

TOMASZ KOSIADA
ROMAN ANDRZEJAK
MARCIN WIECZYŃSKI
PATRYCJA MARCINIAK

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 28, 60-637 Poznań

Kierownik Tematu w latach 2014–2017: dr hab. Tomasz Kosiada

Kierownik Tematu w roku 2018: dr inż. Roman Andrzejak Uniwersytet Przyrodniczy, Katedra Fitopatologii i Nasiennictwa, Dąbrowskiego 159, 60-594 Poznań, tel. 602599463, e-mail: tomasz.kosiada@up.poznan.pl, tel. 723830069, e-mail: roman.andrzejak@up.poznan.pl,

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi nr HOR.hn.HOR.hn.802.16.2018, Zadanie 19.

Badania nad zwiększeniem odporności żyta na sporysz i na fuzariozę kłosów przez poznanie interakcji pasożyt — żywiciel — środowisko z wykorzystaniem genetycznych źródeł odporności na *Claviceps purpurea* i grzyby rodzaju *Fusarium*

The research on increasing resistance in rye to ergot and to *Fusarium* head blight by studying the host-parasite-environment relationship using genetic sources of resistance to *Claviceps purpurea* and *Fusarium* genus

Słowa kluczowe: *Claviceps purpurea*, ergot, *Fusarium*, genotyp, rye, sporysz, żyto

CEL BADAŃ

Celem prowadzonych badań było określenie interakcji pomiędzy czynnikami wpływającymi na wystąpienie wybranych chorób kłosów żyta. Oceniano reakcje 90 genotypów żyta na porażenie przez *Claviceps purpurea* i grzyby rodzaju *Fusarium*. Badania prowadzono w trzech Stacjach Hodowli Roślin (Choryń, Smolice, Wiatrowo) oraz w Katedrze Fitopatologii i Nasiennictwa Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. W latach 2014–2018 tematyka poszczególnych badań obejmowała:

— pozyskanie izolatów grzybów patogenicznych oraz mikroorganizmów niepatogenicznych wykorzystywanych w dalszych etapach badań,

- ocena patogeniczności, zmienności genetycznej, przynależności gatunkowej patogenów oraz określenie przynależności gatunkowej i działania antagonistycznego pożytecznych mikroorganizmów,
- ocena porażenia żyta przez grzyby i występowania mykotoksyn,
- prowadzenie doświadczeń w różnych warunkach środowiska z udziałem różnych genotypów w warunkach polowych,
- prowadzenie doświadczeń w komorze wegetacyjnej i na mikroplotkach w celu określenia interakcji patogen — genotyp żyta.

WYNIKI

W latach 2014–2015 z prób roślin pobieranych, z terenu Kujaw i Wielkopolski uzyskano izolaty grzybów patogenicznych należących do rodzaju *Fusarium* oraz grzybów niepatogenicznych, potencjalnych antagonistów. W wyniku prowadzonych prac udało się w roku 2014 się uzyskać 15 izolatów grzybów należących do rodzaju *Trichoderma* (*T. aureoviride* 2 szt., *T. brevicompactum* — 2 szt., *T. citrinoviride* — 2 szt., *T. hamatum* — 2 szt., *T. harzianum* — 2 szt., *T. koningii*, *T. longipilis* — 2 szt., *T. pseudokoningii*, *T. pubescens*, *T. strictipilis*). Spośród grzybów należących do rodzaju *Fusarium* najczęściej izolowano gatunki: *F. avenaceum*, *F. culmorum* i *F. graminearum*. W 2015 wyizolowano grzyby powszechnie uznawane za patogeny, szczególnie grzyby rodzaju *Fusarium*. Izolowano również grzyby rodzaju *Bipolaris* oraz *Drechslera*. W wyniku prowadzonych prac wyizolowano łącznie ponad 130 izolatów. Ponadto oznaczono grzyby należące do *Acremonium* sp. — 3 szt., *Alternaria alternata* — 14 szt., *Aspergillus flavus* — 4 szt., *Cladosporium cladosporioides* — 8 szt., *Epicoccum* — 11 szt., *Gliocladium* sp. — 7 szt., *Mucor* sp. — 6 szt., *Penicillium* sp. — 16 szt., *Rhizopus* sp. — 4 szt., *Trichoderma* sp. — 8 szt. Kultury *C. purpurea* uzyskiwano poprzez wyłożenie sklerocjów na pożywkę PDA. W przypadku pozyskiwania izolatów *C. purpurea* sklerocja pochodziły z 3 miejscowości (Choryń, Smolice, Wiatrowo). Uzyskano 50 czystych kultur *C. purpurea*. Sklerocja używane do pozyskanie patogenu zostały zebrane z kłosów różnych genotypów żyta.

Uzyskane izolaty niepatogenicznych grzybów testowane były wobec *C. purpurea* metodą szeregów biotycznych (Mańka, 1974) w celu wybrania najbardziej antagonistycznych izolatów. Na podstawie oceny indywidualnego efektu biotycznego (IEB) stwierdzono, w 2014 roku, wzajemne zróżnicowanie oddziaływania między badanymi 15 izolatami rodzaju *Trichoderma* a izolatami *C. purpurea*. Wartości IEB, uzyskane w trakcie badań były wysokie i wahały się od +6 do +8. Uzyskane wyniki potwierdziły wysokie zdolności grzybów rodzaju *Trichoderma* w ograniczaniu wzrostu lub rozwoju *C. purpurea*. W 2015 roku metodą szeregów biotycznych (Mańka, 1974) oceniano inne izolaty grzybów niepatogenicznych. Stwierdzono zróżnicowanie oddziaływania między badanymi izolatami różnych gatunków (*Acremonium alternatum*, *Epicoccum nigrum*, *Gliocladium catenulatum*, *Mucor hiemalis*, *Penicillium adametzii*, *P. funiculosum*, *P. nigricans*, *Trichoderma harzianum*, *T. viride* i *Zygorhynchus moellerii*) a izolatami *C. purpurea*. Wartości IEB, wahały się od +4 do +8, w zależności od testowanego wobec

C. purpurea gatunku. Uzyskane wyniki potwierdziły pogląd o występującej zależności pomiędzy dużą szybkością wzrostu kultur a ich zdolnościami antagonistycznymi. W tym doświadczeniu patogen *C. purpurea* charakteryzował się najwolniejszym wzrostem. Potwierdziły się również wysokie zdolności antagonistyczne izolatów z rodzaju *Trichoderma*.

Dla 50 izolatów *C. purpurea* wyizolowano DNA. Następnie dla części z nich przeprowadzono reakcję PCR z użyciem staterów ITS1/ITS4. Następnie produkt PCR poddano sekwencjonowaniu. Porównanie wyników z danymi programu BLAST potwierdziły przynależność do gatunku *C. purpurea*. Dla starterów serii URP udało się uzyskać zmienność wewnątrz gatunkową. Przeprowadzone reakcje z użyciem starterów URP6R, URP4R, URP30F, URP25F, URP17R, URP38F pozwoliły dokonać pogrupowania izolatów. Nie udało się wyodrębnić grup związanych z innymi cechami np. z pochodzeniem izolatów.

W trzech miejscowościach (Choryń, Smolice, Wiatrowo) dokonano oceny porażenia 90 genotypów żyta przez grzyby rodzaju *Fusarium* w warunkach naturalnej infekcji oraz w wyniku sztucznego zakażenia. Badanie obejmowało 3 powtórzenia. W pierwszym i drugim roku oceniano wyłącznie naturalne porażenie, w kolejnych latach (2016, 2017, 2018) jedno powtórzenie podlegało sztucznej inokulacji przez *Fusarium culmorum* (2016), *F. graminearum* (2017) i *F. poae* (2018). Dla części prób oceniano również występowanie mykotoksyn (2014, 2015). Ocenę zawartości mykotoksyn (deoksynivalenol (DON), zearalenon (ZEA)) w ziarniakach przeprowadzono przy użyciu testu ELISA.

Średni procent zasiedlenia ziarniaków przez grzyby rodzaju *Fusarium* w zależności od pochodzenia genotypów był bardzo podobny i wynosił dla genotypów z Wiatrowa: 7,5%, Smolic: 7,2% i Choryni: 7,1%. Z kolei średnie porażenie dla 90 genotypów z zależności od lokalizacji doświadczenia było największe dla Wiatrowa (16,7%) i Choryni (15,3%) a najmniejsze dla Smolic (8,4%). Gatunkami *Fusarium* identyfikowanymi w trakcie oceny były *F. graminearum*, *F. poae*, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. oxysporum* i *F. equiseti*. Ziarniaki w wyniku naturalnej infekcji najczęściej porażane były przez *F. avenaceum* (3,1%), następnie w kolejności malejącej przez *F. graminearum* (1,4%), *F. culmorum* (1,2%) i *F. poae* (1,0%). Dominującymi gatunkami w poszczególnych latach badań były: *F. avenaceum* (2015, 2016), *F. graminearum* (2014) i *F. culmorum* (2017, 2018). Sztuczne zakażenie kłosów żyta w trakcie kwitnienia powodowało w przypadku *F. culmorum* i *F. graminearum* odpowiednio 5,2 i 2,65 razy większe porażenie ziarniaków niż w warunkach naturalnej infekcji. Z kolei zakażenie przez *F. poae* nie spowodowało większego zasiedlenia ziarniaków. Stwierdzono duże zróżnicowanie w zasiedleniu ziarniaków żyta przez poszczególne gatunki rodzaju *Fusarium*, nie znaleziono genotypu który nie był zasiedlany przez grzyby tego rodzaju. W tabeli 1 przedstawiono genotypy, w przypadku których stwierdzono najmniejszy procent zasiedlenia przez grzyby rodzaju *Fusarium* w poszczególnych latach badań.

Genotypy, w których stwierdzono najmniejszy procent zasiedlenia ziarniaków żyta przez grzyby rodzaju *Fusarium*

Pochodzenie genotypu	Lata				
	2014 poniżej 10%	2015 poniżej 10%	2016 poniżej 10%	2017 poniżej 5%	2018 poniżej 1%
PHR (Wiatrowo)	GRADAN	WTD 32/14	NS135N/4	WM 34R	WM 52R
	WM 46R	WTD 29/14	NSIN 0723	WTD 28/15	WTD 18/15
	WM 41R	WM 45/1	WM 52R	NSIN T1	
	WM 45R			ANTONIŃSKIE	
				WTD 21/15	
				NS 58N/08	
				WM 37/2	
				GRADAN	
				WM 60 R	
				WM 51R	
Danko (Choryń)	DC 1168	DC 98	L 77/11	DC 1431	DL 15
		SZK 3N/12	DC 63	SZK 15/13	DL 16
		DC 42		DC 42	DC 104
				DC 63	DC 84
				DC 73	DC 97
				LS 256N/13	DL 10
				LS 266N/13	
				LS 229N/13	
				DC 92	
Smolice	HRSM 102-4R	HRSM 147-4R	HRSM 181-4R	HRSM 238-3R	HRSM 224-4R
	HRSM 95-4R	HRSM 130-4R	HRSM 185-4R	HRSM 228-3R	
	HRSM 11-4R	HRSM 135-4R	HRSM 161-4R	HRSM 209-4R	
		HRSM 154-4R	HRSM 186-4R	HRSM 250-3R	
				HRSM 200-4R	
				HRSM 220-3R	
				HRSM 239-3R	
				HRSM 214-4R	

Zawartość mykotoksyn we wszystkich próbkach w odniesieniu do obu mykotoksyn była na bardzo niskim poziomie, zbliżonym do błęd pomiarowego.

W trzech miejscowościach oceniano porażenie 90 genotypów żyta przez *C. purpurea* w warunkach naturalnej infekcji oraz w doświadczeniu fungicydowym interakcje pomiędzy genotypem, lokalizacją doświadczenia a ochroną fungicydową w występowaniu sporyszu. W zebranych plonie wydzielano frakcje zawierającą przetrwalniki *C. purpurea*, na tej podstawie obliczono udział sklerocjów w ogólnym plonie żyta. W doświadczeniu fungicydowym zastosowano fungicyd Adexar Plus, w dwóch terminach: początek kwitnienia najwcześniejszej odmiany oraz siedem dni później. Czynnikiem pierwszego rzędu był genotyp żyta (trzy genotypy, różniące się długością kwitnienia), drugiego rzędu zastosowanie fungicydu w różnych terminach (trzy poziomy: początek kwitnienia najwcześniejszej odmiany, siedem dni później, równocześnie w obu terminach). Dodatkowo w latach 2016–2018 dodano kombinacje z opryskiwaniem roślin zawieszoną zarodników *Trichoderma* sp.

W latach 2014–2018 stwierdzono duże różnice w porażeniu pomiędzy 90 genotypami żyta uprawianymi w trzech miejscowościach. Jego występowanie bardzo silnie zależało

od miejscowości. Największe ilości sklerocjów stwierdzono w Smolicach — 3,85 mg w 1 kg, mniej w Wiatrowie — 1,37 mg w 1 kg, a najmniej w Choryni 0,64 mg w 1 kg. Nie stwierdzono różnic w występowaniu sporyszu w zależności od pochodzenia genotypu. W genotypach pochodzących z PHR (Wiatrowo) było 0,47 mg sklerocjów w 1 kg, z Danko (Choryń) 0,53 mg sklerocjów w 1 kg, a ze Smolic 0,52 mg sklerocjów w 1 kg. W latach tych wystąpiły znaczne różnice w porażeniu poszczególnych genotypów, występowały też genotypy w których nie stwierdzono obecności sklerocji *C. purpurea* (tab. 2).

Tabela 2

Genotypy w których nie stwierdzono obecności sklerocjów *C. purpurea*

Pochodzenie genotypu	lata				
	2014	2015	2016	2017	2018
PHR (Wiatrowo)	Brak	WM 18 R	WTD 16/15	NS 135N/4	WM 52R
		WM 31 R	WTD 21/15	NS58/08	WTD 27/15
		WM 41 R	WM 60R		
		WM 45 R	DC 1289		
		WM 47 R	NS94N/06		
		WM 50 R	NS 5N07		
		WM 53 R	NS 857N/95		
		WM 54 R			
		WTD 33/14			
		RPD 492			
		NS 94N/06			
		NS 58N/08			
		Danko (Choryń)	Brak	DL 10	DL 13
DL 11	LS 172N/10			DC 12	
DC 98	TUR				
DC 88	D.GRADA N				
DC 81					
Smolice	Brak	HRSM 127-4R	HRSM 162-4R	brak	brak
		HRSM 128-4R	HRSM 165-4R		
		HRSM 130-4R	HRSM 169-4R		
		HRSM 131-4R	HRSM 181-4R		
		HRSM 132 4R			
		HRSM 134-4R			
		HRSM 136-4R			
		HESM 138-4R			
		HRSM 140-4R			
		HRSM 141-4R			
		HRSM 142-4R			
		HRSM 143-4R			
		HRSM 144-4R			
		HRSM 147-4R			
		HRSM 150-4R			
HRSM 153-4R					
HRSM 155-4R					
HRSM 156-4R					

W przeprowadzonym w latach 2014–2018 doświadczeniu z ochroną fungicydową, stwierdzono duże różnice w porażeniu pomiędzy miejscowościami. W latach 2014–2015

najwięcej sporyszu (w mg sklerocjów w 1 kg) stwierdzono: 1403,6 — Wiatrowie, 704,1 — Smolice 26,2 — Choryń. Podobną zależność uzyskano w latach 2016–2018, z tym, że ilość sklerocjów w mg w 1 kg była niższa i wynosiła odpowiednio: 1,6; 1,1; 0,7. Średnio dla wszystkich miejscowości i lat najmniej sklerocjów było w kombinacji, w której wykonano tylko 1 zabieg 7 dni po początku kwitnienia (492,6 mg sklerocjów w 1 kg w latach 2014–2015 i 1,1 mg sklerocjów w 1 kg w 2016–2018). We wszystkich kombinacjach, w których stosowano opryskiwanie plon ziarna był wyższy (od 7 do 7,35 kg z poletka) niż w kombinacji nieopryskiwanej (6,75 kg z poletka). Zawartość sklerocjów w kombinacji z użyciem zawiesiny *Trichoderma* sp. była na podobnym poziomie jak w kombinacjach z fungicydem i wynosiła 1,2 mg w 1 kg.

Doświadczenia założone w celu określenia interakcji patogen-genotyp żyta było prowadzone na odmianie Dankowskie Złote. Do zakażenia w kolejnych latach używane były różne izolaty rodzaju *Fusarium*. W okresie kwitnienia roślin żyta były one opryskiwane zawiesiną zarodników odpowiedniego gatunku rodzaju *Fusarium* (*F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. poae*, *F. equiseti*). Dodatkowo przewidziano kombinacje z wykorzystaniem izolatów rodzaju *Trichoderma*, którymi opryskiwano rośliny żyta dwa dni po sztucznej inokulacji przy użyciu zawiesiny zarodników *Fusarium*. Sztuczna inokulacja roślin żyta zawiesiną zarodników odpowiedniego izolatu rodzaju *Fusarium* powodowała większe zasiedlenie ziarniaków żyta przez ten gatunek. Wynosiło ono dla *F. avenaceum* — 20,4%, *F. culmorum* — 22,7%, *F. graminearum* — 25,8%, *F. poae* — 12,8%, *F. equiseti* — 16,0%. Przy zastosowaniu ochrony z wykorzystaniem izolatów rodzaju *Trichoderma* procent porażenia ziarniaków żyta ulegał zmniejszeniu i wynosił dla *F. avenaceum* — 12,6%, *F. culmorum* — 10,4%, *F. graminearum* — 16,9%, *F. poae* — 8,1%, *F. equiseti* — 9,1%. W komorze wegetacyjnej przeprowadzono doświadczenie nad wpływem temperatury na przebieg infekcji przez *C. purpurea*. Oceniano wpływ trzech temperaturach: 10, 15, 20°C. W trakcie kwitnienia rośliny opryskiwano zawiesiną zarodników pochodzącą z różnych izolatów. W temperaturze 10°C uzyskano 0,06 mg sklerocjów w 1 kg, w 15°C — 0,05 mg sklerocjów w 1 kg a w temperaturze 20°C — 1,1 mg sklerocjów w 1 kg.

WNIOSKI

1. Jedną ze skuteczniejszych metod pozyskiwania kultur *C. purpurea* jest uzyskiwanie wzrostu grzybni wyrosłej ze sklerocjów.
2. Izolaty *Trichoderma harzianum*, *T. pseudokoningii*, i *T. viride* oraz *Penicillium adametzii* charakteryzowały się najwyższymi zdolnościami antagonistycznymi (wyrażone najwyższym IEB) wobec badanych izolatów *C. purpurea*.
3. Stwierdzono zróżnicowaną interakcję między badanymi izolatami *C. purpurea* a izolatami grzybów niepatogenicznych.
4. Startery serii URP generują produkty PCR różnicujące izolaty wewnątrz gatunku *C. purpurea*.
5. Największy wpływ na porażenie żyta przez *C. purpurea* i *Fusarium* sp. ma lokalizacja doświadczenia.

6. Występują różnice w porażeniu badanych 90 genotypów żyta przez *C. purpurea* i *Fusarium* sp. Nie znaleziono genotypów żyta, które były odporne na porażenie przez grzyby rodzaju *Fusarium*.
7. Sztuczne zakażenie roślin żyta zarodnikami konidialnymi *C. purpurea* lub izolatem konkretnego gatunku grzyba rodzaju *Fusarium* zwiększa porażenie ziarniaków.
8. Opryskiwanie roślin żyta fungicydem w okresie kwitnienia nie ma negatywnego wpływu na plon.
9. Opryskiwanie kwitnących roślin żyta zawiesiną zarodników *Trichoderma* dwa dni po zakażeniu przez *Fusarium* powoduje obniżenie porażenia ziarniaków przez *Fusarium* sp.

LITERATURA

Mańka K. 1974 Zbiorowiska grzybów jako kryterium oceny wpływu środowiska na choroby roślin. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln. 160: 9 — 23.

