Years 2012–2014

Odmiana Cultivar	Dawka N $kg \cdot ha^{-1}$ Dose of N $kg \cdot ha^{-1}$					Średnio Mean
	0	50	100	150	200	
Bursztyn	41,1	48,3	53,3	55,1	52,2	50,0
Etiuda	41,7	46,3	53,5	56,1	51,4	49,8
Zenia	42,8	51,6	57,9	59,8	56,0	53,6
Średnia — Mean	41,9	48,7	54,9	57,0	53,2	
NIR _{0,05} — LSD _{0,05}			1,8			1,2

Dla współdziałania odmiany $\times$ dawki — r.n.; For interaction cultivars $\times$ doses — n.s.

Tabela 4

Parametry równań określające wielkość i efektywność maksymalnej dawki azotu, plon oraz wymagania nawozowe odmian (lata 2012–2014)
Equation parameters to determine the amount and efficiency of maximum nitrogen dose, yield and fertilization requirements of the potato cultivars (years 2012–2014)

Odmiana Cultivar	Parametry równań Equations parameters			Wielkość maksymalnej dawki N ($kg \cdot ha^{-1}$) Maximum N dose ($kg \cdot ha^{-1}$)	Plon bulw ($t \cdot ha^{-1}$) Yield of tubers ($t \cdot ha^{-1}$)	Efektywność agronomiczna (kg bulw na 1 kg N) Agronomical efficiency (kg tubers per 1 kg N)	Wymagania nawozowe Fertilization requirements
	a	b	c				
Bursztyn	40,9	0,1924	0,0007	143	54,6	96	średnie*
Etiuda	40,7	0,1917	0,0007	144	54,5	96	średnie*
Zenia	42,5	0,2378	0,0008	141	59,3	119	średnie*

*medium

Producenci ziemniaków jadalnych dążą do uzyskania jak największego udziału w plonie ogólnym handlowego plonu bulw, który decyduje o opłacalności uprawy ziemniaka (Nowacki, 2006 b, 2009, 2010). Duży udział plonu handlowego w ogólnym wyniku między innymi z możliwie najmniejszego udziału w plonie bulw z wadami wyglądu takich jak: deformacje, zazielenienia czy porażenie parchem. Największy udział w plonie ogólnym badanych odmian bulw z wadami stanowiły bulwy zdeformowane, mniejszy bulwy zazielenione, a najmniejszy bulwy porażone parchem zwykłym (tab. 5). Stwierdzono, że zarówno udział w plonie bulw zdeformowanych, zazielenionych oraz porażonych parchem zwykłym analizowany oddzielnie, jak również łącznie jako suma wad nie zależał od nawożenia mineralnego azotem. W dotychczas przeprowadzonych badaniach wykazano, że procesy prowadzące do powstawania deformacji i innych wad wyglądu bulw miały miejsce w okresie nagromadzania plonu. Najczęstszą przyczyną ich powstawania były: niewłaściwe zaopatrzenie roślin w wodę, wystąpienie stresu wysokiej temperatury,

porażenie przez patogeny, głównie *R. solani*, a z czynników agrotechnicznych uprawa gleby (Krzysztofik, 2010; Levy, 1986; Lutomirska, Jankowska, 2012). Zdaniem niektórych autorów występowanie w plonie bulw z wadami stanowi cechę odmianową (Nowacki, 2006 a; Lutomirska, Jankowska, 2012). Najwięcej bulw zdeformowanych i porażonych parchem zwykłym stwierdzono u odmiany Zenia, odpowiednio 8,7 i 2,3%, a bulw zazielenionych u odmiany Etiuda — 3,2%. W badaniach Lutomirskiej i Jankowskiej (2012) udział w plonie bulw zdeformowanych w grupie odmian średnio wczesnych wahał się od 2,4 do 27,6%. W łącznej ocenie istotnie większy procent bulw z wadami — 13,2% wykazano dla odmiany Zenia, a istotnie mniejszy — średnio 9,35% u odmian Bursztyn i Etiuda (tab. 5).

Tabela 5

Średni udział bulw zdeformowanych, zazielenionych, porażonych parchem zwykłym i bulw z wadami łącznie w plonie trzech odmian ziemniaka. Lata 2012–2014
Mean share of deformed tubers, greening, common scab infection and sum of defects in the yield of three potato cultivars. Years 2012–2014

Odmiana Cultivars	Procentowy udział bulw Percentage of tubers			Wady łącznie Sum of defects
	zdeformowanych deformed	zazielenionych greening	z parchem zwykłym with common scab	
Bursztyn	6,9	2,2	0,3	9,4
Etiuda	5,3	3,2	0,8	9,3
Zenia	8,7	2,2	2,3	13,2
NIR _{0,05} — LSD _{0,05}	2,0	0,7	0,8	2,1

Analiza składu chemicznego bulw wykazała, że poziom nawożenia mineralnego azotem i różnice odmianowe miały istotny statystycznie wpływ na zawartość skrobi, azotanów i suchej masy w bulwach. Przyrost zawartości skrobi w bulwach zanotowano do dawki 100 kg N·ha⁻¹. Pod wpływem dawki azotu 150 i 200 kg N·ha⁻¹ zawartość skrobi w bulwach uległa istotnemu obniżeniu (tab. 6).

Tabela 6

Wpływ dawek azotu na procentową zawartość skrobi w bulwach badanych odmian. Lata 2012–2014
The influence of nitrogen doses on content of starch in tubers of the investigated cultivars. Years 2012–2014

Odmiana Cultivar	Dawka N kg·ha ⁻¹ Dose of N kg·ha ⁻¹					Średnia Mean
	0	50	100	150	200	
Bursztyn	15,9	16,2	16,5	16,0	15,7	16,1
Etiuda	15,9	16,1	16,4	16,1	15,7	16,0
Zenia	13,4	13,8	14,5	14,0	13,5	13,8
Średnia — Mean	15,1	15,4	15,8	15,3	15,0	
NIR _{0,05} — LSD _{0,05}			0,2			0,2

Dla współdziałania odmiany × dawki — 0,3; For interaction cultivars × doses — 0.3

Zbieżność wyników odnośnie niekorzystnego oddziaływania dużych dawek azotu na zawartość skrobi w bulwach potwierdzili inni badacze (Wierzejska-Bujakowska, 1996 b; Jabłoński, 2002, 2004 a; Dmowski i in., 2004; Trawczyński, 2007; Wierzbicka, 2012). W

odniesieniu do właściwości genotypowych wykazano, że odmiany Bursztyn i Etiuda charakteryzowały się istotnie większą zawartością skrobi w bulwach niż odmiana Zenia (tab. 6).

Podobnie jak w przypadku zawartości skrobi w bulwach wykazano większy wpływ poziomu nawożenia mineralnego azotem na gromadzenie azotanów w bulwach (od 37 do 85 mg·kg⁻¹ świeżej masy bulw) niż wpływ odmian (od 58 do 66 mg·kg⁻¹ świeżej masy bulw). Istotny przyrost zawartości azotanów w bulwach badanych odmian stwierdzono pod wpływem wzrostu dawki azotu do 200 kg N·ha⁻¹ (tab. 7). Jednak nawet przy dawce 200 kg N·ha⁻¹ wykazano, że była to niska skłonność do kumulowania azotanów, poniżej 100 mg·kg⁻¹ świeżej masy bulw (Nowacki i in., 2014). Największym przyrostem zawartości azotanów w bulwach w przedziale dawek N od poziomu 0 do 200 kg N·ha⁻¹, cechowała się odmiana Zenia (o 55 mg·kg⁻¹), zaś najmniejszym odmiana Bursztyn (o 41 mg·kg⁻¹). Niezależnie od wielkości zastosowanej dawki azotu wykazano, że bulwy odmiany Zenia i Bursztyn zawierały istotnie mniej azotanów w porównaniu do bulw odmiany Etiuda (tab. 7).

Tabela 7

Wpływ dawek azotu na zawartość azotanów (mg NO₃·kg⁻¹ świeżej masy) w bulwach badanych odmian. Lata 2012–2014

The influence of nitrogen doses on the content of nitrates (mg NO₃·kg⁻¹ fresh weight) in tubers of the investigated cultivars. Years 2012–2014

Odmiana Cultivar	Dawka N kg ha ⁻¹ Dose of N kg ha ⁻¹					Średnio Mean
	0	50	100	150	200	
Bursztyn	39	50	63	67	80	60
Etiuda	42	58	68	73	91	66
Zenia	29	47	55	75	84	58
Średnia — Mean	37	52	62	72	85	
NIR _{0,05} — LSD _{0,05}			10			5

Dla współdziałania odmiany × dawki — 12; For interaction cultivars × doses — 12

Zawartość suchej masy w bulwach była skorelowana ze zmianami zawartości skrobi w zależności od czynnika nawozowego. Pod wpływem dawek 150 i 200 kg N·ha⁻¹ wykazano istotne obniżenie zawartości suchej masy w bulwach w porównaniu do dawki 100 kg N·ha⁻¹ (tab. 8). Stwierdzono ponadto istotne różnice pod względem zawartości suchej masy w bulwach u badanych odmian. Bulwy odmiany Bursztyn charakteryzowały się największą, a bulwy odmiany Zenia najmniejszą zawartością suchej masy w bulwach (tab. 8). Wielu badaczy podkreśla, że zawartość suchej masy w największym stopniu uwarunkowana jest czynnikiem genetycznym, ale podlegać może zmianom pod wpływem agrotechniki, w tym nawożenia (Simmonds, 1977; Silva; Leszczyński, 1994, 2002; Holden i in., 2003; Wierzbicka i in., 2008).

Tabela 8

**Wpływ dawek azotu na procentową zawartość suchej masy w bulwach badanych odmian.
Lata 2012–2014**

**The influence of nitrogen doses on dry matter content in tubers of the investigated cultivars.
Years 2012–2014**

Odmiana Cultivar	Dawka N kg·ha ⁻¹ Dose of N kg·ha ⁻¹					Średnio Mean
	0	50	100	150	200	
Bursztyn	24,3	24,5	25,2	25,0	24,4	24,7
Etiuda	23,7	24,0	24,2	24,1	23,8	23,9
Zenia	20,6	20,6	22,9	21,1	20,5	21,1
Średnia — Mean	22,9	23,0	24,1	23,4	22,9	
NIR _{0,05} — LSD _{0,05}			0,2			0,1

dla współdziałania odmiany × dawki — 0,3; for interaction cultivars × doses — 0.3

Analiza wielkości uzyskanego plonu, wad wyglądu bulw oraz zawartości składników w bulwach wykazała istotne ich zróżnicowanie przez układ warunków pogodowych w latach badań (tab. 9).

Tabela 9

**Wpływ lat badań na plon i jakość bulw
The influence of investigation years on the yield and tubers quality**

Cecha Feature	Lata Years			NIR _{0,05} LSD _{0,05}
	2012	2013	2014	
Plon bulw — Tubers yield (t·ha ⁻¹)	60,3	41,0	52,2	1,2
Deformacje — Deformations (%)	4,7	9,3	7,2	2,0
Zazielenienia — Green tubers (%)	3,0	2,5	4,5	0,9
Parch zwykły — Common scab (%)	2,2	0,4	0,8	0,8
Suma wad — Sum of defects (%)	9,9	12,2	12,5	2,1
Skrobia — Starch (%)	15,5	13,9	15,0	0,4
Azotany — Nitrates (mg·kg ⁻¹)	34,6	78,2	72,2	8,2
Sucha masa — Dry matter (%)	24,8	20,7	24,3	0,2

Porównanie poziomu plonowania w kolejnych latach pozwoliło stwierdzić, że warunki pogodowe okresu wegetacji w 2012 roku były najbardziej sprzyjające, istotnie mniej korzystne w 2014 roku i najmniej korzystne w 2013 roku. Różnica plonu bulw pomiędzy skrajnymi latami wynosiła ponad 30%. Sawicka i in. (2011) stwierdzili, że zmienność plonu bulw ziemniaka determinowana przebiegiem pogody w latach skrajnych może dochodzić do 80%. Spośród analizowanych wad największe różnice pomiędzy latami dotyczyły procentowego udziału w plonie bulw zdeformowanych. Lutomińska i Jankowska (2012) wykazały, że wraz ze wzrostem współczynnika Sielininova od 0,3 do 3,0, czyli w zakresie zmiany warunków glebowych z suszy do wysokiej wilgotności zwiększył się istotnie w zbieranym plonie udział bulw zdeformowanych. W przeprowadzonych badaniach największy udział bulw zdeformowanych w plonie uzyskano w roku, w którym od maja do września wartość współczynnika Sielininova wahała się od 0,29 do 2,95, a najmniejszy udział w roku o współczynniku w zakresie od 1,21 do 2,06. W najbardziej sprzyjającym plonowaniu roku badań (2012) uzyskano w łącznej ocenie istotnie najmniejszy udział bulw z wadami w plonie, a w latach 2012 i 2014 istotnie większą

zawartość skrobi i suchej masy w bulwach, niż w 2013 roku, bardzo mokrym, z wyjątkiem miesiąca lipca, kiedy wystąpiła susza. Wykazano ponadto, że lata 2013 i 2014 z bardziej zmiennym w okresie wegetacji układem warunków termiczno-wilgotnościowych (wyrażonych współczynnikiem Sielianinowa) wpłynęły na istotne zwiększenie zawartości azotanów w bulwach w porównaniu do roku 2012, o bardziej wyrównanych wartościach współczynnika Sielianinowa w okresie wegetacji, co potwierdzają wcześniejsze badania (Reda, Łojkowska, 1993; Lis, 1996; Wierzbicka, Trawczyński, 2011; Trawczyński, Wierzbicka, 2012). W obecnie przeprowadzonych badaniach wykazano, że w roku o odpowiednich warunkach termiczno-wilgotnościowych w głównym okresie rozwoju roślin (czerwiec, lipiec, sierpień) uzyskuje się duży potencjał plonotwórczy bulw, mniejszy udział w plonie bulw z wadami, wzrost zawartości skrobi i suchej masy oraz obniżenie kumulacji azotanów w bulwach, niż w latach z wysoką amplitudą wahań warunków termiczno-wilgotnościowych, podobnie jak w pracach Kołodziejczyk i Szmigiel (2012), Pytlarz-Kozickiej (2002) i Wierzbickiej (2012).

WNIOSKI

1. Na podstawie reakcji plonu bulw na wzrastający poziom nawożenia mineralnego azotem obliczono, że uprawiając na glebie lekkiej odmiany: Bursztyn, Etiuda i Zenia należy zastosować dawkę $120 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$.
2. Nawożenie azotem mineralnym do $100 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$ spowodowało istotny przyrost zawartości skrobi i suchej masy w bulwach. Zawartość azotanów w bulwach wzrastała wraz z nawożeniem azotowym do $200 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$, ale nawet taka dawka nie wpłynęła negatywnie na jakość bulw ziemniaka pod względem tej cechy.
3. Udział w plonie bulw zdeformowanych, zazielenionych i porażonych parchem zwykłym zależała od odmiany, nie zależała od dawki nawożenia azotem.
4. Niezależnie od wielkości zastosowanej dawki azotu odmiana Zenia charakteryzowała się istotnie największym plonem bulw i najmniejszą zawartością azotanów w bulwach, a odmiany Bursztyn i Etiuda istotnie większą zawartością skrobi i suchej masy w bulwach oraz istotnie mniejszym udziałem bulw z wadami wyglądu niż odmiana Zenia.

LITERATURA

- Dmowski Z., Nowak L., Chmura K. 2004. Reakcja odmian ziemniaka o różnej długości wegetacji na zróżnicowane warunki wodno-nawozowe. Biul. IHAR 232: 141 — 148.
- Holden N. W. M., Brereton A. J., Sweeney J., Fealy R. 2003. The predicted change in Irish climate and its impact on barley and potato yields. Agric. For. Meteorol. 116: 181 — 196.
- Jabłoński K. 2002. Wpływ poziomu nawożenia azotowego nowych odmian ziemniaków jadalnych w latach 1998–2000 na plon i jego jakość oraz trwałość przechowalniczą. Zesz. Prob. Post. Nauk Rol. z. 484: 211 — 217.
- Jabłoński K. 2004 a. Wpływ nawożenia azotowego na plon i jakość nowych odmian ziemniaka jadalnego uprawianych na glebach średnio zwięzłych. Biul. IHAR 232: 157 — 165.
- Jabłoński K. 2004 b. Efektywność nawożenia azotem nowych odmian ziemniaków skrobiowych. Zesz. Prob. Post. Nauk Rol. z. 500: 253 — 262.
- Jabłoński K. 2006. Wpływ poziomu nawożenia azotem na plon i zawartość skrobi oraz na jakość nowych odmian ziemniaka. Zesz. Prob. Post. Nauk Rol. z. 512: 193 — 200.

- Kalbarczyk R. 2003. Warunki termiczno-opadowe a plonowanie ziemniaka w Polsce. *Ann. UMCS, Sect. E Agricultura* 58: 35 — 44.
- Kołodziejczyk M., Szmigiel A. 2012. Skład chemiczny oraz wybrane parametry jakości bulw ziemniaka w zależności od terminu i stopnia redukcji powierzchni asymilacyjnej roślin. *Fragm. Agron.* 29 (3): 88 — 94.
- Krzysztofik B. 2010. Wpływ sposobu uprawy roli na niektóre cechy trzech odmian ziemniaka. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 557: 183 — 192.
- Leszczyński W. 1994. Wpływ czynników działających w okresie wegetacji ziemniaka na jego jakość. *Post. Nauk Rol.* 41/46 (6): 55 — 68.
- Leszczyński W. 2002. Zależność jakości ziemniaka od stosowania w uprawie nawozów i pestycydów. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 489: 47 — 64.
- Levy D. 1986. Genotypic variation in response of potatoes (*Solanum tuberosum* L.) to high ambient temperature and water deficit. *Field Crops Res.* 15: 85 — 96.
- Lis B. 1996. Wpływ długości okresu wegetacji odmian i nawożenia azotowego na zawartość azotanów w bulwach ziemniaka. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 440: 217 — 222.
- Lutomirska B., Jankowska J. 2012. Występowanie deformacji i spękań bulw ziemniaka w zależności od warunków meteorologicznych i odmiany. *Biul. IHAR* 266: 131 — 142.
- Mercik S. 2002. *Chemia rolno-podstawy teoretyczne i praktyczne*. Wyd. SGGW: 237 — 245.
- Nowacki W. 2006a. Udział plonu handlowego w plonie ogólnym jadalnych odmian ziemniaka. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 511: 429 — 439.
- Nowacki W. 2006 b. Straty w plonie handlowym czynnikiem determinującym efektywność ekonomiczną produkcji ziemniaków jadalnych. *Roczniki Naukowe SERiA*, tom VIII, z. 1: 133 — 136.
- Nowacki W. 2009. Czynniki wpływające na opłacalność produkcji ziemniaka w Polsce. *Roczniki Naukowe SERiA*, t. XI, z. 1, 320 — 323.
- Nowacki W. 2010. Rynek ziemniaków w Polsce. *Roczniki Naukowe Seria. T. XII z. 4*: 230 — 234.
- Nowacki W., Boguszewska D., Czerko Z., Goliszewski W., Grudzińska M., Jankowska J., Lutomirska B., Pietraszko M., Trawczyński C., Wierzbińska A., Zarzyńska K., Michalak K. 2014. *Charakterystyka Krajowego Rejestru Odmian Ziemniaka*. Wyd. XVII, IHAR — PIB O/Jadwisin: 34ss.
- PTG 2009. Klasyfikacja uziarnienia gleb i utworów mineralnych – PTG 2008. *Roczn. Glebozn. — Soil Sci. Ann.* 60 (2): 5 — 16.
- Pytlarz-Kozicka M. 2002. Wpływ sposobów pielęgnowania na wysokość i jakość plonów ziemniaka. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 489: 147 — 155.
- Reda S., Łojkowska E. 1993. Wpływ nawożenia azotem na zawartość azotanów w bulwach ziemniaka. *Biul. Inst. Ziemn.* 42: 29 — 37.
- Roztropowicz S. 1989. Środowiskowe, odmianowe i nawozowe źródła zmienności składu chemicznego bulw ziemniaka. *Fragm. Agron.* 6 (6): 33 — 75.
- Roztropowicz S., Wierzejska-Bujakowska A. 1993. Nitrogen fertilization of Polish potato cultivars. *Potato Res.* 4: 384.
- Roztropowicz S. (red.) 1999. *Metodyka obserwacji, pomiarów i pobierania próbek w agrotechnicznych doświadczeniach z ziemniakiem*. Praca zbiorowa. IHAR Oddział Jadwisin: 50 ss.
- Rytel E. 2010. Wybrane substancje odżywcze i antyżywnieniowe ziemniaka i zmiany ich zawartości podczas przetwarzania na produkty spożywcze. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 557: 43 — 61.
- Sawicka B., Michałek W., Pszczółkowski P. 2011. Uwarunkowania potencjału plonowania średnio późnych i późnych odmian ziemniaka w warunkach środkowo – wschodniej Polski. *Biul. IHAR* 259: 219 — 228.
- Silva G. H., Andrew W.T. 1987. Hill to hill variations in tuber field in Alberta. *Am. Potato J.* 62 (3): 119 — 127.
- Simmonds N. W. 1977. Relations between specific gravity, dry matter content and starch content of potatoes. *Potato Research*, 20 (2): 134 — 140.
- Trawczyński C. 2004. Zależność między dawką azotu a plonem odmian ziemniaka. *Biul. IHAR* 232: 131 — 140.
- Trawczyński C. 2007. Reakcja kilku nowych odmian ziemniaka na nawożenie azotem. *Biul. IHAR* 246: 73 — 81.

- Trawczyński C. 2008. Reakcja nowych odmian ziemniaka na nawożenie azotem. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. z. 530: 187 — 196.
- Trawczyński C. 2010. Wykorzystanie azotu z nawozów przez odmiany ziemniaka o zróżnicowanych wymaganiach w stosunku do tego składnika. Biul. IHAR 256: 133 — 140.
- Trawczyński C. 2013. Reakcja na nawożenie mineralne azotem trzech nowych odmian ziemniaka jadalnego w latach 2010–2012. Biul. IHAR 269: 29 — 39.
- Trawczyński C., Wierzbicka A. 2011. Reakcja nowych odmian ziemniaka na nawożenie azotem. Biul. IHAR 259: 193 — 201.
- Trawczyński C., Wierzbicka A. 2012. Relacje między zawartością witaminy C i azotanów w bulwach odmian ziemniaka należących do różnych grup wczesności. Biul. IHAR 266: 143 — 150.
- Wierzbicka A., Lis B. 2002. Optymalizacja nawożenia azotem wczesnych odmian ziemniaka. Zesz. Prob. Post. Nauk Rol. z. 489: 203 — 212.
- Wierzbicka A. 2006. Zmienność wybranych cech jakości bulw wczesnych odmian ziemniaka w zależności od nawożenia azotem i terminu zbioru. Zesz. Prob. Post. Nauk Rol. z. 511: 175 — 187.
- Wierzbicka A. 2012. Wpływ odmiany, nawożenia azotem i terminu zbioru na zawartość suchej masy i skrobi w bulwach ziemniaków wczesnych. *Fragm. Agron.* 29 (2): 134 — 142.
- Wierzbicka A., Mazurczyk W., Wroniak J. 2008. Wpływ nawożenia azotem i terminu zbioru na plon i wybrane cechy jakości bulw wczesnych odmian ziemniaka. Zesz. Prob. Post. Nauk Rol. z. 530: 207 — 216.
- Wierzejska-Bujakowska A. 1996 a. Maksymalne biologicznie dawki azotu dla 22 odmian ziemniaka i ich zmiana pod wpływem ochrony przed zarazą ziemniaka (*Phytophthora infestans* (Mont) de Bary). Biul. Inst. Ziem. 46: 51 — 62.
- Wierzejska-Bujakowska A. 1996 b. Wpływ ochrony ziemniaka przed zarazą (*Phytophthora infestans* (Mont) de Bary) na długość okresu wegetacji i na zawartość skrobi w bulwach modyfikowaną nawożeniem azotem. Biul. Inst. Ziem. 46: 63 — 71.

SPIS TREŚCI — CONTENTS

Aleksandra Małyska	Co nowego w agrobiotechnologii, A.D. 2015?	3
Tomasz Twardowski	What's new in Polish agrobiotechnology, A.D. 2015?	
Kinga Stuper-Szablewska	Porównanie aktywności przeciwutleniającej różnych odmian pszenicy ozimej naturalnie porażonej i inokulowanej grzybami z rodzaju <i>Fusarium</i>	9
Anna Ostrowska		
Tomasz Góral	Comparison of the antioxidant activity of different varieties of winter wheat naturally infected and inoculated with fungi of the genus <i>Fusarium</i>	
Anna Matysiak		
Juliusz Perkowski		
Tomasz Góral	Odporność genotypów pszenicy ozimej na fuzariozę kłosów i akumulację toksyn fuzaryjnych w ziarnie scharakteryzowana za pomocą różnych typów odporności	19
Piotr Ochodzki		
Dorota Walentyn-Góral	Resistance of winter wheat lines to <i>Fusarium</i> head blight and <i>Fusarium</i> toxins accumulation characterized using different types of resistance	
Jolanta Belter		
Maciej Majka		
Michał Kwiatek		
Halina Wiśniewska		
Jerzy Bogacki		
Tadeusz Drzazga		
Bogusława Ługowska		
Przemysław Matysik		
Edward Witkowski		
Krzysztof Rubrycki		
Urszula Woźna-Pawlak		
Halina Wiśniewska	Odporność rodów hodowlanych pszenżyta ozimego na infekcję kłosa grzybem <i>Fusarium culmorum</i>	39
Tomasz Góral		
Piotr Ochodzki	Resistance of winter triticale breeding lines to infection of spike with <i>Fusarium culmorum</i>	
Dorota Walentyn-Góral		
Michał Kwiatek		
Maciej Majka		
Jolanta Belter		
Zofia Banaszak		
Mirosław Pojmaj		
Danuta Kurlito		
Marcin Konieczny		
Grzegorz Budzianowski		
Alicja Cicha		
Kazimierz Paizert		
Henryk Woś		
Aurelia Ślusarkiewicz-Jarzina	Otrzymywanie podwojonych haploidów z mieszańców ozimych i jarych pszenżyta z zastosowaniem kolchicyny w kulturach pylnikowych	57
Aleksandra Ponitka	Doubled haploid production of winter and spring triticale hybrids using colchicine in anther cultures	

Andrzej Kasperski Renata Kasperska	Zastosowanie n-wymiarowej macierzy kropkowej do analizy zmienności genetycznej roślin Application of n-dimensional dot-matrix to analysis of plant genetic diversity	69
Karolina Kaźmińska Aleksandra Korzeniewska Anna Seroczyńska Grzegorz Bartoszewski Katarzyna Niemirowicz-Szczytt	Zmienność wybranych cech ilościowych rekombinacyjnych linii wsobnych dyni olbrzymiej (<i>Cucurbita maxima</i> Duch.) Variability of selected quantitative traits in recombinant inbred lines of winter squash (<i>Cucurbita maxima</i> Duch.)	85
Renata Słomnicka Adrianna Pietluch Justyna Łęczycka Anna Doraczyńska Aleksandra Korzeniewska Helena Olczak-Woltman Katarzyna Niemirowicz-Szczytt Grzegorz Bartoszewski	Identyfikacja markerów SSR przydatnych do konstrukcji mapy genetycznej i mapowania genów odporności na kanciastą plamistość liści ogórka (<i>Cucumis sativus</i> L.) Identification of SSR markers useful for construction of genetic map and mapping of angular leaf spot resistance genes in cucumber (<i>Cucumis sativus</i> L.)	93
Artur Makarewicz	Jakość konsumpcyjna bulw ziemniaka nawożonego wsiewkami międzyplonowymi w integrowanym i ekologicznym systemie produkcji The quality of potato tubers fertilized with undersown catch crops in the integrated and organic production system	105
Cezary Trawczyński	Wpływ nawożenia mineralnego azotem na plon i jakość bulw nowych odmian ziemniaka The influence of mineral nitrogen fertilization on the yield and tuber quality of new potato cultivars	115